

DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS COM BASE DE  
AMIDO DE MILHO REFORÇADOS POR *THEOBROMA CACAO*

Vanessa de Moura Queiroz

Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e  
de Materiais, COPPE, da Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Doutor em  
Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadores: Renata Antoun Simão  
Ariane de Jesus Sousa Batista

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2022

DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS COM BASE DE  
AMIDO DE MILHO REFORÇADOS POR *THEOBROMA CACAO*

Vanessa de Moura Queiroz

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO  
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR  
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Orientadores: Renata Antoun Simão  
Ariane de Jesus Sousa Batista

Aprovada por: Prof. Renata Antoun Simão  
Prof. Ariane de Jesus Sousa Batista  
Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré  
Prof. Joyce Rodrigues de Araújo  
Prof. Geronimo Perez

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL  
FEVEREIRO DE 2022

Queiroz, Vanessa de Moura

Desenvolvimento de Filmes Biopoliméricos com Base de Amido de Milho Reforçados por *Theobroma Cacao*/Vanessa de Moura Queiroz. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2022.

XV, 85 p.: il.; 29, 7cm.

Orientadores: Renata Antoun Simão

Ariane de Jesus Sousa Batista

Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2022.

Referências Bibliográficas: p. 68 – 85.

1. films. 2. biopolymer. 3. starch. 4. cocoa.

I. Simão, Renata Antoun *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

*Dedico este trabalho à minha avó  
Argemira, às crianças que me  
proporcionaram um pouquinho de  
alegria nesta jornada (Isadora,  
Luna, Ryan, Miguel, Luis  
Miguel, Luiza e Lucca), às  
vítimas do Covid-19 e aos seus  
familiares.*

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, aos meus anjos de guarda e ao universo que me protegeram MUITO e mantiveram minha saúde suficiente durante todo este processo.

Agradeço ao meu marido Rodrigo e às minhas melhores amigas Nadia, Lívia e Maira que foram as pessoas que mais me apoiaram e me suportaram mesmo nos piores momentos.

À minha família, especialmente à minha avó que mesmo sem entender exatamente do que se trata a pesquisa de doutorado, me apoiou, me orientou, me incentivou, orou e ACREDITOU em mim em todos os momentos.

À psicóloga do Acolhe COPPE, Josiane, que teve papel fundamental no processo e me ajudou muito a manter minha saúde mental, compreender e superar as dificuldades e não desistir.

Aos demais amigos queridos que sempre torceram, apoiaram e deram forças.

À minha orientadora, professora Renata, por toda oportunidade de aprendizado e evolução acadêmica e pessoal.

À minha orientadora, professora Ariane, por ter aceitado o desafio, me acompanhando e dando suporte acadêmico. Agradeço pela sua paciência.

À coordenadora do programa (PEMM/COPPE), professora Gabriela, pela sua humanidade e força de vontade, que mesmo com tantos problemas e responsabilidades, me ajudou, inspirou e deu forças para continuar acreditando que podemos construir um meio acadêmico mais inclusivo e construtivo (Não destrutivo!!!!).

À coordenadora de pós graduação (PEMM/COPPE), professora Rafaela e à equipe administrativa Metalmat, por todo acolhimento e suporte administrativo acadêmico, sempre muito precisos e solícitos.

Ao professor Werneck, à professora Regina e a equipe do Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF/COPPE), que são minha segunda família e minha segunda casa há quase 10 anos. Agradeço a confiança de sempre, por todo suporte instrumental, analítico, conversas produtivas e confraternizações alegres.

À minha banca avaliadora, professora Rossana, professor Gerônimo e doutora Joyce por aceitarem o convite (alguns mais uma vez) e que contribuiram/contribuem

sempre positivamente com o meu trabalho e aprendizado.

À equipe do laboratório de caracterização de superfícies (LES/PEMM/COPPE), especialmente aos técnicos Heleno e Jackson pelo suporte instrumental e analítico.

Ao Doutor Bráulio e sua equipe de microscopia (DIMAT/INMETRO), pela oportunidade de realização dos ensaios e todo suporte instrumental.

À professora Bluma, do Laboratório de Aditivos Poliméricos para Produção de Petróleo (LADPOL/PEMM/COPPE) e sua equipe de pós docs muito atenciosas, pela oportunidade e suporte na realização dos ensaios mecânicos.

À equipe do Laboratório de Engenharia de Polimerização (ENGEPOL/COPPE), especialmente à analista Nathalie, pela oportunidade de realização dos ensaios de granulometria.

E a todos que por ventura não citei, que contribuíram positivamente (ou não) para conclusão deste desafio.

Deus abençoe a todos!  
MUITO OBRIGADA!

"A fé na vitória tem que ser inabalável."  
(Falcão/Sabóia, o Rappa)

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS COM BASE DE  
AMIDO DE MILHO REFORÇADOS POR *THEOBROMA CACAO*

Vanessa de Moura Queiroz

Fevereiro/2022

Orientadores: Renata Antoun Simão

Ariane de Jesus Sousa Batista

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

O objetivo desta tese foi produzir filmes biopoliméricos à base de amido de milho termoplástico, reforçados com extrato de cacau em pó com propriedades mecânicas otimizadas, aumento da hidrofobicidade e potencial de inibição microbiana e possível aplicação como embalagem alimentícia. Utilizou-se três amostras de cacau: Natural extraída do fruto (NAT-F) que foram fermentadas, secas e moídas; Sementes orgânicas comerciais fermentadas e secas em média temperatura (NAT-C) e cacau em pó industrializado (IND). As amostras de cacau foram submetidas ao ultrassom em solução hidroalcoólica, comparados os efeitos e incorporadas em amido gelatinizado e processado por *casting*. Os filmes produzidos apresentaram sutis mudanças na cristalinidade do amido após a adição do cacau, demonstraram aumento na resistência mecânica (de 30 até 150%) e na hidrofobicidade (91 até 313%). Os filmes com NAT-F, apresentaram maior resistência ( $3,89 \pm 0,15$  MPa), com a maior quantidade de gordura, no entanto, apresentou a menor quantidade de polifenóis ( $4,75 \pm 0,32$  mg(GAE)/g), aglomerações de partículas heterogêneas e não inibiram o crescimento microbiano. Os filmes com NAT-C, melhoraram o desempenho hidrofóbico, com alguma inibição microbiana, maior quantidade de polifenóis no cacau ( $8,77 \pm 0,09$  mg(GAE)/g) e menor resistência à tensão ( $2,20 \pm 0,09$  MPa). Os filmes produzidos com cacau industrializado (IND) apresentaram melhor potencial de inibição microbiana ( $IC_{50} = 5,9\%$  contra *S. aureus* e  $8,6\%$  contra *E. coli*), devido à alcalinização do pó, alta quantidade de polifenóis ( $7,97 \pm 0,05$  mg(GAE)/g), melhor resistência a tração nos filmes com 10% de cacau ( $3,72 \pm 0,23$  MPa) e boa dispersão de partículas. De maneira geral, os filmes com cacau IND apresentaram melhor desempenho e com NAT-C a melhor proposta sustentável.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF BIOPOLYMERIC FILMS BASED ON CORN STARCH  
REINFORCED BY THE *THEOBROMA CACAO*

Vanessa de Moura Queiroz

February/2022

Advisors: Renata Antoun Simão

Ariane de Jesus Sousa Batista

Department: Metallurgical and Materials Engineering

This work aimed to produce biopolymeric films based on thermoplastic corn starch reinforced with cocoa in order to obtain films with optimized mechanical properties, hydrophobicity and potential of microbial inhibition. Natural cacao seeds extracted of the fruit was fermented, dried and milled (NAT-F) and results of the addition of this powder was compared to the obtained for cacao milled from commercially fermented and dried seeds (NAT-C) and industrialized cacao (IND). All samples were treated by ultrasonic bath in hydroalcoholic solution for incorporating into gelatinized starch for casting. Small changes in starch crystallinity were observed after cacao addition. Films presented increased mechanical strength (30% up to 150%) and enhancement in surface hydrophobicity (91% up to 313%). Films with NAT-F showed better strength ( $3.89 \pm 0.15$  MPa) with higher fat content. By the other side, this sample presented less polyphenols ( $4.75 \pm 0.32$  mg(GAE)/g), heterogeneous particle agglomeration and did not inhibit microbial growth. The films with NAT-C, improved the hydrophobic performance, with some microbial inhibition, higher quantity of polyphenols ( $8.77 \pm 0.09$  mg(GAE)/g) and lower tensile strength ( $2.20 \pm 0.09$  MPa). The films produced from industrial cacao (IND), showed better microbial inhibition potential ( $IC_{50} = 5.9\%$  against *S. aureus* and 8.6% against *E. coli*), due to alkalinization of the powder and high quantity of polyphenols ( $7.97 \pm 0.05$  mg(GAE)/g) and better tensile strength of films with 10% cocoa ( $3.72 \pm 0.23$  MPa) and good particle dispersibility. Overall, the films with IND cocoa showed the best performance and with NAT-C the best eco-friendly proposal.

# Sumário

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xiv</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Objetivos</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Objetivo geral:</i> . . . . .	3
2.2 <i>Objetivos específicos:</i> . . . . .	3
<b>3 Revisão de literatura</b>	<b>4</b>
3.1 Biopolímeros . . . . .	4
3.2 Amido . . . . .	6
3.2.1 Estrutura granular do amido . . . . .	6
3.2.2 Cristalinidade do amido . . . . .	9
3.3 Filmes De Amido Termoplástico . . . . .	10
3.3.1 Gelatinização . . . . .	10
3.3.2 Retrogradação . . . . .	11
3.3.3 Processamento dos filmes . . . . .	12
3.4 Adição de plastificantes . . . . .	13
3.5 Adição de outros compostos a filmes termoplásticos . . . . .	15
3.6 Cacau . . . . .	16
3.6.1 Processamento Do Cacau . . . . .	19
3.6.2 Fermentação . . . . .	20
3.6.3 Secagem . . . . .	21
3.6.4 Torrefação . . . . .	21
3.7 O que ocorre com os principais componentes do cacau no processamento? . . . . .	22

<b>4 Materiais e métodos</b>	<b>24</b>
4.1 Materiais . . . . .	24
4.2 Metodologia . . . . .	26
4.2.1 Preparo do cacau . . . . .	26
4.2.2 Preparo do extrato de cacau . . . . .	27
4.2.3 Distribuição grânulométrica (DG) . . . . .	27
4.2.4 Quantificação de polifenóis totais . . . . .	28
4.2.5 Preparo dos filmes . . . . .	29
4.2.6 Espessura e densidade . . . . .	30
4.2.7 Teor de umidade . . . . .	30
4.2.8 Solubilidade em Água . . . . .	30
4.2.9 Absorção de Água . . . . .	31
4.2.10 Ângulo de Contato . . . . .	31
4.2.11 Microscopia de Varredura por Feixe de Hélio (MEV/HIM) . .	32
4.2.12 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) . . . . .	32
4.2.13 Difração de raios-X (DRX) . . . . .	32
4.2.14 Ensaios de tração . . . . .	32
4.2.15 Ensaios Microbiológicos . . . . .	33
<b>5 Resultados e Discussões</b>	<b>35</b>
5.1 Distribuição granulométrica . . . . .	35
5.2 Quantidade de polifenóis totais . . . . .	37
5.3 Características físicas e aparência dos filmes . . . . .	39
5.4 Espessura, densidade e teor de umidade . . . . .	41
5.5 MEV/HIM . . . . .	43
5.6 DRX . . . . .	45
5.7 FTIR . . . . .	48
5.8 Ensaios de tração . . . . .	50
5.9 Absorção e solubilidade dos filmes em água . . . . .	56
5.10 Ângulo de contato . . . . .	58
5.11 Teste antimicrobiano . . . . .	61
<b>6 Conclusões</b>	<b>65</b>
<b>7 Sugestões para trabalhos futuros</b>	<b>67</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>68</b>

# Lista de Figuras

3.1	Estrutura da (A) amilose (B) amilopectina (adaptado de LAJOLO e MENEZES [32]). . . . .	7
3.2	Modelo estrutural do anel de crescimento dos grânulos de amido, demonstrando a parte mais interna ou “hilum” e as lamelas alternadas (a) e a organização estrutural da amilopectina encontrada nos anéis de crescimento e seus respectivos tipos de ligações (b) (Adaptado de DENARDIN e SILVA [29]). . . . .	8
3.3	Difratogramas de Raios-X organizados de baixo para cima: Amido de milho, amido de batata, amido de ervilha e amilose cristalizada. A organização dos picos cristalinos correspondem a cristalinidade tipo A, B, C e $V_H$ , respectivamente (adaptado de VAN SOEST e VLIEGENTHART [40]). . . . .	10
3.4	Esquematização das etapas do processo de gelatinização e retrogradação do amido (adaptado de YU e CHRISTIE [41]). . . . .	11
3.5	Cacau Forastero, originário da Floresta Amazônica (Imagen do Autor).	17
3.6	Estruturas químicas das metilxantinas (adaptado de FRANCO <i>et al.</i> [85]). . . . .	18
4.1	Sementes de cacau NAT-F preparadas para fermentação (A), após secagem ao sol (B) e após moagem (C). . . . .	26
4.2	Sementes de cacau NAT-C (A) e após moagem (B). . . . .	26
4.3	Cacau industrializado (IND) em pó. . . . .	27
4.4	Etapas de produção dos filmes. . . . .	29
5.1	Distribuição dos tamanhos de partículas dos pós de cacau NAT-F ( <b>A</b> ), NAT-C ( <b>B</b> ) e IND ( <b>C</b> ) não sonicado ( <b>NS</b> ) e sonicado ( <b>S</b> ), com destaque para redução das partículas nas amostras de NAT-C e IND após o processamento. . . . .	35
5.2	Curva de calibração de ácido gálico (mg/ml), utilizada para quantificação de polifenóis dos pós de cacau (ABS 725 nm). . . . .	37

5.3	Exemplares de filmes produzidos: <b>TPS</b> (Controle) e <b>TPS/cacau 2%</b> e as amostras de todos os filmes com cacau para comparação. . . . .	39
5.4	Imagens de MEV/HIM dos Filmes TPS e TPS/cacau. . . . .	43
5.5	Difratogramas de raio-x de <b>a)</b> amido e as três amostras de cacau em pó; and <b>b)</b> Filmes TPS e TPS/cacau. . . . .	45
5.6	Espectros de FTIR de: <b>a)</b> amido e as três amostras de cacau em pó; and <b>b)</b> Filmes TPS e TPS/cacau. . . . .	48
5.7	Preparo dos corpos de prova para os ensaios de tração: A) Aferição de tamanho B) Armazenamento dos corpos de prova em temperatura e umidade controladas 48 horas antes do ensaio. . . . .	50
5.8	Gráficos representativos dos resultados dos ensaios mecânicos dos filmes com as letras (a-e) demonstrando a significância estatística quando são diferentes ( $p < 0,05$ ). . . . .	51
5.9	Curvas de tensão x deformação de um representante de cada tipo de filme mais próximo das médias obtidas com suas respectivas taxas de reforço em relação ao TPS. A) TPS e TPS/NAT-F; B) TPS e TPS/NAT-C; TPS e TPS/IND; . . . . .	53
5.10	Absorção e solubilidade dos filmes em água. *As letras diferentes (a-f) são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). . . . .	56
5.11	Medidas de ângulo de contato dos filmes aferidas a cada 10 segundos, durante 120 segundos e suas respectivas imagens das gotas no primeiro segundo de análise: <b>a)</b> TPS e TPS/NAT-F; <b>b)</b> TPS e TPS/NAT-C; <b>b)</b> TPS e TPS/IND. . . . .	58
5.12	Curva de calibração da quantidade de células bacterianas pela densidade optica (D.O.) e sua respectiva equação. . . . .	61
5.13	Potencial de inibição microbiana dos filmes contra <i>S. aureus</i> ( <b>a</b> ) e <i>E. coli</i> ( <b>b</b> ) e metade da concentração inibitória máxima ( $IC_{50}$ ) dos filmes contra <i>S. aureus</i> ( <b>c</b> ) e <i>E. coli</i> ( <b>d</b> ), respectivamente. *As letras diferentes (a-f) representam a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). . . . .	62

# Lista de Tabelas

3.1	Quantidade de amilose e amilopectina em diferentes vegetais (Adaptado de MALI <i>et al.</i> [33])	9
3.2	Composição das sementes de cacau (Adaptado de LOULLIS e PINAKOULAKI [83]).	18
4.1	Tipo de processamento e proporção de gordura das sementes de cacau tratadas (*de acordo com as informações do fabricante)	24
5.1	Resultados de distribuição granulométrica antes e depois do processamento de ultrassom. *NS = Não Sonicado/ S = Sonicado	36
5.2	Quantidade de polifenóis totais mg (GAE)/g das três amostras de cacau de cada replicata, com suas respectivas médias e desvios padrão.	37
5.3	Espessura (Esp), densidade (D) e teor de umidade (U) dos filmes produzidos (média ± desvio).	41
5.4	Valores de tensão máxima ( $\sigma$ ), a tensão de escoamento (TE), o módulo de Young (E) e o alongamento na ruptura ( $\epsilon$ ) dos filmes TPS e TPS/cacau expressos em média ± desvio padrão.	52
5.5	Resultados de absorção e solubilidade dos filmes em água de cada tipo de filme, expressos em média ± desvio. *As letras diferentes (a-f) na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )	56
5.6	Valores de ângulo de contato dos filmes em 1 segundo de análise e em 120 segundos, expressos em média ± desvio.*As letras diferentes (a-g) na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).	59
5.7	Estimativa de células de <i>S.aureus</i> e <i>E.coli</i> nos ensaios contra o filme controle (TPS) e os filmes TPS/cacau, expressos em média ± desvio.	63

# **Lista de Abreviaturas**

ABS	Absorbância, p. 37
ASTM	"American Society for Testing and Materials", p. 27
D.O.	Densidade óptica, p. 37
DG	Distribuição grânulométrica, p. 27
DRX	Difração de raios-X, p. 3
E	Módulo de Young ou elástico, p. 50
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, p. 3
HIM	Microscopia de varredura por feixe de Hélio, p. 3
IND	Cacau em pó industrializado, p. 3, 24
LE	Limite de escoamento, p. 50
NAT-C	Sementes de cacau orgânicas comercializadas, p. 3
NAT-F	Sementes do fruto de cacau natural, p. 3
NS	Não sonicado, p. 35
PBAT	Polibutirato, p. 4
PCL	poli ( $\epsilon$ - caprolactona, p. 4
PHA	polihidroxialcanoatos, p. 4
PHB	polihidroxibutirato, p. 4
PLA	Poli(ácido lático), p. 4
S	Sonicado, p. 35

TPS/IND	Filmes de amido termoplástico contendo extrato de cacau industrializado, p. 30
TPS/NAT-C	Filmes de amido termoplástico contendo extrato de cacau natural cormercializado, p. 30
TPS/NAT-F	Filmes de amido termoplástico contendo extrato de cacau natural, p. 30
TPS	Amido termoplástico, p. 3
TU	teor de umidade, p. 30
v/v	Volume/volume, p. 28

# Capítulo 1

## Introdução

Nos últimos anos, mostra-se crescente o interesse das indústrias no que diz respeito à substituição de materiais sintéticos ou não-degradáveis por biopolímeros, materiais ecológicos produzidos a partir de fontes renováveis, para redução da poluição e para saúde humana [1–3].

A maioria dos biopolímeros ou polímeros naturais, biodegradáveis e produzidos por meio de sistemas biológicos (microrganismos, plantas e animais) ou sintetizados quimicamente utilizando matérias-primas naturais (milho, açúcar, amido, etc.) ou seus compostos [4]. Estes biopolímeros são facilmente degradados pela atividade enzimática de organismos vivos, como fungos, bactérias e leveduras, tendo como produtos finais deste processo o  $CO_2$ ,  $H_2O$ , biomassa ou hidrocarbonetos, que não são prejudiciais ao meio ambiente [5].

Os biopolímeros têm sido fortemente investigados para diversas aplicações biomédicas e farmacêuticas, com objetivo de liberar bioativos, cicatrização de feridas, administração de medicamentos e engenharia de tecidos [2, 6]; como matrizes de embalagens biodegradáveis inteligentes com funções antioxidantes, antimicrobianas, indicadoras de pH, etc [3, 7–10] e também como filmes comestíveis modificados que possuem propriedades de barreira para gases, umidade, odores, etc. [11, 12].

Dentre os polissacarídeos, o amido é amplamente estudado como matriz de filmes poliméricos biodegradáveis, pois é um recurso altamente disponível, de baixo custo, natural e de fonte renovável [3, 13]. Os filmes produzidos com base de amido são descritos como inodoros, insípidos, isotrópicos e não tóxicos [14]. Entretanto, estes filmes são empobrecidos em suas propriedades mecânicas, apresentam baixa plasticidade e alta capacidade hidrofílica [15]. Para contornar estes problemas, é possível adicionar plastificantes, estabilizadores, entre outros, na formulação dos filmes termoplásticos à base de amido [3, 5, 8].

Plastificantes, como glicerol, ácidos graxos e uréia, melhoram as propriedades termoplásticas, o comportamento mecânico e o processamento dos filmes de amido.

No caso do glicerol, os grupos hidroxilas permitem interações intermoleculares, através de ligações de hidrogênio, com cadeias poliméricas, fornecendo filmes com uma estrutura mais flexível [14, 15]. No entanto, o glicerol por ser altamente higroscópico, aumenta a capacidade hidrofílica dos filmes dependendo da concentração empregada nos filmes, o que interfere nas propriedades físicas e químicas por este motivo, necessitam de outros compostos para melhorar suas propriedades.

O enriquecimento dos filmes biodegradáveis com antioxidantes e/ou antimicrobianos naturais, como o cacau (*Theobroma cacao*), possui aplicações diversas na indústria de embalagens, alimentícia, biomédica e cosmética. O cacau pode apresentar possíveis implicações benéficas para saúde humana, devido à presença dos flavonóides nas sementes [8, 10].

Os flavonóides são os compostos bioativos dos polifenóis, que possuem atividade antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antialérgica, antimicrobiana, antiviral e anticancerígena [8, 16, 17]. Também auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e doenças neurodegenerativas [10, 18].

Com a finalidade de aprimorar filmes termoplásticos de amido, aproveitando os diversos benefícios dos polifenóis, este trabalho visa produzir biopolímero que possua atividade antimicrobiana de forma natural, simples e barata para possíveis aplicações como embalagens de alimentos.

# Capítulo 2

## Objetivos

### 2.1 *Objetivo geral:*

Producir filmes biopoliméricos de amido de milho com cacau (*Theobroma cacao*), conferir melhorias nas propriedades físicas, mecânicas e atividade antimicrobiana, com possível aplicação como embalagem de alimentos.

Com a finalidade de avaliar o efeito dos diferentes processamentos dos pós de cacau nas propriedades dos filmes produzidos, foram usadas três amostras de cacau de três fontes e em concentrações distintas.

### 2.2 *Objetivos específicos:*

- Processar as sementes de cacau natural do fruto (NAT-F), natural comercial (NAT-C) e industrializado (IND) : Moagem (quando aplicável), processamento por ultrassom e granulometria;
- Quantificar os polifenóis totais de cada amostra de cacau após ultrassom;
- Produzir filmes de amido termoplástico (TPS) com e sem adição de extrato de cacau em pó por *casting*;
- Caracterizar a morfologia dos filmes por HIM ;
- Investigar as interações químicas dos componentes do cacau e amido nos filmes produzidos e nos pós, por DRX e FTIR ;
- Comparar filmes contendo cada amostra de cacau com o TPS a partir das suas propriedades mecânicas (resistência a tração, rigidez, deformação) e da afinidade com a água (teor retido, absorção, solubilidade e ângulo de contato);
- Avaliar o potencial de inibição microbiana dos filmes *in vitro* contra *S.aureus* e *E.coli*;

# Capítulo 3

## Revisão de literatura

### 3.1 Biopolímeros

São polímeros produzidos a partir de sistemas biológicos ou organismos vivos. Os Biopolímeros têm sido amplamente utilizados como materiais alternativos na substituição de plásticos derivados de petróleo por serem de fontes renováveis, abundantes e geralmente biodegradáveis, isto é, podem ser decompostos com facilidade pela ação de organismos naturais, sob determinadas condições de umidade, pH e temperatura, entre outros fatores que favorecem as reações de biodegradação. O resultado destas reações são subprodutos orgânicos, tais como dióxido de carbono, água e biomassa que não são prejudiciais ao meio ambiente [19, 20]. De acordo com a origem, os biopolímeros podem ser classificados nos seguintes grupos [20–23]:

- Biopolímeros naturais extraídos da biomassa ou agro-polímeros ( Ex. amido e celulose);
- Biopolímeros naturais sintetizados por produção microbiana ou fermentação a partir do milho, cana de açúcar, mostarda etc. como o polihidroxialcanoatos (PHA) e polihidroxibutirato (PHB)
- Biopolímeros sintetizados quimicamente, biodegradáveis de recursos renováveis (Ex. Poli(ácido lático) (PLA));
- Biopolímeros sintetizados quimicamente de recursos petrolíferos mas que são poliésteres alifáticos biodegradáveis, como por exemplo o poli ( $\epsilon$ - caprolactona) (PCL).
- Biopolímeros sintetizados quimicamente de recursos não renováveis, que são poliésteres aromáticos e alifáticos. (Ex. Polibutirato (PBAT)), entre outros.

Para um polímero seja considerado biodegradável, segundo as normas internacionais da ASTM, a degradação do plástico deve ocorrer naturalmente pela

ação de microorganismos ativos no ambiente (como por exemplo, fungos e bactérias) através de processos de catálise enzimática ou por processos não enzimáticos na quebra das cadeias do polímero, como por exemplo através de hidrólise química. Os produtos finais de polímeros biodegradados geralmente incluem CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, água, biomassa, entre outras substâncias naturais, que são relevantes para o equilíbrio dos gases de efeito estufa e outros impactos ambientais de forma benéfica [23].

Ademais, o polímero biodegradável deve demonstrar uma taxa de biodegradação satisfatória e adequada no que diz respeito a conversão de matéria seca em dióxido de carbono em até 180 dias, como descrito na ASTM D6400-12 [24]. Os outros processos como fotodegradação, oxidação e hidrólise também podem ter impacto na estrutura e nas cadeias dos polímeros antes ou durante a biodegradação [23]. Estas características contribuem na redução do uso de plásticos de fontes não renováveis e diminui a quantidade de lixo por meio da reciclagem biológica, que envolve a compostagem.

O plástico sofre degradação pelos processos biológicos durante a compostagem e resulta em dióxido de carbono, água, compostos inorgânicos e biomassa a uma taxa consistente com outros materiais compostáveis conhecidos. Além disso, não deixa resíduos visualmente distinguíveis ou tóxicos.

O biopolímero também pode ser submetido a compostagem, entretanto, nem todo biopolímero é compostável. Um biopolímero para ser considerado compostável, deve apresentar as seguintes condições segundo MTIBE *et al.* [22]:

- Se decompor naturalmente em dioxido de carbono;
- Após um tempo pré estabelecido, os produtos de decomposição devem ser indistinguíveis da biomassa do polímero;
- A qualidade do composto não deve ser influenciada negativamente pela biomassa residual.
- Todo resíduo não deve ser prejudicial a outros seres vivos (animais ou plantas).

Os polissacarídeos são o principal recurso energético na natureza que se encontram nas matrizes centrais de organismos vegetais e marinhos como complexos hidratados. São polímeros que apresentam estruturas lineares ou ramificadas de açucares, unidos por ligações glicosídicas [19].

Para que os biopolímeros tenham aplicações industriais mais amplas, há uma grande preocupação em utilizar matérias-primas renováveis. Dentre os polissacarídeos, o amido é um dos polímeros naturais promissores para substituir os polímeros não-biodegradáveis na indústria, devido seu baixo custo, sua disponibilidade abundante, além de ser totalmente biodegradável e biocompatível

com diversos compostos e outros polímeros, como poliolefinas, PHA, PLA, PCL, mostram-se adequados para produção, por exemplo, de materiais de embalagens biodegradáveis [23, 25, 26].

## 3.2 Amido

O amido é um polímero natural, semicristalino, biossintetizado em forma de grânulos de estrutura poliédrica e alguns grânulos semi-esféricos no endosperma vegetal e estocado como carboidrato de reserva. Em geral, são encontrados em folhas, tubérculos, raízes, sementes, frutos, entre outros [25, 27, 28].

Ele é uma das fontes de carboidratos de maior importância na alimentação humana e faz parte de processos industriais alimentícios essenciais como agente espessante, gelificante, estabilizador, na retenção de água etc [29]. Os principais alimentos comercializados onde o amido é encontrado são de batata, ervilha, milho, arroz, mandioca, aveia, trigo, cevada, etc [27, 30].

### 3.2.1 Estrutura granular do amido

Existem duas macromoléculas distintas na composição do amido que são formadas por unidades de  $\alpha$ -D-glicose: Amilopectina e amilose [27]. A amilopectina consiste em cadeias longas e curtas com ligações  $\alpha$ -(1,4) e ramificações do tipo  $\alpha$ -(1,6). A amilose é caracterizada por cadeias de ligações  $\alpha$ -(1,4), lineares ou com poucas ramificações, como pode ser observado na Figura 3.1 [27, 31, 32].

Em condições nativas, a amilopectina apresenta uma grande quantidade de ramificações, aproximadamente uma vez a cada 20 unidades de  $\alpha$ -D-glicose, o que torna sua massa molar na ordem de  $10^7$  a  $10^9$  g mol. A amilose apresenta menos pontos de ramificações e sua massa molar é consequentemente menor, em torno de  $10^5$  g mol [27, 31].

Os grânulos de amido podem variar o tamanho entre 1-50 microns, dependendo da sua fonte vegetal e a sua estrutura granular consiste em lamelas intercaladas por regiões cristalinas mais densas e regiões amorfas menos ordenadas, denominadas anéis de crescimento. Estes anéis se estendem do interior ou “hilum” à superfície dos grânulos (Figura 3.2a). A região cristalina é compreendida por cadeias de amilopectina, com sua porção linear dispostas em duplas hélices que são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila. A região amorfa é formada por cadeias de amilose e por pontos de ramificação da amilopectina [28, 31, 33].

Na estrutura do amido, há dois grupos hidroxila secundários em C-2 e C-3 de cada resíduo de glicose, assim como um grupo hidroxila primário em C-6 quando não

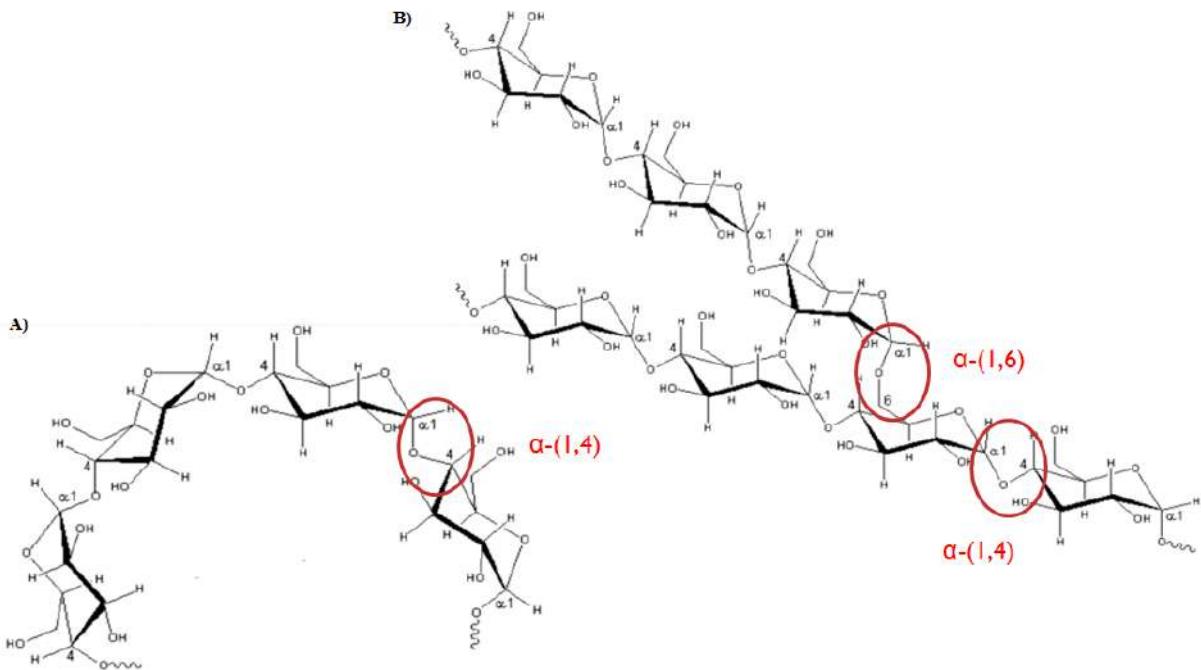


Figura 3.1: Estrutura da (A) amilose (B) amilopectina (adaptado de LAJOLO e MENEZES [32].

está ligado. O amido apresenta características hidrofílicas e a presença de grupos hidroxila disponíveis nas cadeias potencialmente apresentam reatividade específica para álcoois, o que permite que eles sejam oxidados e reduzidos e podem participar do formação de ligações de hidrogênio, éteres e ésteres [34, 35].

A amilose organiza-se de modo paralelo e pode ser encontrada principalmente entre as cadeias de amilopectina ou concentrada na porção central do grão, por consequência da sua linearidade, mobilidade e pela presença dos grupos hidroxila [29]

A organização das cadeias de amilopectina é diferenciada e possui cadeias A, B e C, como observado na Figura 3.2b. As cadeias “A” são curtas e não possuem ramificações. São compostas por uma cadeia não redutora de glicose, com ligações  $\alpha$ -(1,4) e se ligam em uma cadeia “B” por ligações  $\alpha$ -(1,6). As cadeias “B”, são cadeias longas compostas por ligações  $\alpha$ -(1,4) e  $\alpha$ -(1,6) e podem conter uma ou mais cadeias “A”. As cadeias “C” possuem terminal redutor e consiste em uma molécula de amilopectina estruturada pelos dois tipos de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) e  $\alpha$ -(1,6) [29, 36].

As proporções de amilose e amilopectina nos grânulos de amido podem variar de acordo com a sua fonte vegetal. Em geral, a quantidade de amilopectina é maior, entre 70 e 85%, como pode ser observado na Tabela 3.1. Estas variações podem conferir diferentes propriedades físico-químicas na sua estrutura, tamanho e distribuição dos grânulos. [27, 33].

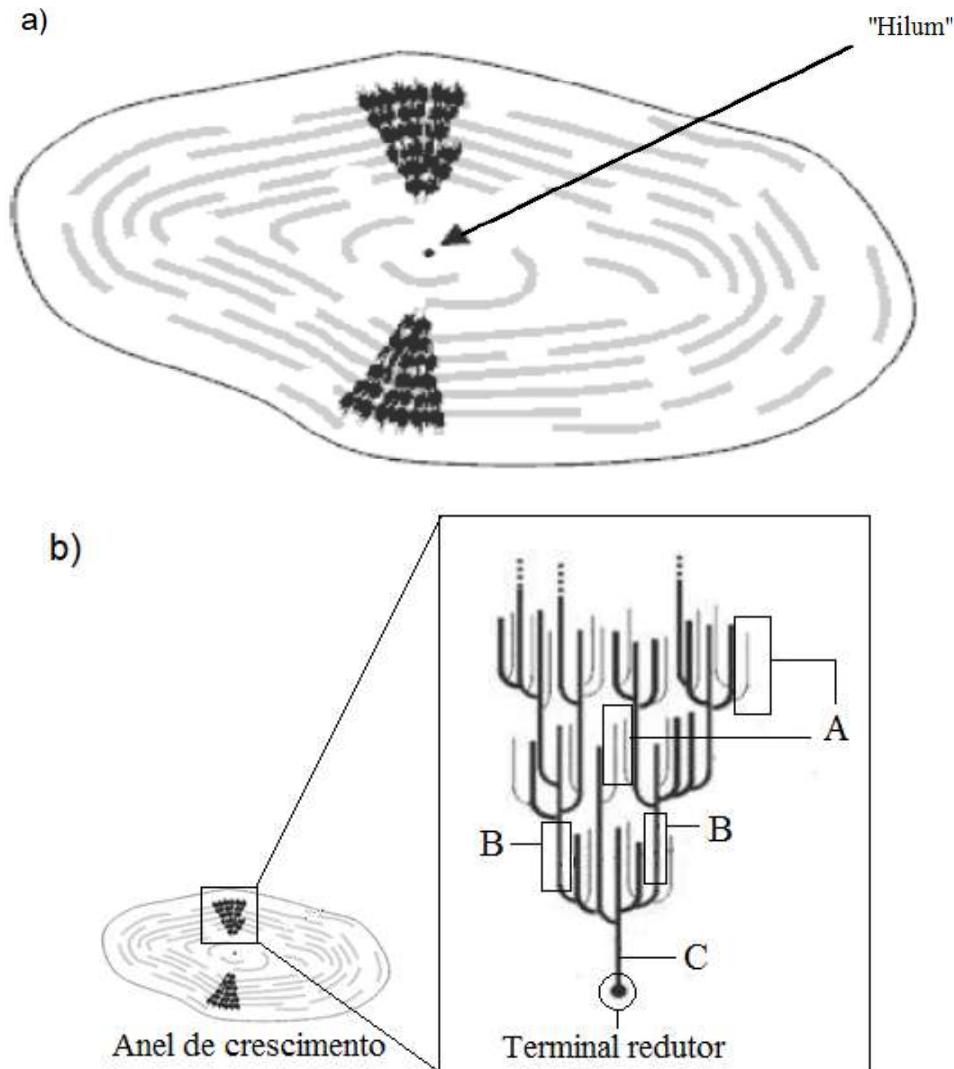


Figura 3.2: Modelo estrutural do anel de crescimento dos grânulos de amido, demonstrando a parte mais interna ou “hilum” e as lamelas alternadas (a) e a organização estrutural da amilopectina encontrada nos anéis de crescimento e seus respectivos tipos de ligações (b) (Adaptado de DENARDIN e SILVA [29]).

Outros componentes que estão presentes em menor quantidade no amido podem ser agrupados em três categorias, segundo BULEON *et al.* [27]:

- Componentes superficiais: Enzimas, proteínas e aminoácidos;
- Materiais particulados, que são compostos por fragmentos de parede celular;
- Componentes internos, tais como lipídeos e fosfatos.

O forte arranjo intermolecular através de ligações de hidrogênio, que é formado pelos grupos hidroxilos na superfície, conferem as propriedades hidrofílicas dos grânulos de amido que são facilmente modificadas por moléculas de água, o que afeta diretamente as propriedades mecânicas, dimensão e a temperatura de transição

Tabela 3.1: Quantidade de amilose e amilopectina em diferentes vegetais (Adaptado de MALI *et al.* [33])

Fonte vegetal	Amilose (%)	Amilopectina (%)
Milho	25	75
Aveia	16-33	84-66
Inhame	30	70
Mandioca	16-20	84-80
Trigo	20	80
Arroz	15-25	85-75
Batata	23	77

vítrea (T<sub>g</sub>), que é uma transição de fase que ocorre em materiais amorfos ao serem submetidos a certas temperaturas que promovem à mobilidade molecular [33] e que pode variar entre 60 e 80°C dependendo da quantidade de água retida.

A hidrofilicidade do amido pode ser utilizada também para aumentar a taxa de degradação de polímeros hidrofóbicos, pois ele é altamente biodegradável em uma grande variedade de ambientes [35, 37].

### 3.2.2 Cristalinidade do amido

O grau de cristalinidade do amido natural podem variar entre 15-45%. Os tipos principais de estruturas cristalinas encontradas no amido nativo são rotuladas como A, B e C (Figura 3.3).

Os cristais do tipo A e B são constituídos por seis estruturas helicoidais duplas. A diferença entre elas é relacionada a densidade de empacotamento. A cristalinidade do tipo B é observada geralmente em tubérculos com alto teor de amilose, possui uma célula hexagonal fracamente empacotada constituída por seis hélices duplas dispostas no sentido anti-horário, alinhadas em paralelo e uma coluna contendo trinta e seis moléculas de água presentes no centro do arranjo. Os cristais tipo A apresentam empacotamento monoclinico, possuem apenas oito moléculas de água e as demais são substituídas por estruturas helicoidais duplas adicionais, sendo observados geralmente em cereais. A estrutura cristalina do tipo C é considerada como uma intermediária entre os tipos A e B e pode ser encontrada no amido de ervilha, por exemplo [38, 39].

Em sua forma natural, o amido não é um polímero termoplástico, pois sua temperatura de fusão excede a de degradação. No entanto, quando ele é submetido a um tratamento térmico, com adição de plastificantes e intensas tensões de cisalhamento, sua estrutura cristalina primária é modificada e são originadas outras estruturas do tipo V (de origem alemã "Verkleisterung", que significa gelatinização), caracterizadas a partir da precipitação de complexos graxos ou monoglicerídeos. A amilose passa a apresentar uma conformação helicoidal no amido termoplástico. Destas, as estruturas mais importantes são do tipo V<sub>H</sub> (hidratado), que possui

uma célula unitária ortorrômbica ou hexagonal e  $V_A$ (anidra) que apresenta mais hélices de amilose e menos água, em comparação à  $V_H$  [38, 39]. A comparação da cristalinidade tipo  $V_H$  em relação a grânulos nativos de amido, pode ser observada na Figura 3.3.

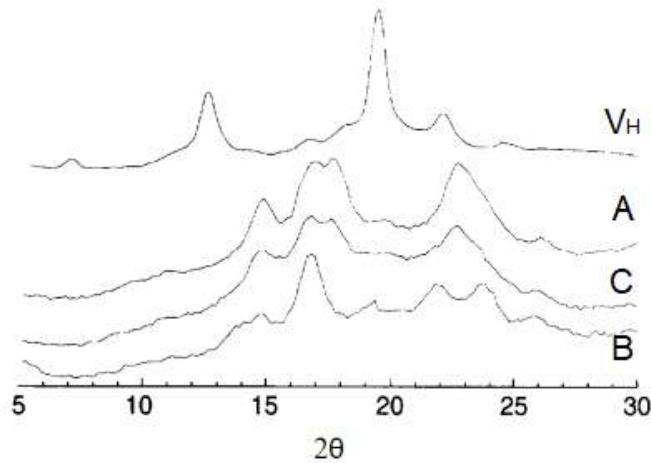


Figura 3.3: Difratogramas de Raios-X organizados de baixo para cima: Amido de milho, amido de batata, amido de ervilha e amilose cristalizada. A organização dos picos cristalinos correspondem a cristalinidade tipo A, B, C e  $V_H$ , respectivamente (adaptado de VAN SOEST e VLIEGENTHART [40]).

### 3.3 Filmes De Amido Termoplástico

Para transformar o amido em termoplástico, é preciso haver o processamento físico-químico dos grãos nativos, que devido às suas cadeias serem formadas por pontes de hidrogênio, eles são insolúveis na maioria dos solventes orgânicos e em água na temperatura ambiente [39].

#### 3.3.1 Gelatinização

O processo de gelatinização depende diretamente do teor de água e da temperatura. Na fase inicial do processo, quando aumenta-se 60°C da temperatura de uma suspensão de amido, a água consegue penetrar nas moléculas de amido, mas ainda não consegue desnaturar os grânulos que mantém a estrutura estável (Figura 3.4, etapa a) em forma de esferulitos mantidas pelas ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals [41, 42].

Com o aumento desta temperatura, inicia-se a desestruturação dos grânulos e o processo de gelatinização. Esta primeira etapa consiste na transformação do amido granular em uma pasta viscoelástica. A temperatura em que acontece a gelatinização

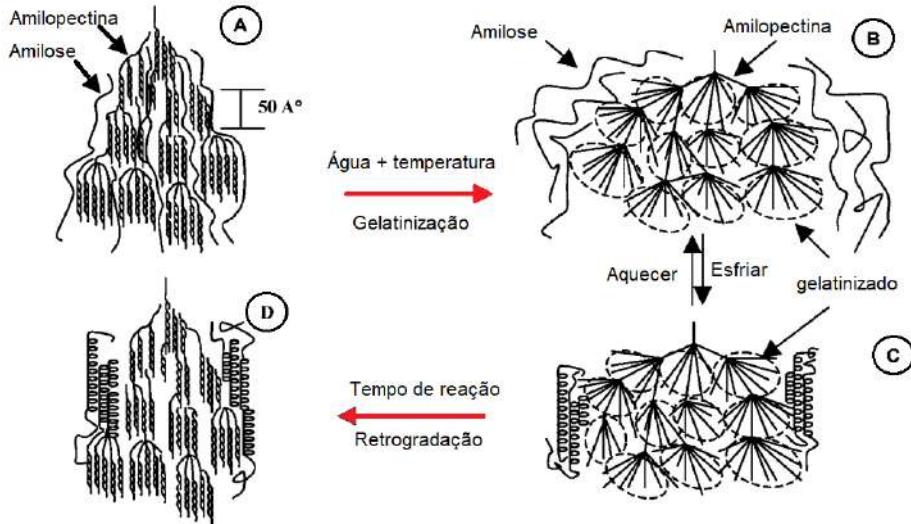


Figura 3.4: Esquematização das etapas do processo de gelatinização e retrogradação do amido (adaptado de YU e CHRISTIE [41]).

é em torno de 60 a 75 °C, dependendo da fonte botânica do amido. O aquecimento provoca um colapso nas organizações moleculares, que se inicia no centro do grão em direção a área periférica e promove a perda da birrefringência do amido, devido à hidratação, inchamento e solubilização dos grânulos (Figura 3.4, etapa b) [29, 43, 44].

De acordo com SINGH *et al.* [43], o aumento do movimento molecular, induz o rompimento das estruturas cristalinas, que expõem os grupos hidroxila com a formação de ligações de hidrogênio entre a amilose e a amilopectina, o que potencializa o processo de inchamento e a solubilização das moléculas. Este processo resulta em mudanças irreversíveis nas propriedades primárias tais como solubilidade, fusão cristalina, viscosidade, etc.

Em outro estudo, demonstrou-se que os grânulos de amido se rompem ao sofrer o processo de inchamento durante a gelatinização, quando a quantidade de água incorporada é maior que 40%. Ao reduzir a quantidade de água, foi visto que é preciso aumentar a temperatura do processo para obter o rompimento dos grânulos. Além disso, observou-se que a velocidade de agitação durante a gelatinização intervém diretamente sobre as propriedades finais dos filmes [45].

### 3.3.2 Retrogradação

Durante o resfriamento do amido gelatinizado, é dado início ao fenômeno da retrogradação. Neste processo ocorrem vários eventos físicos, tais como aumento da turbidez, viscosidade e exsudação de água, o que permite a formação de um gel ou filme (Figura 3.4, etapa c)[44].

A energia cinética da reação diminui e as cadeias de amido amorfo reordenam

gradualmente com a formação de ligações de hidrogênio. A amilose retrograda e recristaliza de forma mais rápida, com a formação de arranjos cristalinos com estruturas helicoidais simples e duplas. A recristalização da amilopectina ocorre mais lentamente e esta taxa varia de acordo com a sua concentração e temperatura de armazenagem do material (Figura 3.4, etapa d) [29, 44, 46].

A retrogradação da amilopectina é caracterizada por um aumento no grau de cristalinidade com a formação polimorfos cristalinos tipo B, resultantes do rearranjo dos ramos curtos mais externos da amilopectina. O aumento da cristalinidade neste processo pode proporcionar mudanças no comportamento mecânico do polímero [39, 47]. Outros arranjos cristalinos também são formados durante a retrogradação dependendo das condições de armazenamento. Em filmes termoplásticos com glicerol, esta reordenação dos padrões cristalinos podem resultar no padrão  $V_H$ , que é formado devido a cristalização mais rápida da amilose em hélices simples devido a interação com os lipídeos do sistema polimérico e pode variar de acordo com o envelhecimento dos filmes [40, 46]. Além disso, dependendo da concentração de amilose, do uso de plastificantes e outros compostos adicionados à matriz do filme, estes podem retardar o processo de retrogradação [48–50].

### 3.3.3 Processamento dos filmes

Para obtenção de filmes termoplásticos, devido sua facilidade de processamento térmico, podem ser empregadas diferentes técnicas que influenciam diretamente nas propriedades dos filmes como: Espessura, afinidade com a água, desempenho mecânico, cristalinidade, etc. Alguns exemplos mais comuns podem ser brevemente citados como *casting*, que consiste na evaporação do solvente em variadas temperaturas; Extrusão que consiste nas etapas de gelatinização, quebra molecular, mistura, dar forma e inflameto ou secagem e pode ser seguida de moldagem por sopro, injeção ou termocompressão; Moldagem por compressão, onde uma mistura polimérica fundida é colocada em um molde e processado em uma prensa hidráulica em alta temperatura, entre outras técnicas [33, 51, 52].

Um dos métodos mais populares é o *casting* que consiste na evaporação do solvente e forma uma matriz de filme contínua [33]. No trabalho de FAKHOURI *et al.* [52], relatou-se a influência de diferentes técnicas de processamento que afetaram significativamente as propriedades dos materiais à base amido/gelatina. Os resultados demonstraram que os filmes obtidos por *casting* melhores resultados de permeabilidade de vapor do que filmes obtidos por extrusão.

A reorganização das cadeias durante a retrogradação e formação das estruturas cristalinas são fortemente influenciadas pelas condições de secagem no *casting*, dependendo da temperatura empregada no processo e interferem diretamente nas

propriedades mecânicas e de barreira. No trabalho de BADER e GÖRITZ [53], comparou-se as propriedades mecânicas dos filmes termoplásticos com alto teor de amilose processados em diferentes temperaturas de secagem. Os filmes secos a 20°C demonstraram ser mais flexíveis devido à menor complexação das cadeias de amilose, o que permitiu formação de alongamentos maiores. Já nos filmes secos a 80°C, houve a formação de cristais por complexos amilo-lipídicos, o que proporcionou um comportamento mais frágil dos filmes formados.

### 3.4 Adição de plastificantes

Embora a água seja o plastificante natural mais utilizado no processamento dos grânulos de amido, os filmes formados geralmente são quebradiços e apresentam uma mínima ou nenhuma flexibilidade, pois o amido não é um polímero verdadeiramente termoplástico, como os polímeros sintéticos. Por este motivo, são necessários outros plastificantes que proporcionem melhorias nas suas propriedades [33, 54, 55].

Quando plastificantes, além da água, são adicionados à solução de amido, ocorrem interações de caráter cooperativo que diminuem as forças intermoleculares, reduzem a  $T_g$  e aumentam a mobilidade das cadeias, permitindo a formação de regiões cristalinas, aprimorando assim as propriedades funcionais. Os plastificantes também podem evitar o encolhimento dos filmes durante o armazenamento, reduzir a resistência mecânica e a fragilidade do biopolímero [55, 56].

Dependendo da massa molar do plastificante, é possível que haja variações na cristalinidade do biopolímero. De acordo com MATHEW e DUFRESNE [54], quando há um aumento da massa molar, o plastificante pode ser expulso das regiões cristalinas e se concentrar na região amorfa, o que provoca uma redução da cristalinidade do amido. Com um peso molecular menor, o plastificante tem uma maior interação com as cadeias cristalinas da amilopectina e menor interação com a fase amorfa, o que proporciona um aumento de cristalinidade.

A maioria dos plastificantes proporciona aumento da higroscopичidade e maior mobilidade das cadeias. Por isso, é necessário um equilíbrio nas proporções adicionadas para não exceder o limite de compatibilidade com o biopolímero [36]. Quando concentrações muito baixas do plastificante são adicionadas à solução polimérica (< 20% em relação à quantidade de amido) é possível que ocorra o fenômeno de antiplastificação. Este efeito não permite que haja interação intermolecular suficiente do plastificante para aumentar a mobilidade das cadeias do polímero. Isto ocorre devido ao movimento ou vibração que deslocam as moléculas de água e plastificante gradualmente permitindo a interação da amilose ou da amilopectina por ligações de hidrogênio, causando a retrogradação e provocando apenas um aumento da rigidez dos filmes, dependendo das condições

de armazenamento [33, 57].

Em geral, os plastificantes mais usados são os polióis hidrofílicos de baixo peso molecular (glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, polietilenoglicol, etc.), eles adsorvem a água dependendo da quantidade de hidroxilas e da sua massa molar [33, 56]. Quanto menor a massa molar, melhor é a condição das interações intermoleculares e ocupação dos sítios entre as ligações de hidrogênio do biopolímero [5, 55]. Dos polióis, o glicerol é o plastificante mais estudado, pois é atóxico e apresenta uma excelente compatibilidade com o amido, interagindo diretamente no empacotamento das cadeias de amilose. Este plastificante possui baixa massa molar, contendo três grupos hidroxila, o que permite que ele seja solúvel em água [56]. A concentração de glicerol adicionada depende das aplicações que serão direcionadas.

No trabalho de ABDORREZA *et al.* [58], foi observada uma redução da ductilidade nos filmes de amido de sago quando a quantidade de glicerol adicionada à solução foi menor do que 30%. Quando a quantidade de glicerol utilizada foi maior do que 50% houve um grande aumento na plasticidade e na permeabilidade dos filmes. Concluíram que quanto maior o teor de glicerol, menor a eficácia na propriedade de barreira e de solubilidade, já que há uma saturação da solução polimérica.

Ao contrário, os resultados encontrados no estudo de HAZRATI *et al.* [59], que produziram filmes com base de amido com diferentes concentrações de sorbitol e glicerol, demonstraram que o aumento constante das concentrações de plastificante de 30% para 60% reduziu a densidade e a capacidade de absorção de água dos filmes, independentemente dos tipos de plastificante associados. Além disso, foi observado o fenômeno de efeito antiplasticização nos resultados de alongamento na ruptura de filmes plastificados com 60% de glicerol e glicerol + sorbitol. No trabalho de TAN *et al.* [60], foi investigado o processo de gelatinização do amido com a adição de diferentes quantidades de água e glicerol. Eles concluíram que com a adição de glicerol, gerou o aumento da temperatura de início da gelatinização. Além disso, demonstraram que é possível promover a gelatinização do amido utilizando baixos teores de água.

Uma das maiores desvantagens na adição de plastificantes, é a higroscopicidade da maioria dos filmes formados, ou seja, eles possuem alta sensibilidade à umidade ambiente. Durante o armazenamento e envelhecimento, o teor de plastificante no filme é reduzido, devido à migração de suas moléculas para superfície, o que pode comprometer suas propriedades mecânicas, reduzindo seu tempo de vida útil [33, 61], o que talvez possa ser melhorado na combinação de plastificantes e outros componentes.

No estudo de XU *et al.* [62], foi desenvolvido um filme de proteína de milho com diferentes concentrações de glicerol e ácido oleico (um tipo de ácido graxo). Nos resultados, apenas os filmes contendo a combinação dos dois plastificantes

apresentaram melhora nas propriedades mecânicas devido a interação deles com a proteína por diferentes mecanismos de plastificação. Segundo os pesquisadores, o ácido oleico atuou como plastificante molecular e o glicerol, plastificante estrutural.

Já no trabalho de HAZROL *et al.* [63], foram combinadas diferentes proporções de plastificantes sorbitol e glicerol em filmes de amido e também foi observado que as propriedades de teor, solubilidade e absorção de água dos filmes que continham os dois plastificantes apresentaram melhor desempenho em comparação aos filmes apenas com glicerol.

Os filmes de amido termoplástico mostraram-se materiais vantajosos e de baixo custo industrial. Mas suas propriedades dependem diretamente das condições de processamento e de aditivos, sendo indispensável o controle dos parâmetros de fabricação dos filmes para otimização de suas propriedades.

Em algumas aplicações, além de plastificantes, também podem ser adicionados outros agentes que influenciam diretamente nas propriedades do biopolímero, tais como agentes antimicrobianos, vitaminas, antioxidantes, de reticulação, pigmentos, etc [2, 33, 55, 56].

### 3.5 Adição de outros compostos a filmes termoplásticos

Muitas alternativas têm sido investigadas com a finalidade de reduzir a afinidade pela água e melhorar as propriedades dos filmes de amido e plastificantes. Outros componentes podem ser incorporados aos filmes de amido termoplásticos como reforço, para aprimorar as diversas propriedades dos filmes. Os mais investigados atualmente são minerais [64, 65], fibras naturais [35, 66–68], micro/nanopartículas [20, 69, 70] e outros polímeros combinados [71–73].

Além disso, alguns destes componentes podem proporcionar a produção de biopolímeros inteligentes com indicadores colorimétricos, ação antioxidante, antimicrobiana, hidrofóbicas, etc [8, 33, 74, 75]. Entre os diferentes compostos bioativos, os polifenóis presentes em frutas e sementes têm ganhado destaque recentemente devido à sua atividade antioxidante e/ou antimicrobiana, além de seus diversos benefícios à saúde humana [76].

Rico em polifenóis, o cacau (*Theobroma cacao*) têm sido amplamente investigado combinado na produção de filmes e bioplásticos. No trabalho de CALATAYUD *et al.* [8], foram desenvolvidos filmes de copolímero etileno-álcool vinílico (EVOH) com extrato de cacau com alta concentração de polifenóis, processados por *casting*. Os resultados mostraram capacidade antimicrobiana e antioxidantes dos filmes. Já no estudo de KIM *et al.* [3], produziu-se filmes de amido de feijão com polifenóis

purificados de cacau triturado, com a finalidade de desenvolver embalagem para alimentos. Os filmes apresentaram boa degradabilidade, aumento na resistência mecânica e alta capacidade antioxidante.

VEIGA-SANTOS *et al.* [10] desenvolveram uma embalagem à base de filme de amido de mandioca enriquecido com café e cacau com alto poder antioxidante, menor permeabilidade ao vapor de água e redução da oxidação pela ação da água e da luz em relação aos filmes controle. No entanto, as propriedades mecânicas não apresentaram melhora significativa. GARCIA-BRAND *et al.* [77] também desenvolveram uma embalagem de compósito a base de PLA e cascas de semente de cacau, por *casting*, com foco na quantidade de fibras das cascas e quantidades de lignina e celulose. Os resultados preliminares exibiram alta biocompatibilidade e forte atividade antioxidante, além da liberação de compostos bioativos.

Na pesquisa de LUBIS *et al.* [78], foi produzido um bioplástico a partir de amido de semente de jaca reforçado com celulose microcristalina extraída de casca de semente de cacau, utilizando glicerol como plastificante, por *casting*, que apresentou boa compatibilidade dos componentes e cristalinidade, com uma maior resistência a tração. Já no trabalho de KARAČA *et al.* [79], foi desenvolvido um bioplástico comestível à base de alginato, pectina e quitosana contendo extrato de cacau em pó, também processados por *casting*. A adição de proteínas resultou em liberação prolongada de polifenóis e propriedades funcionais e sensoriais aprimoradas. No entanto, embora o composto tenha apresentado boa compatibilidade, a formação de complexos proteína-polifenol causou ligeiras alterações na composição bioativa dos filmes.

Devido a todas estas características dos polifenóis e boa compatibilidade demonstrada nos trabalhos anteriores com matrizes biopoliméricas, o cacau revelou-se ser um excelente composto para produção de filmes com possíveis aplicações para embalagens de alimentos e por este motivo foi escolhido como um dos componentes de base no desenvolvimento deste trabalho.

### 3.6 Cacau

O cacau (*Theobroma cacao L.*) (Figura 3.5) é o fruto de uma pequena árvore perene de ramificação larga, com cerca de 12 a 15 m de altura, originada na América Central e do Sul, que cresce naturalmente na cabeceira da floresta da bacia amazônica [80, 81].

O cultivo do cacau foi ampliado mundialmente em regiões equatoriais da África e da Ásia. Estas regiões são localizadas cerca de 20° ao norte e ao sul do Equador e são tipicamente quentes, com alta umidade e chuvas abundantes. Para cultivar o cacau, é preciso que as temperaturas estejam na faixa entre 18 e 32°C e umidade



Figura 3.5: Cacau Forastero, originário da Floresta Amazônica (Imagen do Autor).

acima de 70%. O solo deve ser profundo, rico, bem arejado e com pH neutro [82].

Os principais tipos de cacau são o Forastero, Criollo, Trinitário e Nacional, que possuem características distintas. O cacau Forastero é considerado o verdadeiro cacau brasileiro, com sementes menores, pigmentadas e frutos amarelos e suas maiores plantações encontram-se no nordeste e norte do país. Devido a sua disponibilidade regional, foi escolhido para ser utilizado neste estudo. Esta variedade possui subvariedades e tem seu maior cultivo na África Ocidental, que representa mais de 90% da produção mundial de cacau.

O cacau da variedade Criollo é originário da América do Norte, Central e sul, de frutos grandes, com casca lisa ou rugosa vermelha ou verde. Suas sementes também são grandes com cotilédones brancos ou violeta pálido. O Trinitário é originário de Trinidad sendo um híbrido do cacau Criollo e Forastero e apresenta característica de ambos. O cacau Nacional é cultivado e originário apenas no Equador. A diferença entre as variedades de cacau estão no formato dos frutos e sementes, além do potencial de resistência a pragas e doenças [81, 83].

Os frutos do cacaueiro armazenam sementes cercadas de polpa amolecida e uma casca externa. No interior da semente existem dois tipos celulares: Células de

armazenamento formadas por gordura e proteínas e células de pigmento contendo compostos polifenólicos (flavonóides) e metilxantinas (teobromina e cafeína) [81, 84]. A composição das sementes pode ser observada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Composição das sementes de cacau (Adaptado de LOULLIS e PINAKOULAKI [83]).

Componente	Proporção (%)
Umidade	2 - 6,6
Proteína	10 - 16
Gordura	36,8 - 57
Fibras	2,1 - 15
Cinzas	2,6 - 8,7
Açucares	0,4 - 3,5
Teobromina	0,8 - 3,8
Cafeína	0,1 - 1,0
Polifenóis	4 - 18

As metilxantinas são alcalóides que fazem parte de um grupo fitoquímico derivados de purina ou bases púricas e são encontrados em pequenas quantidades nas sementes de cacau cruas. A teobromina (3,7-dimetilxantina) é o principal alcalóide do cacau, presente entre 1-4%. A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é encontrada em menores quantidades, em torno de 1% e a teofilina (1,3-dimetilxantina) apresenta apenas traços [81, 83, 85].

O teor das metilmixantinas pode variar de acordo com a origem, maturação e do processamento fermentativo. Elas são responsáveis pelo sabor amargo do cacau [81, 83, 85], suas estruturas podem ser observadas na Figura 3.6.



Figura 3.6: Estruturas químicas das metilxantinas (adaptado de FRANCO *et al.* [85]).

O consumo de alimentos com estes alcalóides têm sido bastante investigado devido alguns efeitos farmacológicos que incluem estimulação do sistema nervoso central, efeitos cardiovasculares, respiratórios e metabólicos, além de diurese. Estes efeitos podem ser positivos ou negativos, dependendo da concentração de metilxantinas consumida, mas que em geral, a sua toxicidade é muito baixa em humanos [85].

Os polifenóis são metabólitos secundários fitoquímicos responsáveis pelo crescimento e reprodução dos vegetais. Além disso, tem a função de proteger as

plantas e seus frutos contra herbívoros, microorganismos, radiação ultravioleta, oxidantes, etc. Eles são armazenados nas células pigmentares localizadas no parênquima das sementes e desempenham um papel importante nas propriedades sensoriais dos grãos e dos derivados do cacau, pois interagem com as proteínas, os polissacarídeos e os produtos da reação de Maillard, que provoca o escurecimento não enzimático dos grãos [83, 86].

As quantidades de polifenóis solúveis encontrados nas sementes de cacau *in natura* podem variar entre 12-18% e nos grãos utilizados na fabricação de chocolate entre 5-10%. Estas quantidades são variáveis dependendo do tipo de cacau e das condições de processamento das sementes. Estas concentrações ainda são superiores às encontradas em maçãs, cebolas ou vinhos [86-88].

Os principais polifenóis presentes nas sementes cacau são diferenciados em três grupos de flavonóides [80, 83, 86, 88]:

- Catequinas ou flavan-3-ols (37%): A principal catequina é a (-) – epicatequina, que representa 35% do total de compostos fenólicos contidos nas sementes de cacau. Em menor quantidade, ocorre a (+) – catequina, em torno de 2% e vestígios de (+) – galocatequina e (-) – epigalocatequina. As catequinas são responsáveis por maior parte da função antioxidante do cacau.
- Antocianinas (4%): Formadas principalmente por cianidinas (cianidina-3- $\alpha$ -L-arabinosídeo-cianidina e 3- $\beta$ -D-galactosídeo-cianidina), que são responsáveis pela pigmentação das sementes.
- Proantocianidinas (58%): Representadas por oligômeros e polímeros de (-) – epicatequina. As procianidinas mais importantes são: B1 [epicatequina-(4 $\beta$  → 8)], B2 [epicatequina-(4 $\beta$  → 8)-epicatequina], B5 [epicatequina-(4 $\beta$  → 6)-epicatequina] e C1 [epicatequina-(4 $\beta$  → 8)-epicatecina-(4 $\beta$  → 8)-epicatecina] e também possuem ação antioxidante.

A (-) – epicatequina é considerada o polifenól mais importante presente no cacau, pois além de estar presente em maior teor nas sementes, possui o maior potencial antioxidante e é intensamente estudada na prevenção de doenças, além de trazer vários benefícios à saúde. Entretanto, sua concentração reduz consideravelmente quando as sementes são processadas para fabricação dos produtos de cacau semi-acabados e seus derivados [83, 89].

### 3.6.1 Processamento Do Cacau

Para comercialização do cacau e produção de seus subprodutos, como o famoso chocolate, a principal matéria prima precisa passar por várias etapas de

processamento logo depois de colhida. Para iniciar o processamento, é preciso remover toda polpa. As sementes são submetidas à fermentação, secagem e moagem. Os grãos secos inteiros são exportados como matéria-prima para produção de líquor, manteiga de cacau e cacau em pó [81]. As principais reações químicas ocorrem durante todas as etapas de processamento das sementes e são parte importante para o desenvolvimento dos subprodutos, principalmente do chocolate [90].

### 3.6.2 Fermentação

A fermentação dos grãos do cacau é um processo que consiste em basicamente acomodar as sementes frescas em caixas de madeira em ambiente por 6 ou 7 dias e durante este período ocorre o crescimento de leveduras e bactérias naturalmente na polpa. É o processo mais importante pois define o desenvolvimento dos precursores de sabor do chocolate e permite a remoção total dos resíduos da polpa. Durante a fermentação, o conteúdo de aminoácidos livres hidrofóbicos (principalmente leucina, alanina e fenilalanina) aumentam e o conteúdo de aminoácidos ácidos diminui. Não fermentados, os grãos são extremamente amargos, rígidos e possuem baixo teor de aminoácidos. [83, 90, 91].

Após o início da fermentação, a atividade microbiana provoca a morte embrionária da semente que desencadeia uma série de processos enzimáticos e reações de diferentes compostos. Durante o processo, ocorrem variações microbianas devido às mudanças de temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio, o que promove a degradação enzimática das proteínas, resultando em aminoácidos e pepitídeos livres, e a quebra do açúcar [81, 92].

De acordo com BARIŠIĆ *et al.* [90] e BECKETT [91], a fermentação é dividida em três estágios:

- A primeira fase é a fermentação por leveduras anaeróbias que convertem o açúcar em álcool entre 24 - 36 horas em baixo teor de oxigênio e  $\text{pH} < 4$ . Após o primeiro dia, ocorre a morte embrionária da semente devido a ação do ácido acético e do álcool. Neste primeiro momento, o aumento da temperartura não é importante.
- A segunda fase é marcada pela atividade de bactérias produtoras de ácido lático. Embora elas estejam presentes desde o início da fermentação, elas só se tornam predominantes entre 48 - 96 horas. Estas bactérias convertem açúcar e alguns ácidos orgânicos em ácido lático.
- A terceira fase é dominada por bactérias produtoras de ácido acético quando a aeração aumenta. Nesta última fase ocorre uma reação exotérmica (conversão

do álcool em ácido acético), responsável pelo aumento da temperatura em torno de 50° C ou mais.

A diversidade dos microorganismos envolvidos no processo de fermentação podem variar dependendo das condições de fermentação e a região. Além disso, durante a fermentação, os polifenóis são oxidados e polimerizados, o que pode levar a uma redução importante na sua concentração (em torno de 30%). Os flavonóides também são responsáveis pela coloração acautanhada do cacau. [83, 91, 93].

### 3.6.3 Secagem

A secagem das sementes, tem como objetivo reduzir o teor de umidade e completar os processos oxidativos induzidos durante a fermentação dos grãos do cacau. Após a secagem, os grãos do cacau têm de 6 a 8% de umidade. O baixo teor de umidade impede o crescimento de fungos e torna os grãos mais estáveis para transporte e armazenamento.

Os grãos são secos ao sol, espalhados sobre esteiras de bambu ou terraços de concreto, em camadas com aproximadamente 100 milímetros. É um processo barato e eficiente, entretanto, envolve riscos de perda do cacau em caso de chuva ou umidade relativa elevada, caso não haja uma instalação de coberturas com corredícias ou esteiras adequadas para proteção das sementes.

Em algumas circunstâncias mais críticas, a secagem artificial à lenha é realizada, mas possui algumas desvantagens. Os grãos podem secar demasiadamente rápido, o que produz grãos ácidos e com amargor acentuado [81]. Quando os grãos estão secos, é realizada uma limpeza para retirar impurezas sólidas antes da torrefação [84, 94].

### 3.6.4 Torrefação

A torrefação do grão de cacau é normalmente conduzida nível industrial, para fabricação de chocolates e outros subprodutos como manteiga e líquor de cacau. É um processo de alta temperatura, geralmente realizado em temperaturas entre 120 e 140 ° C e o tempo de torrefação do cacau pode variar entre 5 e 120 minutos. A importância deste processo se deve às alterações físicas e químicas que contribuem para evaporação de ácidos voláteis que são responsáveis pela acidez e contribuem para o amargor do cacau. Os polifenóis interagem com as proteínas o que resulta na diminuição do amargor e adstringência [90, 93, 94].

Outra reação altamente complexa que ocorre durante a torrefação, é a reação de Maillard, que geralmente é responsável pela cor dourada dos alimentos cozidos ou assados. Ela acontece através da interação dos aminoácidos e açúcares redutores

que foram formados durante a fermentação do cacau e resultam em componentes ésteres, furanos, alcoóis, ácidos, etc. que são responsáveis pelo odor de chocolate e a coloração do grão torrado [83, 84].

Após a torrefação, as cascas das sementes torradas são removidas e os grãos passam por peneiramento. Todo processo é realizado através de vigorosas vibrações de esteiras e peneiras horizontais, que quebram as sementes em pequenos pedaços irregulares. A partir daí, os grãos torrados e descascados são chamados de “nibs” e outros processamentos secundários podem ser realizados, dependendo do tipo de produto final a ser obtido. As indústrias alimentícias geralmente realizam a alcalinização dos nibs, que são tratados com uma solução de potássio ou carbonato de sódio para aprimorar o sabor, a cor e aumentar a solubilidade do cacau em pó [81, 89].

Para obtenção de produtos semi-acabados, os nibs passam por moagem especial refinada que resulta em um material pastoso semi-seco, o líquor de cacau. O líquor é prensado hidraulicamente e a manteiga de cacau é obtida por extração. A massa residual da prensagem do líquor forma um disco redondo que é chamado de “bolo de cacau” ou “massa de cacau”. E finalmente, o pó de cacau comercial é obtido através da moagem fina desta massa [83, 89, 93].

### **3.7 O que ocorre com os principais componentes do cacau no processamento?**

Antes da fermentação, as sementes de cacau contém entre 2 - 4% de carboidratos de baixa massa molar (90% de açucares), de 4 - 8% de polissacarídeos como amido, pectinas e celulose. O processo fermentativo não influencia na quantidade de polissacarídeos de parede celular e os açucares são transformados em ácidos e estes são responsáveis pela redução do pH dentro da semente durante a fermentação. Durante secagem os açucares redutores reagem entre os aminoácidos livres, durante a reação de Maillard, e na torrefação os açucares sofrem degradação molecular e são desenvolvidos compostos aromáticos [90].

De acordo com NOOR-SOFFALINA *et al.* [95], as sementes de cacau com maior teor de polifenóis têm menor teor de açúcar, provavelmente devido à ligação de carboidratos a polifenóis. A ligação de hidrogênio desses componentes é criada entre grupos hidroxila e por meio de interações hidrofílicas.

As sementes de cacau não fermentadas contêm 50 – 58% de gorduras, 97 – 98% das quais são triacilgliceróis e esta quantidade pode ser variada dependendo da origem do cacau [90]. Ao fermentar as sementes, a quantidade de triaciglicerois pode ser reduzida em torno de 42% e ácidos graxos monoinsaturados podem aumentar em

torno de 25% [96]. Durante a torrefação em alta temperatura são desengordurados e os ácidos graxos e triaciglicerois são reduzidos, no que são separados como manteiga de cacau, antes da produção do cacau em pó industrializado [89, 97].

Em relação aos polifenóis, alguns autores descrevem que dependendo dos parâmetros processamento do cacau, tais como o tempo e condições de fermentação, temperatura e tempo de torrefação, o processo de alcalinização e armazenamento inadequado, pode reduzir drasticamente em até 60% da quantidade total de flavonóides contidos nos produtos industrializados [86, 88, 94].

Em um estudo de TOMAS-BARBERÁN *et al.* [98], eles conseguiram demonstrar que a partir de sementes não fermentadas e não torradas é possível obter um pó de cacau que contém oito vezes mais (-)-epicatequina e procianidina B2, do que o cacau industrializado. As sementes foram apenas secas a vácuo, moídas, tratadas com água à 95°C e parcialmente desengorduradas com éter de petróleo para quantificar os polifenóis.

O estudo de MAZOR JOLIĆ *et al.* [99] teve como objetivo monitorar as mudanças dos polifenóis totais e individuais e sua capacidade antioxidante no processamento de grãos de cacau, que variaram de acordo com o grau de processo tecnológico de torrefação e alcalinização resultando na redução das quantidades dos compostos fenólicos em 14 e 64 %.

TODOROVIC *et al.* [100] compararam a atividade antioxidante e antimicrobiana do cacau em pó processado alcalinizado e não-alcalinizado e os resultados demonstraram que os pós de cacau submetidos a alcalinização tinham conteúdo de polifenóis totais e capacidade antioxidante significativamente reduzidas, mas foi observado que sua atividade antimicrobiana foi igual para as bactérias gram-positivas ou mesmo significativamente melhorada contra bactérias gram-negativas, quando comparado ao cacau fermentado e torrado não-alcalinizado.

Isso demonstra que dependendo das condições de processamento, o cacau pode apresentar variados tipos e quantidade de compostos, mas que podem ser otimizados de acordo com o objetivo de utilização.

Como já mencionado, por todas as características expostas, o cacau foi escolhido como ativo para ser combinado com amido termoplástico no desenvolvimento de um novo biopolímero biodegradável, com baixo custo de fabricação. Com a utilização de as amostras de cacau processadas em diferentes níveis: Natural (sementes da fruta), menos processado (natural comercializado, orgânico, com menos etapas e interferentes de processamento) e ultra processado (industrializado, com mais etapas de processamento industrial e outros aditivos) e em diferentes concentrações. Afim de proporcionar a produção de um biopolímero aprimorado nas propriedades físicas, mecânicas e funções de inibição microbiana e possível aplicação para embalagem de alimentos.

# Capítulo 4

## Materiais e métodos

### 4.1 Materiais

As amostras de cacau utilizadas na produção dos filmes foram:

- Cacau Forasteiro em fruto (NAT-F) (Feira orgânica do CT/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Cacau comercial em sementes secas, minimamente processadas (NAT-C) (Planeta Cacau Distribuidora Produto Natural Eireli S/A, Salvador, BA, Brasil);
- Cacau industrializado, ultra processado em pó (IND) (Garoto S/A, Espírito Santo, ES, Brasil).

As características e o processamento de cada amostra de cacau constam na Tabela 4.1

Tabela 4.1: Tipo de processamento e proporção de gordura das sementes de cacau tratadas (\*de acordo com as informações do fabricante)

Amostra de cacau	Teor de gordura	Secagem	Refino
NAT-F	37-57%[83]	Solar	Não
NAT-C	18%*	42°C*	Não*
IND	4%*	>100°C*	Sim (Alcalinizante)*

Os reagentes utilizados para o preparo do cacau, produção da base dos filmes e as suas análises foram:

- Etanol 99,8% P.A. (Synth, São Paulo, Brasil)
- Água ultrapura destilada em Osmose Reversa no destilador OS 10 LXE (Gehaka, São Paulo, Brasil) e purificada em Milli-Q Millipore, referência tipo 1 (Merck, Estados Unidos)

- Carbonato de Sódio Anidro A.C.S (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Ácido Gálico ( $H_2O$ ) P.A.(Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Reagente de Folin-Ciocaulteu (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Acetona P.A. (Synth, São Paulo, Brasil)
- Amido de milho - 26–30% amilose e 74–70% amilopectina (AMIDEX® 3001 Ingredion - lote 0001448920 - Fabricação: 03/06/2018 – Validade: 02/06/2020, São Paulo, Brasil)
- Glicerol 99.5% (Sigma Aldrich, Estados Unidos)
- Escala de McFarland (Probac, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de sódio P.A A.C.S (Synth, São Paulo, Brasil)
- Meio de cultura "Brain Heart Infusion"(BHI) (Sigma Aldrich, Estados Unidos)
- Meio de cultura "Trypticase Soy Agar"(TSA) (Sigma Aldrich, Estados Unidos)

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1 Preparo do cacau

Os frutos de cacau Forastero (NAT-F) maduros foram cortados, a polpa com as sementes foi retirada e colocada em um recipiente de inox para realização da fermentação. As sementes foram cobertas com folha de bananeira e acondicionadas em temperatura ambiente durante cinco dias, sendo mexidas algumas vezes para oxigenação das sementes do fundo. Após o período de fermentação, as sementes foram lavadas com água destilada para remoção da polpa residual. Em seguida, foram expostas ao sol para secagem durante cinco dias (Figura 4.1).



Figura 4.1: Sementes de cacau NAT-F preparadas para fermentação (A), após secagem ao sol (B) e após moagem (C).

A temperatura ambiente variou entre 28 e 32°C e umidade relativa do ar entre 40 e 54% durante os dias de exposição. Após a secagem, os grãos foram trituradas com pilão de louça e submetidos a moagem por 1 minuto em um moedor de lâminas (Tramontina Breville, Brasil).

As sementes de cacau natural comercial (NAT-C) são vendidas inteiras, secas a 42°C e embaladas a vácuo (Informações do fabricante). Estas sementes foram trituradas com pilão e também submetidas a moagem (Figura 4.2).



Figura 4.2: Sementes de cacau NAT-C (A) e após moagem (B).

O cacau industrializado (IND) por já ser comercializado moído, não foi necessário nenhum pré tratamento, como pode ser observado na Figura 4.3 .



Figura 4.3: Cacau industrializado (IND) em pó.

Para melhorar a uniformidade dos grânulos os pós de cacau das três amostras foram peneirados em malha granulométrica (ASTM 120 mesh/0,125 mm) e acondicionados em tubos Falcon protegidos da luz com papel alumínio e armazenados em geladeira entre 2-8°C.

#### 4.2.2 Preparo do extrato de cacau

Os extratos de cada amostra de cacau foram preparados com base na metodologia de MD YUSOF *et al.* [101] e OTHMAN *et al.* [102], com adaptações. Cada amostra e quantidade de cacau em pó foi disperso em 30 ml de etanol 80% (diluído previamente com água ultra pura, v/v) e a mistura submetida a banho ultrassônico, sob 296 W de potência, durante 2 horas a 55°C no escuro. Cada mistura foi filtrada através de um papel filtro e o material retido foi desconsiderado. O filtrado total foi considerado como extrato de cacau utilizado para a síntese dos filmes. A quantidade de cada amostra de cacau utilizada para o preparo dos extratos foi de 0,32 g, 0,8 g e 1,6 g. Estas massas correspondem a, respectivamente, 2%, 5% e 10% da massa total de amido + glicerol utilizada na produção dos filmes.

#### 4.2.3 Distribuição grânulométrica (DG)

A DG das três amostras de cacau foi investigada para avaliar a eficiência do processo de ultrassom, baseada na metodologia de AFOAKWA *et al.* [103] em um Analisador de tamanho de partícula por difração laser (DLS) (Mastersizer2000,

Malvern Panalytical, Reino Unido) no laboratório de Engenharia de Polímeros (ENGEPOL/COPPE/UFRJ), no comprimento de onda de 632 nm, na faixa de leitura 20nm a 2000  $\mu\text{m}$ . Alíquotas de 1 g de cada amostra de cacau foram dispersas em 20 ml de etanol 80% e submetidas a banho de ultrassom (Branson Ultrasonic 2800, Estados Unidos), potência de 296 W, durante duas horas a 55°C. As alíquotas foram dispersas com acetona cuidadosamente na cuba do equipamento e submetidas a mistura por ultrassom (20 kHz, 50 W) durante 1 minuto antes da leitura, em temperatura ambiente. Os resultados obtidos foram expressos como valores de tamanhos de partículas abaixo de 90% da amostra (D90), abaixo de 50% da amostra (tamanho médio das partículas) (D50), abaixo de 10% da amostra (D10) e o valor do diâmetro médio de volume (D[4,3]). Os valores de distribuição de tamanho de partícula (Span), para observar a uniformidade dos tamanhos, foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$Span = \frac{D90 - D10}{D50} \quad (4.1)$$

As medidas foram realizadas das amostras antes e depois do processamento de ultrassom para comparação.

#### 4.2.4 Quantificação de polifenóis totais

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado para determinar a quantidade de polifenóis totais das três amostras de cacau, baseado no protocolo de RUZAIDI *et al.* [104], com breves adaptações. Um grama de cada amostra de cacau foi disperso em 30 ml de etanol 80% (diluído previamente com água ultra pura, v/v) e submetidos a banho de ultrassom por duas horas a 55°C. Em seguida, as soluções com os extratos foram filtradas em filtro de papel e, a partir do filtrado, o solvente foi evaporado em estufa a 60°C, protegidos da luz.

Duzentos miligramas do extrato seco de cada amostra de cacau foram ressuspensos em 2 ml de etanol 80% e submetidos a banho de ultrassom em temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, as amostras foram centrifugadas (Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemanha) a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C e 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foi misturado com 750  $\mu\text{l}$  do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) e mantido sob temperatura ambiente durante 5 minutos, coberto com papel alumínio. Na etapa seguinte, foram adicionados 750  $\mu\text{l}$  de solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 60 g/l e as amostras foram mantidas protegidas da luz, em temperatura ambiente, durante 90 minutos.

A densidade óptica das amostras foi medida (UV-1800, Shimadzu, Japão) no comprimento de onda de 725 nm em triplicata. A concentração dos polifenóis foi determinada a partir de uma curva de calibração padrão de ácido gálico em uma

faixa de concentração de 0,05 a 1 mg/ml e aferida em 5 replicatas, calculadas as médias e desvios de cada ponto e seguindo a fórmula [105]:

$$C = c \frac{V}{m} \quad (4.2)$$

Onde,

C = Quantidade de polifenois total de extrato seco expresso em mg GAE/g;

c = Concentração obtida a partir da curva calibração de ácido gálico em mg/ml;

V = Volume do extrato em ml;

m = Massa de extrato em gramas.

#### 4.2.5 Preparo dos filmes

Os filmes com a base biopolimérica foram produzidos baseados na metodologia de QUEIROZ *et al.* [106], com modificações, de acordo com o esquema da Figura 4.4.

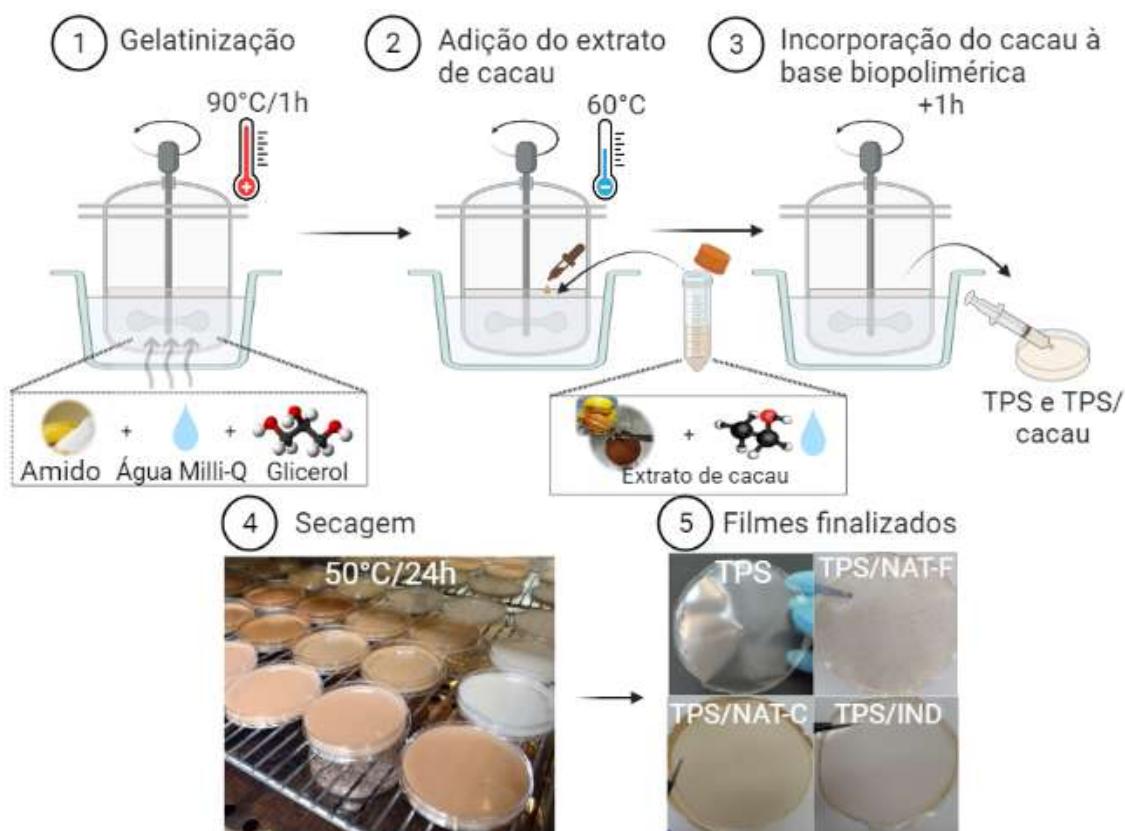


Figura 4.4: Etapas de produção dos filmes.

A solução polimérica foi mantida sob agitação constante em reator de vidro, a 420 rpm durante todo o processamento. A base polimérica inicial contendo 200 ml de água ultrapura, 10,7 g de amido de milho e 50% de glicerol foi homogeneizada durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi aquecida

entre 90-95°C em banho-maria de óleo de silicone durante 60 minutos para gelatinizar o amido e torná-lo termoplástico. Após esta etapa, uma alíquota de 30 ml foi transferida para placa de petri 90 mm x 15 mm com auxílio de uma seringa com bico de cateter, para produção do filme controle (TPS) (Figura 4.4, etapa 1).

O restante da solução polimérica gelatinizada foi arrefecida em aproximadamente 60°C para adição por gotejamento da suspensão do extrato de cacau produzida como descrito no item 4.2.2 (Figura 4.4, etapa 2). Após a adição da suspensão, a solução polimérica foi mantida sob agitação durante 60 minutos para incorporação do cacau à matriz (Figura 4.4, etapa 3).

Após este período, foram distribuídos 30 ml da solução polimérica em placas de petri 90 mm x 15 mm com auxílio de uma seringa com bico de cateter e em seguida foram acondicionadas na estufa para secagem à 50°C durante 24 horas (Figura 4.4, etapa 4). Foram realizadas ao menos três sínteses de filmes para cada amostra e concentrações de cacau com as seguinte identificações: TPS, TPS/NAT-F 2, 5 e 10%, TPS/NAT-C 2, 5 e 10% e TPS/IND 2, 5 e 10%.

#### 4.2.6 Espessura e densidade

A medida da espessura dos filmes foi realizada com auxílio de micrômetro digital universal (0-25 mm) com precisão de 0,001 mm (modelo 3580, Insize, China) considerando a média de cinco aferições em posições aleatórias para cada filme. A densidade dos filmes ( $\text{g cm}^{-3}$ ) foi determinada a partir do peso e volume do espécime [107]. O volume da amostra foi calculado a partir da área da amostra (20 mm x 20 mm) e a média das espessuras aferidas. Os resultados foram obtidos em triplicata.

#### 4.2.7 Teor de umidade

Para aferição do teor de umidade (TU) contido nos filmes, seguiu-se o método de ILYAS *et al.* [108] e foi realizado no Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF/COPPE/ UFRJ). Amostras de filme 20 x 20 mm foram pesadas antes ( $P_i$ ) e depois ( $P_f$ ) de serem secos em estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Para calcular o teor de umidade (média ± desvio padrão,  $n = 3$ ), foi utilizada a seguinte equação:

$$TU(\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (4.3)$$

#### 4.2.8 Solubilidade em Água

O potencial de solubilidade dos filmes foi aferido baseado na metodologia de ILYAS *et al.* [108] e realizado no Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF/COPPE/ UFRJ). Na etapa inicial, as amostras de filme 20 x 20 mm foram

secas em estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas e o peso da massa seca foi aferido ( $Ms_i$ ). Os mesmos filmes foram imersos em 50 ml de água destilada, durante 24 horas em temperatura ambiente, com agitação manual suave periodicamente. Após o período, as amostras de filmes foram drenadas e reacondicionados na estufa para nova secagem a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas para aferição da massa restante ( $Ms_f$ ). A solubilidade em água dos filmes foi calculada em porcentagem usando a seguinte equação:

$$Solubilidade(\%) = \frac{Ms_i - Ms_f}{Ms_i} \times 100 \quad (4.4)$$

Os testes foram feitos em triplicata e calculado a média e o desvio padrão.

#### 4.2.9 Absorção de Água

Os ensaios de absorção de água foram baseados na norma ASTM D570-98 [109] e realizados no laboratório de Instrumentação e Fotônica LIF/COPPE/UFRJ. Inicialmente, os filmes foram submetidos a secagem em estufa a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após este período, os filmes foram acondicionados em dessecador contendo sílica gel, com umidade em torno de 30% para estabilização das massas e arrefecimento das amostras à temperatura ambiente, posteriormente, pesadas ( $P_i$ ) antes do teste. Feito isto, as amostras foram imersas individualmente em 50 ml de água destilada durante 24 horas. Após este período, as amostras foram retiradas do suporte, o excesso de água foi drenado delicadamente com papel absorvente e aferiu-se novamente o peso das amostras ( $P_f$ ). A porcentagem de absorção de água foi calculada (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) através da equação abaixo:

$$Abs(\%) = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100 \quad (4.5)$$

#### 4.2.10 Ângulo de Contato

As medidas de ângulo de contato dos filmes foram obtidas pelo método de gota séssil, utilizando o goniômetro (Ramé-Hart Instrument CO., Estados Unidos) no laboratório de Superfícies poliméricas e asfálticas PEMM/ COPPE/ UFRJ. Os dados foram obtidos pelo software DROP IMAGE. 2.4.0.3, em velocidade de 5 frames por segundo, em intervalos de 10 segundos, durante o tempo total de 120 segundos, para observar a deformação da gota. Amostras de filme em triplicata, medindo 10 mm x 10 mm, inicialmente foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 30  $\pm$  2% foram utilizadas para cada análise e o foco da imagem ajustado da mesa de suporte, da borda dos filmes e o nível da amostra. Com o auxílio de uma seringa de 2 ml fixada no suporte acima amostra, uma gota de água destilada foi colocada

sobre a superfície do filme para realização das medidas. Fotografias da gota sobre a amostra foram tiradas no primeiro segundo de cada análise. Todas as medidas foram calculadas as médias e desvio padrão.

#### **4.2.11 Microscopia de Varredura por Feixe de Hélio (MEV/HIM)**

As amostras de filme com 5 mm de diâmetro foram aderidas sobre uma fita de carbono e coladas em porta amostras de alumínio, sem recobrimento. Este equipamento opera com um feixe de íons de Hélio e está equipado com um compensador de carga *flood gun*. Este tipo de MEV permite a análise de amostras isolantes sem necessidade de metalização, pois evita o acúmulo de carga elétrica na amostra. As imagens foram adquiridas no laboratório de caracterização de materiais NULAM/DIMAT no INMETRO utilizando o microscópio ORION (Nanofab, Zeiss, Alemanha). Operando a 15 kV, 2048 x 2048 pixels, WD 8 mm e Field of View de 15  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.12 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)**

Os espectros de infravermelho dos filmes, dos pós de cacau e do amido em pó foram obtidos no Laboratório de Caracterização de superfícies (PEMM/ COPPE/ UFRJ), utilizando-se espectrofotômetro de infravermelho (Nicolet 6700, Thermo Scientific, Estados Unidos) com configuração de Refletância Total Atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos em intervalo de 4000 – 650  $\text{cm}^{-1}$ , com 256 scans e 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução.

#### **4.2.13 Difração de raios-X (DRX)**

Para avaliação dos picos cristalinos dos filmes e dos pós de cacau e amido, utilizou-se o difratômetro de raios X (Miniflex II, Rigaku, Japão) no Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF/COPPE/ UFRJ). As análises das amostras com 15 mm x 15 mm, foram realizadas operando em uma radiação  $\text{CuK}\alpha$  de emissão ( $\lambda = 0,1542\text{nm}$ ) a 30 kV/15 mA à temperatura ambiente, no intervalo angular de 2 a 50°  $2\theta$  em modo de varredura contínua e velocidade 1 °/min.

#### **4.2.14 Ensaios de tração**

Os filmes foram submetidos ao ensaio mecânico de tração, baseado na norma ASTM D882-10 [110] em uma máquina de ensaio universal (AGS-X, Shimadzu, Japão) no Laboratório de Aditivos Poliméricos para Produção de Petróleo

(LADPOL/PEMM/COPPE/UFRJ), com célula de deslocamento de carga de 10 kN, operando em velocidade constante de 4 mm/min com espaço entre garras de 30 mm. Os dados foram obtidos através do software Trapezium Lite X e tratados no Origin 9.0, para determinar a tensão máxima ( $\sigma$ ), a tensão de escoamento, o módulo de Young (E) e o alongamento na ruptura ( $\epsilon$ ). Os corpos de prova foram cortados com auxílio de um bisturi a partir de um molde de acrílico, no tamanho 50 mm x 15 mm e aferidos com um micrômetro digital. Antes dos testes, as amostras foram previamente mantidas em temperatura controlada de 24°C e umidade relativa de 50% durante 48 horas, como específica a norma. Os ensaios foram realizados em quintuplicata, em temperatura de 25°C e umidade relativa de 50%.

#### 4.2.15 Ensaios Microbiológicos

A avaliação do potencial de inibição de crescimento bacteriano dos filmes, foi baseado no trabalho de CALATAYUD *et al.* [8] com algumas modificações. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF/COPPE/ UFRJ). Frações de 0,25 g de filme contendo cada amostra de cacau nas concentrações 2%, 5% e 10%, foram expostos a cultivos de bactérias gram-positiva (*S.aureus*) e gram-negativa (*E.coli*). Estes microorganismos foram escolhidos com base em trabalhos anteriores que também investigaram o potencial antimicrobiano de polifenóis [100, 111–113] além de serem de fácil manipulação e obtenção de estirpes puras.

As culturas bacterianas foram preparadas de acordo com a metodologia CLSI M07-A9 [114]. As duas espécies foram previamente isoladas em placas de TSA, incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 18 horas. A partir deste crescimento, algumas colônias foram transferidas para 10 ml de caldo BHI e incubadas por aproximadamente duas horas, para as bactérias atingirem a fase exponencial de crescimento. Após este período, foi aliquotado em 9 ml de solução salina 0,85% uma quantidade suficiente para obter uma solução bacteriana com densidade óptica (D.O.) entre 0,08 - 0,1, a 625 nm, que corresponde a Escala de McFarland 0,5. Esta solução bacteriana foi diluída serialmente até  $10^5$  cels/ml, com D.O. de 0,02 em 625 nm. Desta diluição, 100  $\mu\text{l}$  foram inoculados em tubos com 10 ml de BHI + 0,25 g de filme e foram incubados a  $35 \pm 2^\circ$  por 18 horas para leitura da absorbância.

A estimativa das células bacterianas (células/ml ( $\times 10^8$ )), foi obtida através de uma curva de calibração utilizando o padrão da escala MacFarland, tubos nº 0,5 a nº 8, em cada densidade óptica correspondente. O controle positivo consistiu em um tubo contendo inóculo bacteriano e o controle negativo apenas com meio de cultura e outro com uma aliquota de filme, sem inóculo. Todo experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram analisados estatisticamente no programa Graphpad

Prism (Version 8.02) através da análise de variância (ANOVA) com  $p<0,05$ , Teste de Tukey, com confiança de 95% e cálculo da concentração inibitória para 50% da população bacteriana ( $IC_{50}$ ).

# Capítulo 5

## Resultados e Discussões

### 5.1 Distribuição granulométrica

Os valores de DG das amostras de cacau em pó, podem ser visualizados na Figura 5.1 e apartir desta, foram descritos na Tabela 5.1.

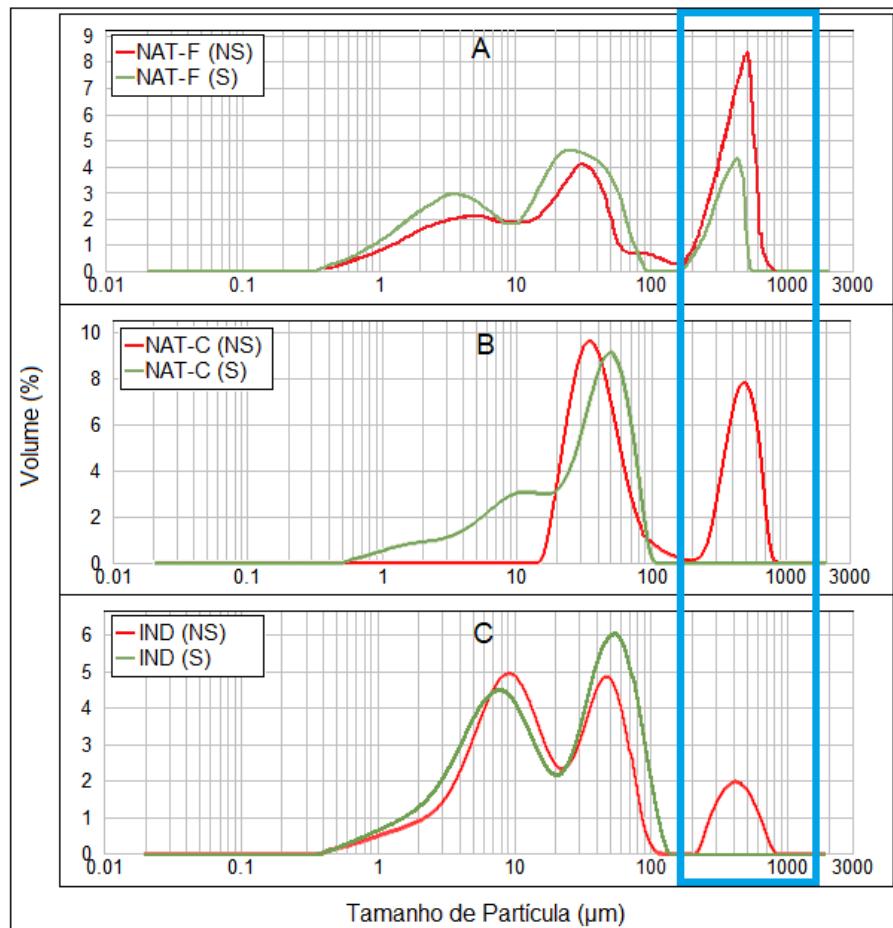


Figura 5.1: Distribuição dos tamanhos de partículas dos pós de cacau NAT-F (A), NAT-C (B) e IND (C) não sonicado (NS) e sonicado (S), com destaque para redução das partículas nas amostras de NAT-C e IND após o processamento.

Tabela 5.1: Resultados de distribuição granulométrica antes e depois do processamento de ultrassom. \*NS = Não Sonicado / S = Sonicado

Cocoa	D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )	D[4.3] ( $\mu\text{m}$ )	Span ( $\mu\text{m}$ )
NAT-F (NS)	2,58	34,54	493,76	165,39	14,22
NAT-F (S)	1,86	19,89	337,88	75,98	16,89
NAT-C (NS)	24,96	50,80	543,39	193,36	10,21
NAT-C (S)	4,13	30,61	63,88	32,00	1,95
IND (NS)	3,64	16,24	291,33	69,92	17,71
IND (S)	2,84	15,57	70,07	28,50	4,32

O processamento dos pós de cacau em banho de ultrassom foi testado com o objetivo de facilitar a liberação dos polifenóis [101], reduzir o tamanho e promover uma melhor incorporação partículas de cacau na matriz de TPS para tornar o filme o mais homogêneo possível, pois esta característica interfere diretamente nas propriedades dos filmes [63].

Observando as distribuições polimodais (Figura 5.1) o cacau NAT-F apresentou variações de redução de tamanhos de partículas, aproximadamente, de D10 em 30%, D50 em 43%, D90 em 32% e diâmetro médio em 55%. O cacau NAT-C variou D10 em 84%, D50 em 40% e D90 em 89% e diâmetro médio em 84% e os grânulos de cacau IND variaram D10 em 22%, D50 em 5% e D9 em 76% e o diâmetro médio em 60%.

Em relação as partículas menores, o cacau NAT-C apresentou o maior índice de D10 e D50, enquanto as outras duas amostras, apresentaram tamanho de partícula menores destes parâmetros após o processamento. Embora o NAT-F tenha apresentado também os menores tamanhos de partículas, ainda havia maiores tamanhos de grânulos grosseiros e não houve melhora na dispersão de partículas e a redução do D90 foi menor comparado com as outras duas amostras de cacau. Isto pode ter ocorrido devido ao cacau NAT-F não ter sido submetido a torrefação como o cacau IND ou média temperatura de secagem ( $42^\circ\text{C}$ ) como o cacau NAT-C, estes processos de secagem a partir de temperaturas médias constantes, reduziriam a adstringência e a gordura total das sementes. A maior quantidade de gordura, pode ter proporcionado maior resistência dos grânulos, além da possível formação de aglomerados. Por estes fatores, houve o aumento no índice de Span, que demonstrou comprometimento na uniformidade dos tamanhos dos grânulos [103, 115, 116].

Por outro lado, as outras amostras de cacau apresentaram melhor uniformidade, com redução do índice de Span (que quanto maior representa a heterogeneidade nos tamanhos das partículas) em 81% (NAT-C) e 76% (IND) além da consistência nos tamanhos de partículas e redução do diâmetro médio. De maneira geral, houve a redução no tamanho de todos os grânulos após o processamento por ultrassom.

## 5.2 Quantidade de polifenóis totais

Os resultados de quantificação dos polifenóis totais das amostras de cacau em pó obtidos neste estudo foram calculados a partir de uma curva de concentração de ácido gálico pela densidade óptica (D.O.) em concentrações na faixa entre 0,05 e 1,0 mg/ml que pode ser observada na Figura 5.2, com sua respectiva equação.

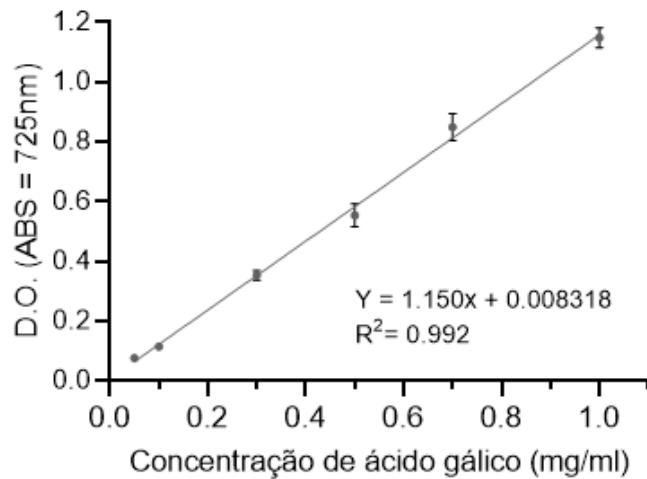


Figura 5.2: Curva de calibração de ácido gálico (mg/ml), utilizada para quantificação de polifenóis dos pós de cacau (ABS 725 nm).

As amostras de cacau extraído submetidas a reação de Folin foram medidas a absorbância a 725 nm e seus valores de concentração calculados a partir da curva e convertidos para mg (GAE)/g, a partir da fórmula descrita na equação 4.2 (item 4.2.4) e suas respectivas concentrações foram descritas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Quantidade de polifenóis totais mg (GAE)/g das três amostras de cacau de cada replicata, com suas respectivas médias e desvios padrão.

Cacau	$n_1$	$n_2$	$n_3$	<b>média <math>\pm</math> desvio</b>
NAT-F	4,39	4,64	5,24	$4,75 \pm 0,32$
NAT-C	8,63	8,80	8,90	$8,77 \pm 0,09$
IND	7,97	8,04	7,89	$7,97 \pm 0,05$

O cacau natural (NAT-F) apresentou a menor quantidade de polifenóis ( $4,75 \pm 0,32$ ) em relação ao NAT-C ( $8,77 \pm 0,09$ ) e IND ( $7,97 \pm 0,05$ ), o que foi discordante de outros trabalhos, em que geralmente o cacau menos processado contém a maior quantidade de polifenóis após a fermentação das sementes [81, 117, 118]. Este resultado pode ser devido as sementes de cacau NAT-F não terem sido desengorduradas e devido a menor área superficial pela formação de aglomerados de partículas e grânulos grandes, o que corrobora com os resultados de distribuição granulométrica do cacau NAT-F. Neste caso, o processamento por ultrassom com

etanol 80% pode não ter sido suficiente para extrair a maior quantidade de polifenóis desta amostra.

Outra possibilidade é de que a terceira fase da fermentação possa ter sido comprometida durante a ação das bactérias de ácido acético e/ou durante a secagem ao sol do cacau NAT-F. É possível que a umidade no interior das sementes não tenha sido reduzida de forma efetiva devido a temperatura do processo não ter sido constante (Assim como o NAT-C, que foi seco a temperatura constante de 42ºC). Estes fatores podem ter comprometido a reação de liberação dos polifenóis ativos e aumentado a ação enzimática da polifenol oxidase (catecol) devido a interação com oxigênio, acelerando o processo de degradação dos polifenóis totais [81, 119, 120].

Além disso, a quantificação de polifenóis pode sofrer variações ou interferências dependendo da origem, fragmentação do material, método, tempo, tipo de extração ou de solventes utilizados no processo [98, 121]. Diversos estudos utilizaram solventes como n-hexano, ácido acético, metanol, clorofórmio e acetona [99, 100, 122–124] para desengordurar as amostras ou através de reações de hidrólise em pH ácido para promover a maximização da quantidade de polifenóis extraídos [117, 120].

No entanto, para este estudo, o etanol foi escolhido como solvente [101, 102, 104], pela sua baixa toxicidade e boa compatibilidade com os polifenóis, permitindo a extração quando submetido a temperatura média. Além disto, a quantificação teve como objetivo mensurar um valor real aproximado de polifenóis contidos nas soluções hidroalcoólicas submetidas ao processamento de ultrassom e que foram incorporadas diretamente aos filmes com menor quantidade de etapas e interferentes possíveis.

### 5.3 Características físicas e aparência dos filmes

O filme de amido TPS produzido com glicerol apresentou morfologia mais uniforme e homogênea, translúcida e apresentaram maior flexibilidade em relação aos filmes produzidos com cacau. Os exemplares de filmes finalizados TPS e com 2% de cada tipo de cacau podem ser observados na Figura 5.3

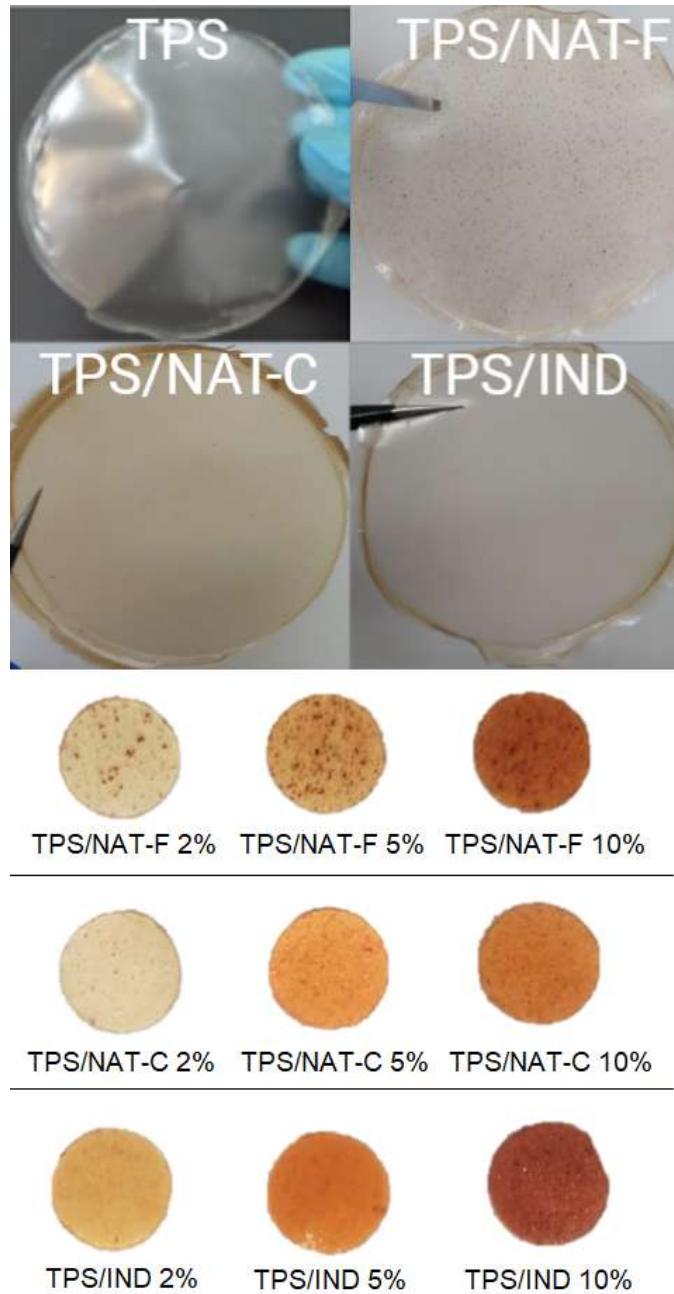


Figura 5.3: Exemplares de filmes produzidos: **TPS** (Controle) e **TPS/cacau 2%** e as amostras de todos os filmes com cacau para comparação.

Os filmes com cacau, de forma geral, apresentaram-se levemente opacos, com boa maleabilidade, resistência à manipulação e ao corte. Entretanto, foi possível observar que a solubilidade e dispersibilidade de cacau NAT-F na matriz de TPS

foi inferior, em relação as outras amostras, já que foi possível observar grânulos dispersos ao longo do filme nas 3 concentrações produzidas (2, 5 e 10 %). Isso pode ter ocorrido devido a concentração maior de gordura além de aglomeração dos grânulos menores [116], concordando com os resultados de granulometria.

Os filmes contendo cacau NAT-C apresentaram boa dispersibilidade e poucas partículas visíveis nos filmes em todas as concentrações. Os filmes produzidos com cacau IND demonstraram melhor homogeneidade em relação às outras amostras, sendo visível apenas alguns grânulos dispersos na matriz dos filmes com 10%. Uma tonalidade de marrom mais escura foi observada nos filmes com cacau NAT-C e IND, mais acentuada nos filmes contendo 10% de IND, o que pode ser devido ao processamento industrial de alcalinização [125].

## 5.4 Espessura, densidade e teor de umidade

Os resultados obtidos das espessuras dos filmes, densidade e teor de umidade estão apresentados na tabela 5.3.

Tabela 5.3: Espessura (Esp), densidade (D) e teor de umidade (U) dos filmes produzidos (média  $\pm$  desvio).

Filmes	Esp (mm)	D (g cm <sup>-3</sup> )	U(%)
TPS	0,22 $\pm$ 0,004 <sup>bc</sup>	1,54 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	23,06 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>
TPS/NAT-F2%	0,23 $\pm$ 0,004 <sup>abc</sup>	1,37 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>	19,27 $\pm$ 0,87 <sup>bc</sup>
TPS/NAT-F5%	0,23 $\pm$ 0,004 <sup>abc</sup>	1,18 $\pm$ 0,02 <sup>de</sup>	17,57 $\pm$ 0,62 <sup>cd</sup>
TPS/NAT-F10%	0,24 $\pm$ 0,004 <sup>ab</sup>	1,46 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	21,96 $\pm$ 1,44 <sup>ab</sup>
TPS/NAT-C2%	0,22 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	1,39 $\pm$ 0,02 <sup>abc</sup>	18,75 $\pm$ 0,51 <sup>c</sup>
TPS/NAT-C5%	0,23 $\pm$ 0,004 <sup>abc</sup>	1,32 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	15,47 $\pm$ 0,49 <sup>d</sup>
TPS/NAT-C10%	0,24 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	1,07 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>	14,76 $\pm$ 0,65 <sup>d</sup>
TPS/IND2%	0,23 $\pm$ 0,004 <sup>abc</sup>	1,38 $\pm$ 0,01 <sup>abc</sup>	19,12 $\pm$ 0,53 <sup>bc</sup>
TPS/IND5%	0,24 $\pm$ 0,004 <sup>ab</sup>	1,30 $\pm$ 0,01 <sup>cd</sup>	16,80 $\pm$ 0,54 <sup>cd</sup>
TPS/IND10%	0,24 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	1,07 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	15,41 $\pm$ 0,41 <sup>d</sup>

\*As letras diferentes (a-e) na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Os filmes TPS apresentaram a menor espessura, maior densidade e teor de umidade em relação aos demais filmes produzidos com cacau. Resultados semelhantes foram reportados no trabalho de SONG *et al.* [126], que produziram filmes de amido de milho e de trigo para avaliar o efeito do óleo essencial de limão e do surfactante sobre as propriedades físicas e antimicrobianas dos filmes. O filme controle demonstrou menor espessura e maior quantidade de água retida em relação aos filmes contendo óleo essencial e um dos surfactantes Span ou Tween, em todas as concentrações.

No estudo de TRAVALINI *et al.* [127] foram desenvolvidos filmes de amido de mandioca reforçados com nanofibras de lignocelulose de bagaço de mandioca e foram comparados com um TPS controle com glicerol. Nos resultados da pesquisa, os filmes TPS apresentaram maior densidade e menor espessura em relação aos outros dois tipos em todas as concentrações testadas, o que também concorda com os resultados deste estudo.

TARIQUE *et al.* [128] e colaboradores investigaram o efeito do glicerol em filmes biopoliméricos de amido de araruta e os filmes com a maior quantidade de glicerol (45%), demonstraram a maior retenção de água. Este fato ocorreu devido a ação do glicerol, que proporcionou um maior efeito de plastificação, pela presença dos grupos hidroxila que possuem maior afinidade com a água e permitiram a retenção das moléculas por de ligações de hidrogênio.

O mesmo efeito ocorre nos resultados de HAZROL *et al.* [63], que produziu filmes de amido com sorbitol e glicerol com diferentes concentrações e combinações. Os

filmes com 45% de glicerol apresentaram maior retenção de umidade.

Comparando as concentrações de cacau, foi observada dose resposta inversamente proporcional conforme aumentou-se a quantidade de cacau nos filmes, os valores de umidade e densidade foram reduzidos em relação ao controle. No entanto, os filmes TPS/NAT-F 10% demonstraram uma aproximação dos valores de TPS, em relação a umidade e densidade, isto pode ter ocorrido devido formação de aglomerados das partículas de cacau na superfície, induzida pelo não desengorduramento do cacau NAT-F durante o processamento de ultrassom, além da maior quantidade de fibras naturais, o que pode ter favorecido maior retenção de umidade.

No estudo de PETIT *et al.* [129], que investigaram o efeito de "*caking*" (que os grânulos se tornam "*pegajosos*") durante o armazenamento de pós de cacau com diferentes concentrações de gordura e fibras. Os resultados demonstraram que os pós com a maior quantidade de fibras e gordura são propensos a aglomerações e/ou precipitação da gordura permitindo condensação da água na superfície dos grânulos, dependendo da temperatura de armazenamento.

Os filmes de cacau TPS/NAT-C e TPS/IND 5 e 10% apresentaram o menores índices de umidade em relação aos demais filmes como cacau, provavelmente devido uma melhor dispersão das partículas e seus tamanho mais uniformes na matriz dos filmes, o que concorda com os resultados de granulometria. Além disso, a interação da matriz polimérica com o material particulado e a precipitação dos polifenóis do cacau para superfície devido a ação da solução hidroalcoólica utilizada para auxiliar na extração os polifenóis, podem ter contribuído para redução dos grupos carboxílicos disponíveis que interagiriam com a água, promovendo, consequentemente, a diminuição umidade retida nos filmes.

Resultados semelhantes foram observados no trabalho de RIAZ *et al.* [130], que produziram filmes de embalagens ativas de alimentos à base de quitosana/gelatina contendo nanopartículas de casca de maçã. Conforme aumentou-se a concentração de nanopartículas e polifenóis nos filmes, houve redução nos índices de retenção de água e inchamento dos filmes, além do aumento significativo da espessura.

## 5.5 MEV/HIM

As imagens de HIM revelaram que a superfície dos filmes TPS é mais homogênea, em relação aos filmes que continham cacau, devido a ação do plastificante e a eficiência da gelatinização, como pode ser visto na Figura 5.4.

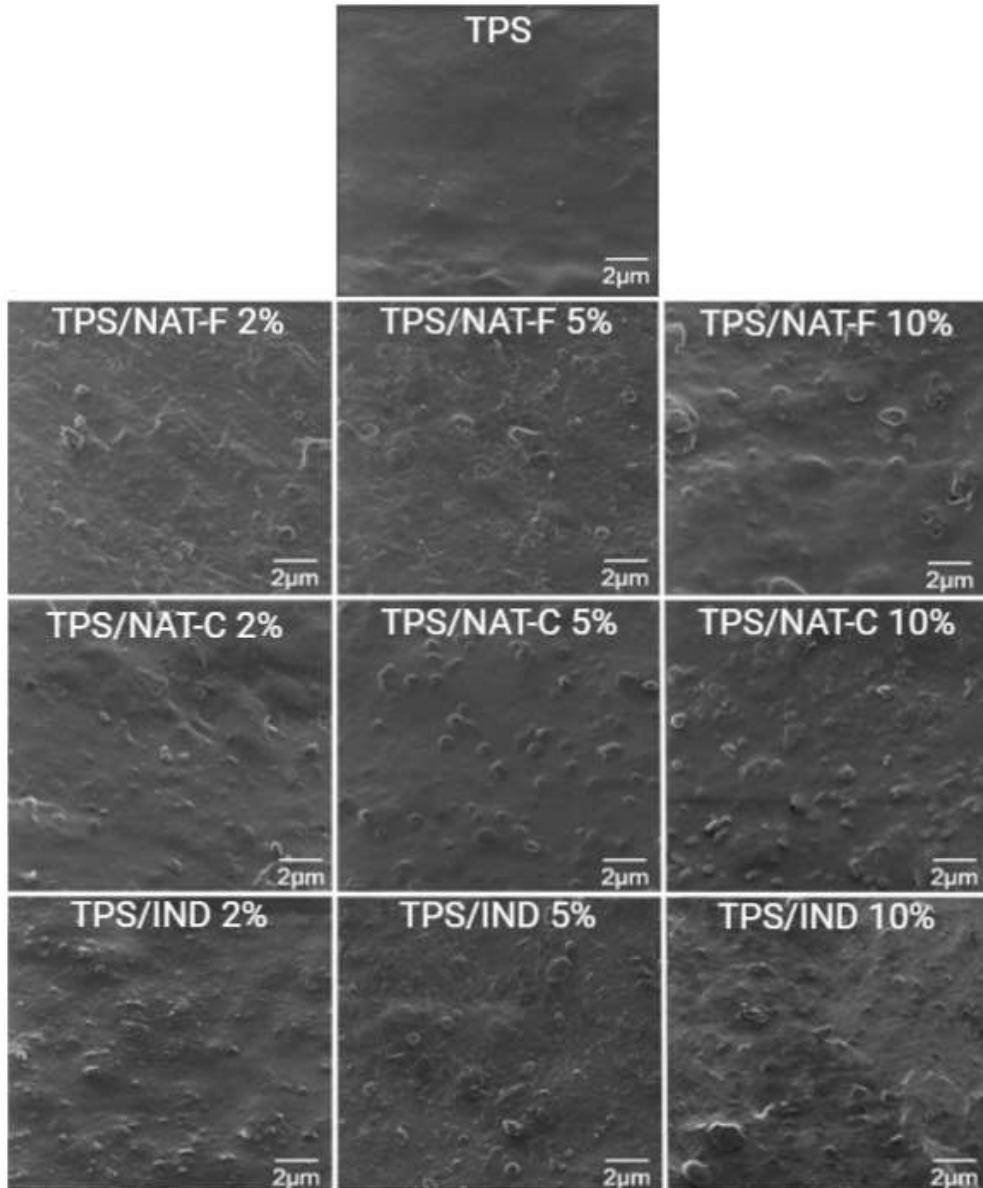


Figura 5.4: Imagens de MEV/HIM dos Filmes TPS e TPS/cacau.

Nos filmes com cacau, foi possível observar que conforme aumentou-se as concentrações, apresentavam maiores irregularidades na superfície. Como observados nos resultados de DG, os tamanhos de partícula foram variados nos filmes com NAT-F (300 nm até 5  $\mu$ m), NAT-C (490 nm - 3,5  $\mu$ m) e IND (380 nm - 3  $\mu$ m). Os filmes com 2 e 5 % de cacau das três amostras, demonstraram boa dispersibilidade das partículas. Nos filmes com cacau NAT-F e IND estas concentrações mostraram

partículas menos espaçadas na matriz em comparação aos filmes com cacau NAT-C, nas mesmas concentrações.

Além disso, os filmes com cacau NAT-C apresentaram menos partículas visíveis na superfície, no entanto, demonstraram os formatos de partícula mais regulares e arestas arredondadas em sua maioria. Isto pode ser explicado devido ao menor processamento do cacau NAT-C, pois ele possui menor índice de gordura comparado ao NAT-F e não foi tratado com alcalinizantes, como o IND. Nos trabalhos de SHITTU e LAWAL [116] e DYER [131], estes dois tipos de processamentos foram descritos por possivelmente proporcionarem um aumento de resistência dos pós de cacau menos refinado (com maior índice lipídico) e ao pó tratado com alcalinizantes ao processamento em banho de ultrassom.

Como o cacau NAT-C foi tratado apenas com uma temperatura intermediaria de secagem para redução do teor de gordura, sem adição de outros compostos, isto pode ter contribuído para os formatos mais uniformes do cacau particulado. Além disso, a ação da solução hidroalcoólica durante a incorporação do cacau à matriz biopolimérica, também pode ter favorecido a boa interação do cacau com o amido gelatinizado.

No estudo de LIU *et al.* [132], o processamento por ultrassom foi utilizado para obtenção de partículas uniformes e proporcionou a melhora nas propriedades de filmes antimicrobianos com base de PVA e polifenóis de chá preto. Nos filmes TPS/IND 10%, foi possível observar menor aglomeração, contrario ao filme TPS/NAT-C 10%, que apresentou algumas porções de aglomerados e o TPS/NAT-F 10%, no qual eram perceptíveis os fragmentos de grânulos maiores e uma maior quantidade de aglomerados de partículas menores em relação aos outros filmes.

## 5.6 DRX

Para estudar a variação de cristalinidade dos pós de cacau, amido e dos filmes, os difratogramas obtidos por DRX podem ser observados na Figura 5.5.

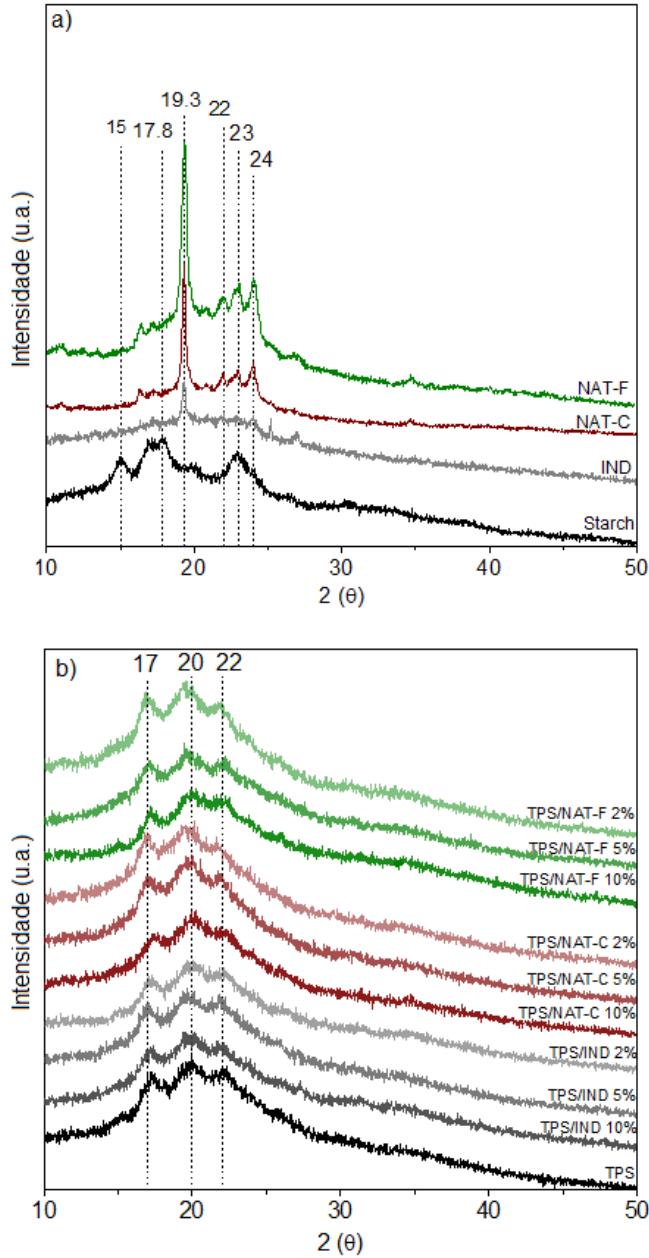


Figura 5.5: Difratogramas de raio-x de **a)** amido e as três amostras de cacau em pó; and **b)** Filmes TPS e TPS/cacau.

Nos difratogramas dos pós (Figura 5.5a), o amido (AMIDEX 3001) demonstrou o padrão de cristalinidade tipo-A, visto nos picos em  $2\theta = 15^\circ$ ,  $17.8^\circ$  (pico duplo),  $19.3^\circ$  e  $23^\circ$ , que são característicos de cereais nativos. Estes padrões também foram observados nos trabalho de MA *et al.* [69], FLOREZ *et al.* [71] e THIRÉ *et al.* [133].

As três amostras de cacau NAT-F, NAT-C e IND apresentaram padrões de

cristalinidade com variações na intensidade dos picos em  $2\theta = 19.3^\circ$ ,  $22^\circ$ ,  $23^\circ$  e  $24^\circ$ , que representam os cristais polimórficos tipo  $\beta$  do cacau e estão relacionados ao teor de gordura e temperatura de processamento dos pós. Quanto menor o processamento, maior a intensidade do pico. Logo, foi observada a maior intensidade no pó de cacau NAT-F, reduzido em NAT-C e IND, respectivamente, devido ao processamento em temperaruta média e alta, o que reduziu o teor de gordura. Estes padrões corroboram com os resultados dos trabalhos de JACQUOT *et al.* [134] e PALMIERI e HARTEL [135], que estudaram a cristalinidade com foco na quantidade de gordura no pó e na manteiga de cacau, em variadas temperaturas.

Nos difratogramas dos filmes (Figura 5.5b) foi possível observar variações não significativas, que não foram suficientes para alterar os padrões cristalinos de todas as amostras. Na gelatinização da solução aquosa de amido, que envolve aumento de temperatura e cisalhamento, os grânulos de amido se rompem e perdem a organização estrutural das cadeias de amilose e amilopectina. Quando esta solução é resfriada, inicia-se o processo de retrogradação e as cadeias desordenadas sofrem reassociação [27, 33, 71, 136]. Este processamento altera o padrão de cristalinidade dos filmes e também devido as intercalações com o plastificante ou outros compostos, como os polifenóis, adicionados aos filmes [137]. Os picos observados em  $2\theta = 17^\circ$  e  $22^\circ$ , são correspondentes a cristalinidade tipo B, padrão em filmes de amido gelatinizado, devido a recristalização principalmente da amilose, que ocorre mais rápido em relação a amilopectina [33].

O padrão do pico encontrado nos filmes em  $2\theta = 20^\circ$ , podem ser atribuídos a cristalinidade tipo  $V_H$ , que se formam após a gelatinização, durante o resfriamento da solução gelatinizada, decorrente da intercalação da amilose com lipídios (ácidos graxos ou glicerol) e outros componentes orgânicos apolares adicionados ao sistema polimérico e resultam em ligações de hidrogênio, hélices e estruturas cristalinas ou complexos amido-lipídio [27, 33, 138]. Neste caso, quando adicionado o extrato de cacau aos filmes, este pico cristalino está associado também à intercalação dos polifenóis do cacau com a água entre as cadeias de amilose. As ligações de hidrogênio formadas, podem ser impulsionadas pelas forças de London [139] e com amilopectina através das cadeias laterais por ligações de hidrogênio por forças de van der Waals [140]. Resultados semelhantes foram reportados em diversos estudos de filmes de amido com plastificante e/ou compostos fenólicos variados [63, 69, 133, 141–143].

Em relação aos filmes TPS/NAT-F, houve um deslocamento não significativo em  $2\theta = 20^\circ$  de  $0.4^\circ$ , comparado ao TPS. O mesmo ocorreu com os padrões dos filmes TPS/NAT-C 2 e 5%. Além disso, o perfil de cristalinidade apresentou um leve aumento, não significativo dos picos nos perfis de TPS-NAT-F 2% e mais sutis em TPS/NAT-C 2 e 5%, pois o padrão tipo  $V_H$  pode estar relacionado com o aumento interplanar, devido a maior periodicidade das intercalações dos polifenóis

com a água entre cadeias de amilose, juntamente com o glicerol, assim como descrito no trabalho de BORDENAVE *et al.* [139], GIUBERTI *et al.* [144] e ZHAO *et al.* [142]. Nos filmes TPS/NAT-F 10%, os padrões sofreram uma sutil deformação não significativa dos picos, o que pode ser atribuído a aglomeração das partículas de cacau [145]. Os perfis de cristalinidade dos filmes TPS/IND e TPS/NAT-C 10 %, não demonstraram alterações significativas em relação ao TPS.

## 5.7 FTIR

Os espectros de FTIR foram obtidos para investigar a miscibilidade dos componentes dos filmes e podem ser estudados na figura 5.6.

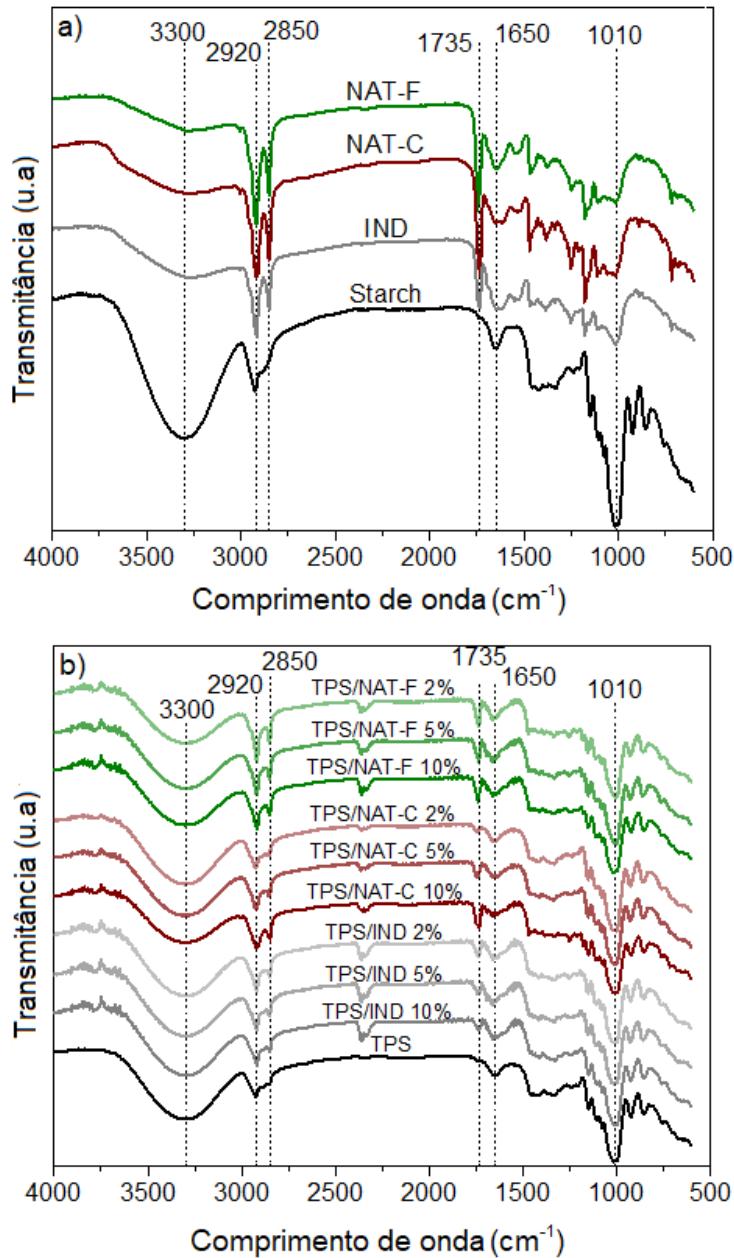


Figura 5.6: Espectros de FTIR de: a) amido e as três amostras de cacau em pó; and b) Filmes TPS e TPS/cacau.

Nos resultados foi possível observar as principais bandas relacionadas ao grupo fenol em  $3300 \text{ cm}^{-1}$  com alta intensidade referente ao estiramento de -OH, atribuídas a quantidade de água e de ligações de hidrogênio em maior intensidade no espectro do amido em pó e em todos os filmes. Estas bandas também são reportadas no trabalho

de HAZROL *et al.* [63], FLOREZ *et al.* [71], TRAVALINI *et al.* [127], ZHANG e ZHANG [146]. Em relação cacau, este banda é relatada nos trabalhos de LESSA *et al.* [147], INDIARTO *et al.* [122] e BATISTA *et al.* [148] e pode estar relacionada com a atividade antioxidante do cacau, devido a capacidade sequestrante do radical livre DPPH e a atividade de redução do íon férrico.

Nos espectros dos filmes, foi possível observar um breve difereça aumento nesta banda, referente a absorção das moléculas de água, nos filmes contendo cacau comparado ao TPS. Este resultado significa que os filmes com cacau possuem menor taxa de água retida, o que se assimila aos resultados de teor de umidade dos filmes. Estas bandas também são observadas em diversos trabalhos da literatura [63, 71, 127, 136, 149].

Nas regiões em 2920 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  apresentaram bandas correspondentes ao estiramento assimétrico e simétrico das vibrações de C-H do anel aromático, e seriam devido às vibrações de alongamento dos grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ , dos ácidos graxos ou lignina de gordura vegetal [150]. conforme há redução da gordura e das fibras devido aos processamentos do cacau e do amido, há redução da intensidade dos picos, tanto nos pós, quanto nos filmes. Estes padrões foram observados igualmente no trabalho de GOMEZ HOYOS *et al.* [151] e MENDES *et al.* [149].

Na banda de 1735  $\text{cm}^{-1}$ , presente apenas nos pós e nos filmes com cacau, são relacionadas à vibração de alongamento das ligações C = O da ligação éster do grupo carboxílico dos triglicerídeos ou pode está associada aos grupos acetil e éster devido a presença de pectina ou hemiceluloses do cacau, como descrito na pesquisa de AKINJOKUN *et al.* [152] e GOMEZ HOYOS *et al.* [151]. No trabalho do KANEKO *et al.* [153], esta banda foi atribuída a presença triacilgliceróis em diferentes pontos de barras de chocolate com alto teor de manteiga de cacau. Também foi observada no trabalho de GRILLO *et al.* [154], que mapeou os componentes de casca e sementes de cacau in natura originários do Equador. A redução da intensidade desta banda no cacau IND em pó, pode estar associada ao tratamento com alcalinizante, como foi descrito no trabalho de AKINJOKUN *et al.* [152], que isolou a celulose nanocristalinas de biomassa de vagens de cacau.

Em 1650  $\text{cm}^{-1}$ , a banda é atribuída ao estiramento da ligação dupla alongamento de carbonil (C = O) do cacau [150]. De acordo com TRAVALINI *et al.* [127], esta banda pode estar associada a quantidade de água retida nos filmes, referente aos grupos OH.

Na região de 1010  $\text{cm}^{-1}$ , podem ser atribuídos ao estiramento de C - O, do grupo C - O - C no anel anidroglucose do amido. Sua intensidade tem variações quando há interação do amido com os grupos funcionais do glicerol e foi relatado em outros trabalhos da literatura [147, 155–158]. De acordo com ZHANG *et al.* [156], esta banda também caracteriza a capacidade de inibir a retrogradação do amido.

Quanto menor a proporção, mais forte é a capacidade de inibir a retrogradação e está relacionado diretamente com a cristalinidade dos filmes, o que concorda com os resultados de DRX, em que os filmes TPS/IND demonstraram um padrão discretamente menor de cristalinidade em relação aos filmes TPS.

Foi observado a partir da análise dos filmes que não houve alterações negativas nas interações entre o amido e o cacau a partir das bandas encontradas.

## 5.8 Ensaios de tração

Os ensaios de tração consistem na aplicação de uma força uniaxial em um corpo de prova que é estendido a uma velocidade constante até a sua ruptura e testaram a resistência dos filmes com e sem reforço dos extratos de cacau.

Os corpos de prova foram preparados de acordo com a ASTM D-882 10 [110]. Como não havia molde específico para esse tipo de filme, os cortes foram feitos cuidadosamente com um bisturi a partir de um molde de vidro no tamanho de 50 mm x 15 mm, aferidas com o micrômetro digital e mantidas sob umidade controlada 48 horas antes dos ensaios, como é possível observar na Figura 5.7.



Figura 5.7: Preparo dos corpos de prova para os ensaios de tração: A) Aferição de tamanho B) Armazenamento dos corpos de prova em temperatura e umidade controladas 48 horas antes do ensaio.

Nestes testes foram aferidos a tensão máxima ( $\sigma$ ) suportada pelo material; o limite de escoamento (LE), que determina a tensão suportada no escoamento das cadeias poliméricas elasticamente. A partir deste ponto, o escoamento é irreversível; o módulo de Young ou de elasticidade (E), que consiste na razão entre a tensão e a deformação e mede a rigidez do material; e o alongamento na ruptura ( $\epsilon$ ), que é o quanto o material deformou até o rompimento. Estes resultados foram descritos na Figura 5.8 e na Tabela 5.4.

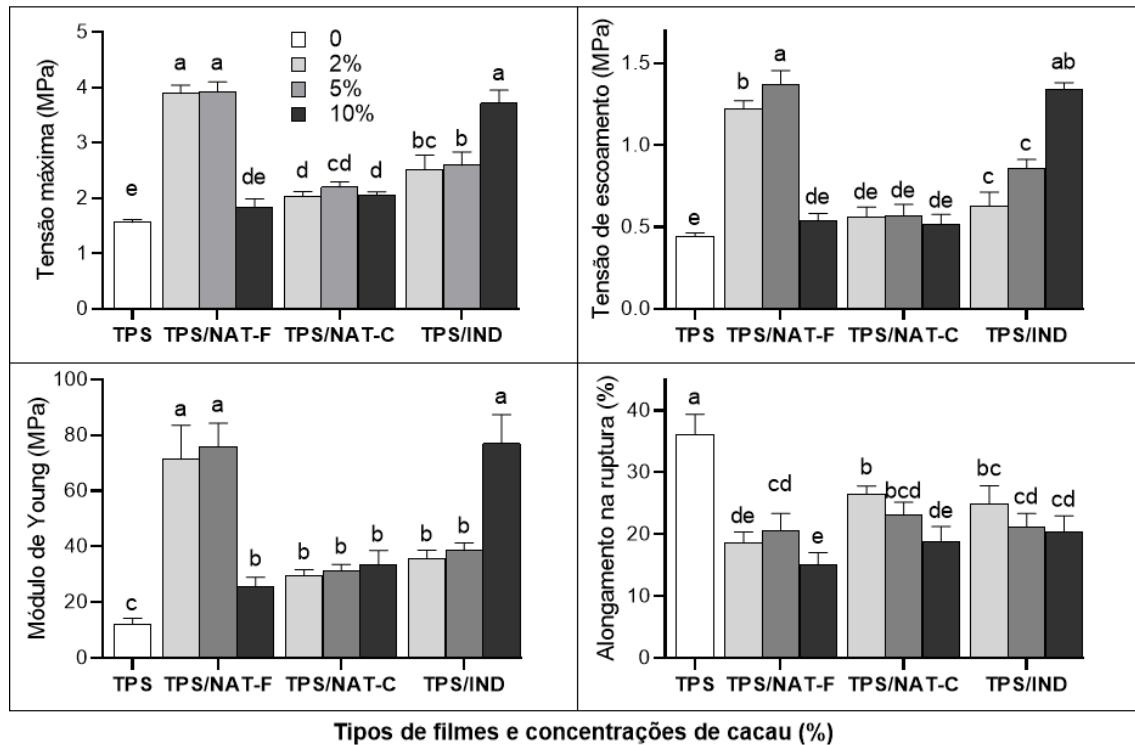


Figura 5.8: Gráficos representativos dos resultados dos ensaios mecânicos dos filmes com as letras (a-e) demonstrando a significância estatística quando são diferentes ( $p < 0,05$ ).

Com os resultados, foi possível observar que os filmes TPS/NAT-F apresentaram maior resistência à tração nas concentrações de 2 e 5% em 149 e 151% em relação ao TPS (Figura 5.9A), respectivamente, com a maior tensão média e módulo de elasticidade e menor ductilidade. É possível que a melhor dispersão das menores partículas de cacau, que possuem maior energia de superfície [159] ou, durante a incorporação da solução hidroalcoólica no amido gelatinizado, a ação do etanol como não solvente do amido possa ter proporcionado a precipitação de nanopartículas que se envolveram a superfície dos grânulos de cacau dispersos e isso tenha contribuído para este resultado.

Outra hipótese é de que a menor quantidade de polifenóis e possivelmente maior quantidade de celulose, lignina e compostos lipídicos do cacau NAT-F, tenham proporcionado maior resistência, aumentando as interações com a matriz de TPS, por ligações de hidrogênio. A quantidade de ligninocelulose encontrada em casca de sementes de cacau correspondem a aproximadamente de 30% da composição como foi observado no estudo de DAUD *et al.* [160] e é reduzida conforme o cacau é processado, o que corrobora com os espectros de FTIR e DRX deste estudo.

No trabalho de BHAT *et al.* [161], foram produzidos filmes de amido de sago com óleo de palma e pequenas quantidades de ligninina e os resultados demonstraram que mesmo com uma alta concentração de ácidos graxos, a lignina conseguiu

Tabela 5.4: Valores de tensão máxima ( $\sigma$ ), a tensão de escoamento (TE), o módulo de Young (E) e o alongamento na ruptura ( $\epsilon$ ) dos filmes TPS e TPS/cacau expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Films	$\sigma$ (MPa)	LE (MPa)	Y (MPa)	$\epsilon$ (%)
TPS	1,58 $\pm$ 0,06 <sup>e</sup>	0,44 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>	12,29 $\pm$ 1,93 <sup>c</sup>	36,17 $\pm$ 3,22 <sup>a</sup>
TPS/NAT-F 2%	3,89 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,22 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	71,41 $\pm$ 12,13 <sup>a</sup>	18,64 $\pm$ 1,74 <sup>de</sup>
TPS/NAT-F 5%	3,92 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	1,37 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	75,97 $\pm$ 8,32 <sup>a</sup>	20,67 $\pm$ 2,16 <sup>cd</sup>
TPS/NAT-F 10%	1,84 $\pm$ 0,15 <sup>de</sup>	0,54 $\pm$ 0,04 <sup>de</sup>	25,71 $\pm$ 3,29 <sup>b</sup>	15,05 $\pm$ 1,98 <sup>e</sup>
TPS/NAT-C 2%	2,03 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>	0,56 $\pm$ 0,06 <sup>de</sup>	29,71 $\pm$ 1,97 <sup>b</sup>	26,50 $\pm$ 1,31 <sup>b</sup>
TPS/NAT-C 5%	2,20 $\pm$ 0,09 <sup>cd</sup>	0,57 $\pm$ 0,07 <sup>de</sup>	31,21 $\pm$ 2,40 <sup>b</sup>	23,03 $\pm$ 2,15 <sup>bcd</sup>
TPS/NAT-C 10%	2,05 $\pm$ 0,07 <sup>d</sup>	0,51 $\pm$ 0,06 <sup>de</sup>	33,34 $\pm$ 5,25 <sup>b</sup>	18,90 $\pm$ 2,33 <sup>de</sup>
TPS/IND 2%	2,52 $\pm$ 0,26 <sup>bc</sup>	0,63 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	35,60 $\pm$ 3,08 <sup>b</sup>	24,93 $\pm$ 2,92 <sup>bc</sup>
TPS/IND 5%	2,59 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	0,86 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	38,56 $\pm$ 2,77 <sup>b</sup>	21,25 $\pm$ 2,08 <sup>cd</sup>
TPS/IND 10%	3,72 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	1,34 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	77,08 $\pm$ 10,33 <sup>a</sup>	20,41 $\pm$ 2,56 <sup>cd</sup>

\*As letras diferentes (a-e) na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

reforçar mecanicamente os filmes, aumentando a tensão para ruptura e reduzindo a deformação conforme aumentou-se a concentração. Os mesmos resultados foram observados no estudo de CALGERIS *et al.* [162], que utilizou a partir de 1% de lignina de casca de avelã em filmes de amido com liberação de fármaco e na pesquisa de TRAVALINI *et al.* [127] citado anteriormente, também apresentaram aumento da resistência mecânica em baixas concentrações de ligninocelulose.

O contrário foi observado no TPS/NAT-F 10%, que mesmo apresentando um desempenho 18% maior em relação ao TPS (Figura 5.9A), apresentou menor de resistência a tração comparado aos outros filmes com cacau, nas concentrações de 2 e 5% e com os parâmetros de tensão máxima, de escoamento e módulo elástico mais próximos do TPS, exceto pela deformação até o ponto de ruptura que se demonstrou menos dúctil em relação a todos os demais filmes. É provável que este fenômeno tenha ocorrido devido a aglomeração das partículas e a maior heterogeneidade dos grânulos.

Este resultado concorda com a pesquisa de VEIGA-SANTOS *et al.* [10], que desenvolveram embalagens biopoliméricas com ação antioxidante, com base de amido de mandioca combinados com extratos de café e cacau. A heterogeneidade observada na distribuição dos compostos nos filmes com maior concentração, proporcionou uma redução na resistência a tração e no alongamento na ruptura. Na pesquisa desenvolvida por YOON *et al.* [72], que produziram filmes de amido/PVA com adição de partículas de PMMA e no trabalho de ALI *et al.* [163], que desenvolveram filmes antimicrobianos à base de amido combinados com casca de romã, o comportamento se manteve semelhante até uma certa concentração, que quando foi muito aumentada, formaram aglomerados de partículas na superfície dos filmes, que provocou a redução da resistência mecânica dos filmes produzidos.

Os filmes TPS/NAT-C demonstraram melhores parâmetros de resistência à tração nas concentrações de 2 (31%), 5 (40%) e 10% (30%) em relação ao

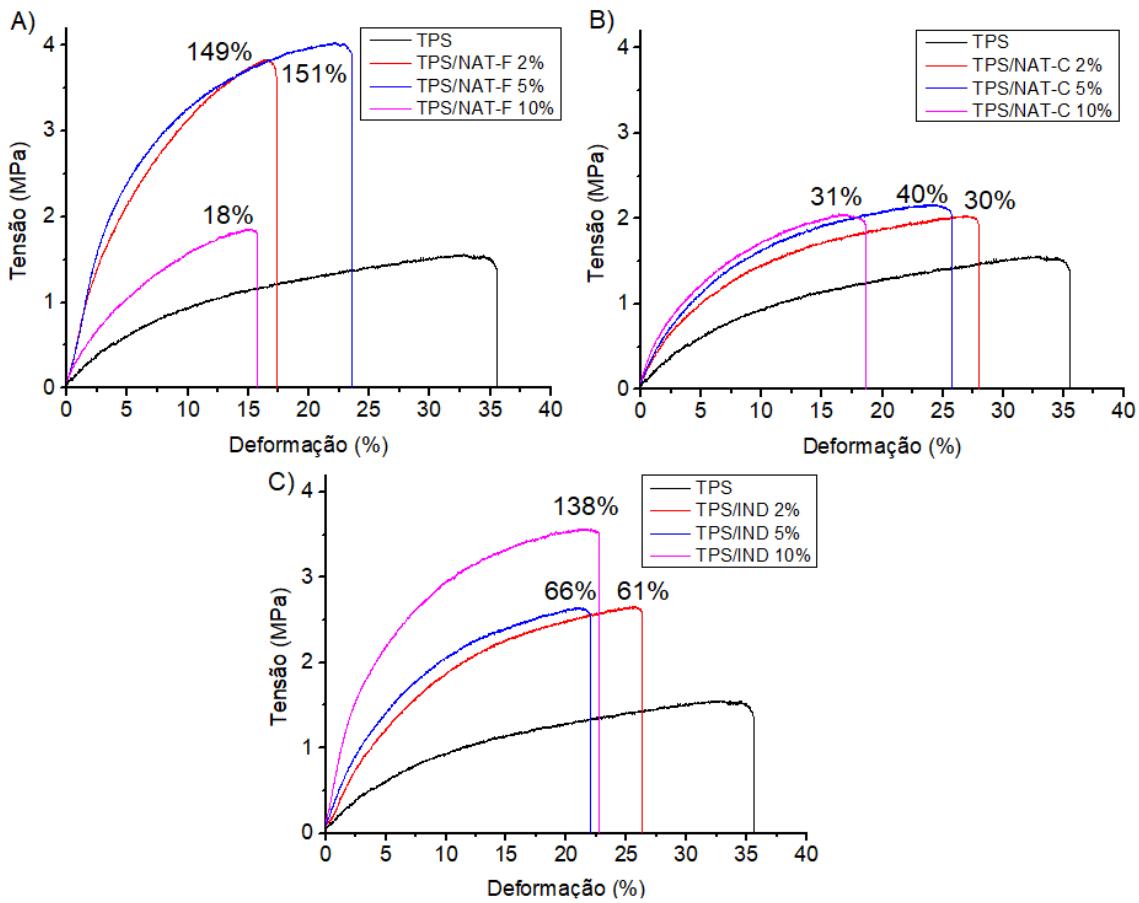


Figura 5.9: Curvas de tensão x deformação de um representante de cada tipo de filme mais próximo das médias obtidas com suas respectivas taxas de reforço em relação ao TPS. A) TPS e TPS/NAT-F; B) TPS e TPS/NAT-C; TPS e TPS/IND;

TPS (Figura 5.9B), aproximadamente. No entanto, não apresentaram diferença significativa nos resultados entre as amostras de nas três concentrações na maioria dos parâmetros testados, exceto no alongamento até a ruptura entre as amostras com 2 e 10%. Além disso, comparado aos filmes com outras amostras de cacau, apresentaram o menor desempenho nos parâmetros testados.

Os filmes TPS/IND também demonstraram melhora nas propriedades mecânicas com aumento da resistência a tração nas concentrações de 2 e 5%, em torno de 61% e 66%, respectivamente em relação ao TPS (Figura 5.9C). Já os filmes TPS/IND 10%, apresentaram melhora expressiva na resistência a tração em relação ao filme TPS, em torno de 138% (Figura 5.9C), provavelmente devido a boa dispersão das partículas de cacau com menos formação de aglomerados, assim como observado nas imagens de MEV/HIM, o que pode ter compensado a menor quantidade de outros compostos de reforço, como sugerido nos filmes TPS/NAT-F e/ou a quantidade maior de polifenóis em relação ao filme de 2 e 5%.

Além disso, pode ter havido uma possível ação do alcalinizante no reforço dos grânulos do cacau IND em pó [132] ou a ação do glicerol que pode ter auxiliado na

dispersão dos polifenóis e das partículas de cacau. No trabalho de BAO *et al.* [164], foi utilizado o glicerol para realização da extração dos polifenóis, funcionando como ótimo dispersante em média temperatura de processamento.

Embora as partículas estivessem bem dispersas e com formatos mais uniformes nos filmes TPS/NAT-C, o espaçamento entre as elas era maior do que os das partículas observadas no outros filmes, como visto no HIM e o tamanho das menores partículas de NAT-C era quase o dobro ( $4,13 \mu\text{m}$ ) do tamanho das menores partículas das outras duas amostras de cacau (NAT-F =  $1,86 \mu\text{m}$  e IND =  $2,84 \mu\text{m}$ ), de acordo com os resultados das análises granulométricas. Nos filmes TPS/IND, haviam partículas menores dispersas, como nos filmes TPS/NAT-F, mas com quantidades menores de fibras e gorduras que possivelmente contribuiriam como reforço, como foi descrito em relação aos filmes TPS/NAT-F 2 e 5%.

A hipótese mais provável para os resultados de TPS/NAT-C, é de que a quantidade maior de compostos fenólicos contribuiu para potencializar o efeito plastificante, juntamente com o glicerol e a interação entre eles, também por ligações de hidrogênio [165], além das interações dos polifenóis com a amilose, o que pode ter retardado a taxa de retrogradação nos filmes e isto concorda com os resultados de DRX.

No trabalho de PIÑEROS-HERNANDEZ *et al.* [166], onde foram produzidos filmes de amido de mandioca comestíveis com extrato de alecrim, foram observados resultados semelhantes conforme aumentou-se a concentração de polifenóis nos filmes. Além disso, o aumento da quantidade de polifenóis reduziu o enlongamento na ruptura também em relação ao TPS, como ocorreu nos resultados deste trabalho. Isto provavelmente foi devido redução da interação do glicerol com o amido, o que consequentemente reduziu a mobilidade das cadeias. Todavia, os polifenóis são estrutura sensíveis a alterações nos processos de extração, quantidade de ácidos gráxos e podem sofrer variações nas interações com amilose e amilopectina, então estas proposições não podem ser absolutas [139, 144, 167, 168].

Outra hipótese que pode ser comentada, é de que o processamento por ultrassom pode ter reduzido a resistência das partículas, o que afeta a estabilidade da rede polimérica, reduzindo a resistência a tração e o alongamento até a ruptura. Esta hipótese foi discutida nos resultados de LIU *et al.* [132], que testou tempos diferentes de processamento por ultrassom no desenvolvimento de filmes com base de PVA e polifenóis de chá e conforme aumentou-se o tempo de processamento, foi reduzida a resistência dos filmes mecanicamente.

Este fato também reforça a condição encontrada nos filmes TPS/NAT-F 2 e 5%, que apresentaram maior resistência mecânica, devido a menor quantidade de polifenóis disponíveis na matriz, como descrito nos trabalhos de GIUBERTI *et al.* [144] e BORDENAVE *et al.* [139] e discutido nos trabalhos de CHOI *et al.* [167],

JARAMILLO *et al.* [5], MELO *et al.* [169] e corrobora com os resultados de DRX e quantidade de polifenóis totais.

De maneira geral, foi possível constatar que os filmes TPS possuem menor resistência ao tracionamento, menor módulo de elasticidade e maior ductilidade em relação aos filmes reforçados com cacau, que apresentaram, em todos os exemplares, melhora considerável nas propriedades mecânicas. Este resultado concorda com trabalhos anteriores de TRAVALINI *et al.* [127], que desenvolveram filmes de amido de mandioca reforçados com ligninocelulose.

## 5.9 Absorção e solubilidade dos filmes em água

Nos testes de absorção, que envolveu o acréscimo de massa, e solubilidade, que envolveu a perda de massa, foram investigadas as interações dos filmes com a água e os resultados podem ser vistos na Figura 5.10 e na Tabela 5.5.

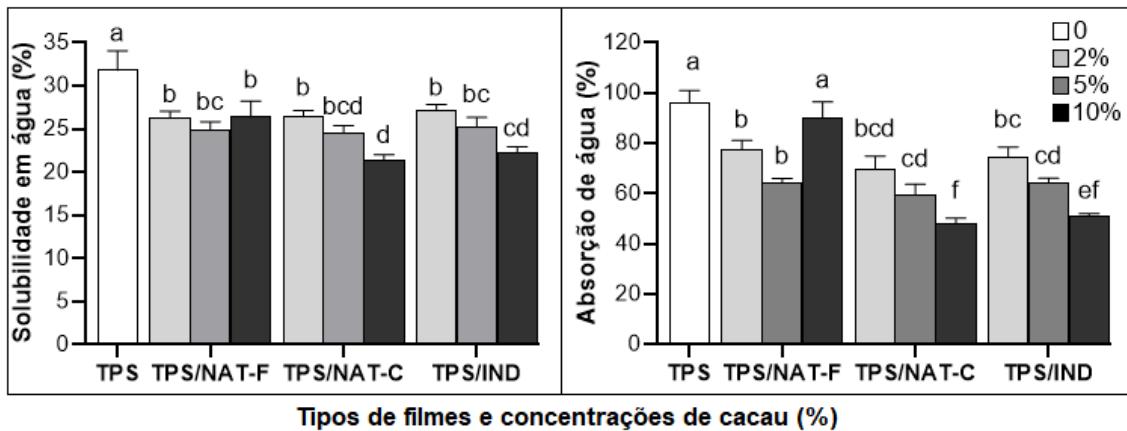


Figura 5.10: Absorção e solubilidade dos filmes em água. \*As letras diferentes (a-f) são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5.5: Resultados de absorção e solubilidade dos filmes em água de cada tipo de filme, expressos em média  $\pm$  desvio. \*As letras diferentes (a-f) na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Filmes	Solubilidade (%)	Absorção (%)
TPS	$31,81 \pm 2,28^a$	$95,98 \pm 5,07^a$
TPS/NAT-F 2%	$26,27 \pm 0,81^b$	$77,70 \pm 3,44^b$
TPS/NAT-F 5%	$24,92 \pm 0,93^{bc}$	$64,21 \pm 1,82^b$
TPS/NAT-F 10%	$26,37 \pm 1,88^b$	$90,34 \pm 6,08^a$
TPS/NAT-C 2%	$26,40 \pm 0,73^b$	$69,76 \pm 5,15^{bcd}$
TPS/NAT-C 5%	$24,59 \pm 0,83^{bcd}$	$59,76 \pm 3,99^{cd}$
TPS/NAT-C 10%	$21,39 \pm 0,65^d$	$48,02 \pm 2,21^f$
TPS/IND 2%	$27,15 \pm 0,71^b$	$74,49 \pm 4,03^{bc}$
TPS/IND 5%	$25,25 \pm 1,09^{bc}$	$64,37 \pm 1,74^{cd}$
TPS/IND 10%	$22,30 \pm 0,64^{cd}$	$51,19 \pm 0,87^{ef}$

Nos dois tipos de teste, foi possível observar que o filme TPS apresenta a maior taxa de absorção e solubilidade em relação aos outros filmes, apenas não houve redução significativa em relação ao resultado de absorção comparado ao filme TPS/NAT-F 10 %. No resultado de solubilidade, mesmo seguindo o padrão de resultado das demais análises, em que este filme se aproxima dos padrões de TPS, houve uma redução significativa, provavelmente devido a grande quantidade de materiais insolúveis dispersos nos filmes (lípidos, fibras, etc) TPS/NAT-F, nas três concentrações, assim como não houve diferença significativa comparado aos filmes TPS/NAT-F 2 e 5 %.

Os resultados foram semelhantes ao trabalho de TRAVALINI *et al.* [127], no qual foram produzidos filmes de amido de mandioca reforçados com ligninocelulose e comparados com filmes TPS. O aumento de materiais com solubilidade reduzida (fibras e gordura), contribuíram para redução dos índices de absorção e solubilidade em água, em relação ao controle. No estudo de ILYAS *et al.* [108], filme com base de amido de palmeira de açucar, reforçados com nanofibras de celulose apresentaram declínio nos parâmetros de absorção e solubilidade em água conforme aumentou-se a concentração de nanofibras, devido a redução no índice de difusão de água nos filmes em relação ao filme controle.

Nos resultados de absorção, não houve diferença significativa entre as concentrações dos filmes TPS/NAT-F de 2 e 5%, no entanto, o filme concentrado em 10% novamente apresentou o padrão semelhante aos resultados do TPS, demonstrando que possivelmente as aglomerações podem ter contribuído para aumentar as interações das moléculas de água com o amido e o glicerol e promoveram o aumento do inchamento dos filmes, o que concorda com os resultados de HIM e os trabalhos de YOON *et al.* [72] e ALI *et al.* [163], que também observaram o aumento na taxa de absorção, devido a aglomerações nas matrizes poliméricas de amido, devido sua capacidade higroscópica.

Os filmes TPS/NAT-C e TPS/IND apresentaram solubilidade decrescente conforme aumentou-se a concentração de cacau nos filmes. No entanto, não houve diferença significativa na redução do índice de solubilidade, quando foram comparados os filmes nas concentrações de 2 e 5%. A redução de solubilidade nos filmes contendo 10%, foi significativa para o TPS/NAT-C, mas não foi para o TPS/IND, comparado às concentrações mais baixas de cacau. Nos resultados de absorção de água houve uma redução decrescente significativa entre as três concentrações conforme aumentou-se a quantidade de cacau nos filmes TPS/NAT-C e TPS/IND.

A hipótese considerada, de que conforme aumenta-se a quantidade de cacau NAT-C e IND e consequentemente aumenta-se a de polifenóis, promove-se também o aumento das interações dos polifenóis do cacau com a amilose, que são estabilizadas por ligações de hidrogênio, como já foi mencionado anteriormente [139, 144, 170, 171], além disso, a solução hidroalcoólica pode ter induzido a maior precipitação destes compostos hidrofóbicos para superfície dos filmes e explicaria a redução da absorção e da solubilidade em água dos filmes TPS/NAT-C e TPS/IND, o que concorda com os resultados de quantificação de polifenóis e retenção de umidade dos filmes.

## 5.10 Ângulo de contato

Neste trabalho o ângulo de contato foi utilizado como um índice de hidrofilicidade das superfícies dos filmes produzidos. Quanto maior o ângulo, menor hidrofilicidade da superfície e vice-versa e os resultados deste estudo podem analisados na Figura 5.11 e na Tabela 5.6 .

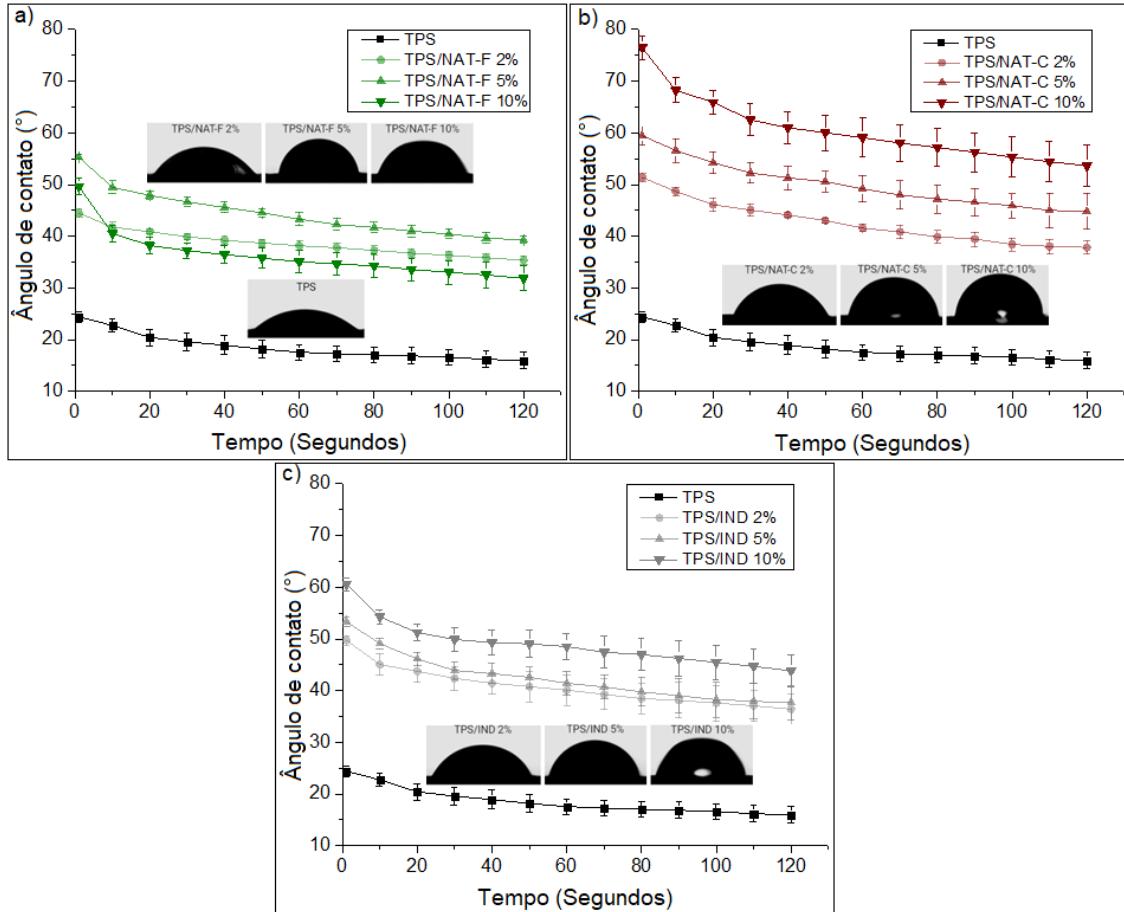


Figura 5.11: Medidas de ângulo de contato dos filmes aferidas a cada 10 segundos, durante 120 segundos e suas respectivas imagens das gotas no primeiro segundo de análise: a) TPS e TPS/NAT-F; b) TPS e TPS/NAT-C; b) TPS e TPS/IND.

Em todos os resultados obtidos, o filme TPS demonstrou maior hidrofilicidade e o menor ângulo de contato comparado aos outros filmes. A capacidade higroscópica dos filmes de amido, geralmente é aumentada quando é adicionado glicerol em alta concentração na matriz, pois ele interage e aumenta a mobilidade das cadeias de amido e estas características consequentemente aumentam a hidrofilicidade dos filmes.

Nos estudos de MALI *et al.* [33], HAZROL *et al.* [63] e BASIAK *et al.* [56], foram empregadas diferentes concentrações e tipos de plastificantes polióis (sorbitol e/ou glicerol) em bases de amido termoplástico e comparadas. Os dados obtidos nestes trabalhos demonstraram que os filmes com 50 % de glicerol, tem sua

Tabela 5.6: Valores de ângulo de contato dos filmes em 1 segundo de análise e em 120 segundos, expressos em média  $\pm$  desvio.\*As letras diferentes (a-g) na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Filmes	1 segundo (°)	120 segundos (°)
TPS	24,4 $\pm$ 1,05 <sup>g</sup>	15,96 $\pm$ 1,61 <sup>d</sup>
TPS/NAT-F 2%	44,43 $\pm$ 0,77 <sup>f</sup>	35,33 $\pm$ 0,83 <sup>c</sup>
TPS/NAT-F 5%	55,23 $\pm$ 0,45 <sup>cd</sup>	39,20 $\pm$ 0,70 <sup>bc</sup>
TPS/NAT-F 10%	49,60 $\pm$ 1,54 <sup>e</sup>	31,83 $\pm$ 2,38 <sup>c</sup>
TPS/NAT-C 2%	51,37 $\pm$ 0,81 <sup>de</sup>	37,80 $\pm$ 1,35 <sup>bc</sup>
TPS/NAT-C 5%	59,43 $\pm$ 1,75 <sup>bc</sup>	44,73 $\pm$ 3,48 <sup>b</sup>
TPS/NAT-C 10%	76,50 $\pm$ 2,26 <sup>a</sup>	53,63 $\pm$ 4,06 <sup>a</sup>
TPS/IND 2%	49,70 $\pm$ 0,92 <sup>e</sup>	36,37 $\pm$ 2,92 <sup>c</sup>
TPS/IND 5%	53,33 $\pm$ 0,97 <sup>de</sup>	37,60 $\pm$ 3,40 <sup>c</sup>
TPS/IND 10%	60,57 $\pm$ 1,26 <sup>b</sup>	43,83 $\pm$ 3,15 <sup>b</sup>

capacidade hidrofílica aumentada e isso afeta as propriedades de superfície, absorção, permeabilidade, entumecimento, mecânica, etc. e estas observações concordam com todos os resultados de TPS deste estudo.

Com a adição de cacau nos filmes, o caráter hidrofóbico da superfície foi aumentado significativamente, assim como o ângulo de contato em todas as amostras, comparada ao TPS. No caso dos filmes TPS/NAT-F 2 e 5% o aumento do ângulo demonstrou comportamento semelhante aos filmes TPS/IND nas mesmas concentrações, com uma discreta melhora significativa, conforme decorreu a absorção da gota, para os filmes com cacau IND e aumentou um pouco mais nas amostras de TPS/IND 10%. Embora a quantidade de polifenóis nos filmes TPS/NAT-F seja menor em comparação aos outros filmes, é provável que os compostos lipídicos formados pelos ácidos graxos e glicerol, possam ter contribuído para reduzir a hidrofilicidade da superfície dos filmes [172].

No entanto, embora as amostras de TPS/NAT-F 10% tenham apresentado melhora significativa em relação ao TPS, seu ângulo de contato decresceu rapidamente, aproximando-se as medidas das amostras de TPS/NAT-F 2%. Este comportamento corrobora com os resultados relatados de HIM, DRX, retenção de umidade, mecânico, absorção e solubilidade em água, provavelmente pela maior quantidade de aglomerados de partículas dispersas no filme, como já discutido anteriormente [72, 163].

Assim como nos outros ensaios de interação com a água, o filme TPS/NAT-C 2, 5 e 10% apresentaram melhor desempenho de caráter hidrofóbico, com os maiores ângulos obtidos até os 120 segundos de medida, com a menor absorção da gota em todas concentrações. Este comportamento consolida os resultados observados de teor de umidade, absorção de água e quantidade de polifenóis, pois é provável que mais uma vez a maior quantidade de polifenóis dispersos na matriz tenha contribuído para estes resultados devido às suas interações com as hélices simples de amilose. E

reforça o conceito de que a solução hidroalcóolica de extração dos polifenóis possa ter influenciado na precipitação de uma maior quantidade de polifenóis para superfície dos filmes, reduzindo a hidrofilicidade dos filmes [139, 173].

No trabalho de BARROS *et al.* [170], no qual eles estudaram as interações de taninos e polifenóis com amido, os pesquisadores citaram que estas interações são provenientes de 3-deoxiantocianinas e proantocianidinas de sorgo e foram aparentemente mais fortes com amido gelatinizado em extratos fenólicos com maior quantidade de proantocianidina (também contida no cacau). Já no trabalho de GIUBERTI *et al.* [144], eles relataram a interação do amido de mandioca com ácido ferúlico com as cadeias de amilose e o aumento das interações de outros compostos fenólicos também contidos no cacau (ácido gálico, catequina e galato de epigallocatequina) em amido gelatinizado, consequentemente aumentando a hidrofobicidade do amido.

Outra hipótese que pode ser comentada é a de que durante a etapa de adição do extrato de cacau na matriz dos filmes (Figura 5.1, etapa 3), o glicerol também possa ter contribuído para melhorar a interação e a dispersão dos polifenóis na solução biopolimérica. Tal observação se baseia nos trabalhos de BAO *et al.* [164], que utilizaram o glicerol para um processo de extração verde de polifenóis recuperados de vagens de sementes de Lótus em temperaturas que variaram entre 40 e 70°C com alta eficiência e na pesquisa de HUAMÁN-CASTILLA *et al.* [165], que investigaram o uso do glicerol como co-solvente alternativo na extração de polifenóis a quente e observaram que os grupos carbonila e hidroxila na estrutura química dos polifenóis formaram ligações de hidrogênio com os grupos funcionais do glicerol, aumentando os complexos hidrofóbicos.

Observou-se também relação dose resposta conforme aumentou-se a concentração de cacau nos filmes contendo NAT-C e IND nas três concentrações e nos filmes TPS/NAT-F com 2 e 5%. Ou seja, embora os polifenóis não tenham sido identificados e quantificados individualmente no presente trabalho, as pesquisas citadas sugerem que é possível que, além das ligações com as cadeias de amilose, os polifenóis possam ter sido favorecidos também pelo glicerol e pelo meio hidroalcoólico, aumentando a sua dispersibilidade na matriz dos filmes e contribuído para as características menos hidrofílicas dos filmes com cacau. Estes resultados também corroboram com os ensaios mecânicos dos filmes TPS/NAT-C, que apresentaram menor resistência a tração comparados aos outros filmes com cacau, devido a maior quantidade de polifenóis dispersos e o efeito de plastificação em conjunto com o glicerol.

## 5.11 Teste antimicrobiano

Os testes antimicrobianos, foram realizados *in vitro* e consistiram na exposição de aliquotas dos filmes TPS e dos filmes reforçados com as três amostras de cacau em tubos de meios de culturas enriquecidos, contendo uma representante bacteriana dos grupos gram positivo (*S.aureus*) ou gram negativo (*E.coli*) nas diferentes testagens.

Em todas as análises, os controles positivos de cada bactéria apresentaram absorbância em torno de 1,0, o que demonstrou crescimento satisfatório, quando não havia nenhum interferente no meio de cultura. Os controles negativos, consistiram no meio de cultura puro e o meio + uma amostra de filme, sem a presença de bactérias. Estes apresentaram D.O. 0,002 abs e o tubo apenas com o meio de cultura foi utilizado para calibrar o “branco” do espectrofotômetro.

Para quantificar o número de células aproximado, a curva de calibração foi baseada na referência da escala de MacFarland a partir da D.O., observada na Figura 5.12.

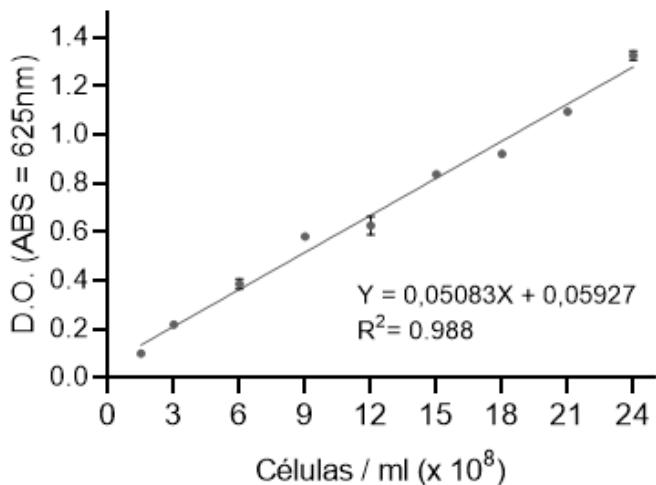


Figura 5.12: Curva de calibração da quantidade de células bacterianas pela densidade optica (D.O.) e sua respectiva equação.

Nos ensaios contra *S.aureus* e *E.coli*, a quantidade de células bacterianas obtidas foram descritas na Tabela 5.7 para cada tipo de cacau e suas respectivas concentrações.

Na testagem dos filmes contra *S.aureus* foi possível observar nos resultados da Figura 5.13 e na Tabela 5.7, que não houve inibição de crescimento bacteriano significativa, nos testes dos filmes TPS/NAT-F, quando comparada as três concentrações. O mesmo ocorreu com as amostras de filmes TPS/NAT-C 2% que não apresentaram redução de crescimento bacteriano significativa em relação ao TPS. Já as amostras de TPS/IND 2 %, houve uma inibição significativa de crescimento bacteriano em relação ao TPS.

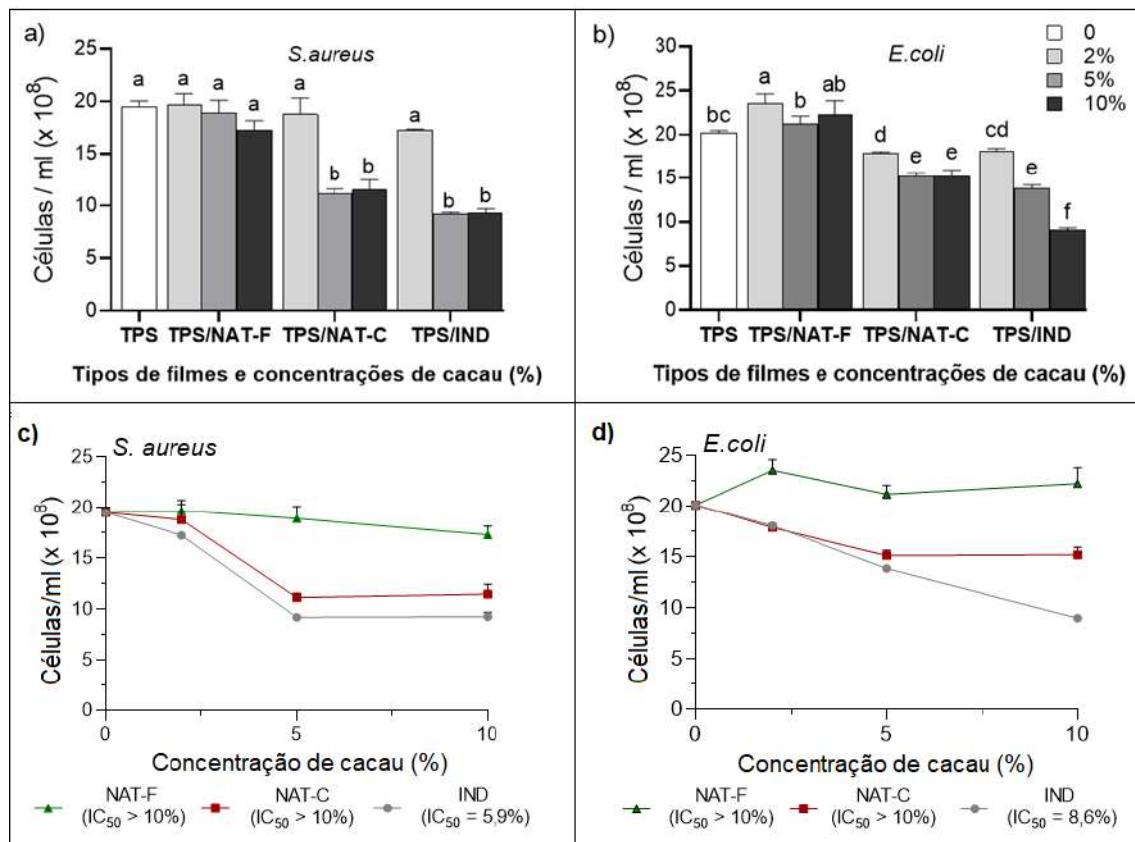


Figura 5.13: Potencial de inibição microbiana dos filmes contra *S. aureus* (a) e *E. coli* (b) e metade da concentração inibitória máxima ( $IC_{50}$ ) dos filmes contra *S. aureus* (c) e *E. coli* (d), respectivamente. \*As letras diferentes (a-f) representam a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

Quando aumentada a concentração de TPS/NAT-C 2% para 5% e de TPS/NAT-C 2% para 10%, constatou-se diferença significativa na inibição de crescimento de *S. aureus*. O mesmo ocorreu com os filmes TPS/IND, pois quando aumentada a concentração de TPS/IND 2% para 5% e de TPS/IND 2% para 10%, também apresentaram diferença significativa entre as médias de crescimento. No entanto, na comparação das amostras com 5% e 10%, não houve diferença significativa na inibição tanto de TPS/NAT-C quanto de TPS/IND. Comparados ao TPS, os filmes tiveram a capacidade inibitória aprimorada contra *S. aureus* em 3,8% (TPS/NAT-C 2%), 42,7% (TPS/NAT-C 5%), 41,0% (TPS/NAT-C 10%) e 11,5% (TPS/IND 2%), 56,6% (TPS/IND 5%), 56,2% (TPS/IND 10%).

Nos ensaios contra *E. coli*, nos resultados apresentados na Figura 5.13b e na Tabela 5.7, foi possível visualizar que o potencial de inibição dos filmes TPS/NAT-F foi semelhante aos resultados de *S. aureus*, nos quais não foi demonstrado inibição de crescimento significativo ( $p < 0,05$ ) nas três concentrações. Houve um ligeiro aumento na concentração em relação ao filme controle (TPS), isto pode ter ocorrido, devido a baixa quantidade polifenóis dispersos na matriz não ter sido suficiente

Tabela 5.7: Estimativa de células de *S. aureus* e *E. coli* nos ensaios contra o filme controle (TPS) e os filmes TPS/cacau, expressos em média  $\pm$  desvio.

Filmes	<i>S. aureus</i> (Céls / ml (x 10 <sup>8</sup> ))	<i>E. coli</i> (Céls / ml (x 10 <sup>8</sup> ))
TPS	19,53 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	20,18 $\pm$ 0,29 <sup>bc</sup>
TPS/NAT-F 2%	19,71 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	23,59 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>
TPS/NAT-F 5%	18,92 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	21,24 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>
TPS/NAT-F 10%	17,32 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	22,27 $\pm$ 1,60 <sup>ab</sup>
TPS/NAT-C 2%	18,80 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	17,91 $\pm$ 0,14 <sup>d</sup>
TPS/NAT-C 5%	11,17 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>	15,16 $\pm$ 0,50 <sup>e</sup>
TPS/NAT-C 10%	11,50 $\pm$ 0,99 <sup>b</sup>	15,25 $\pm$ 0,72 <sup>e</sup>
TPS/IND 2%	17,27 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	18,09 $\pm$ 0,32 <sup>cd</sup>
TPS/IND 5%	9,24 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	13,89 $\pm$ 0,34 <sup>e</sup>
TPS/IND 10%	9,31 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	9,03 $\pm$ 0,30 <sup>f</sup>

\*As letras diferentes (a-f) na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

para perturbar o crescimento bacteriano, mesmo aumentando-se a concentração para 10 %. Outra observação, no trabalho de PARDO-FIGUEREZ *et al.* [174], relatou-se que a formação de aglomerados de partículas, podem reduzir o potencial antimicrobiano, o que pode ter contribuído também para este resultado. Além disso talvez a maior disponibilidade de material orgânico em NAT-F (carboidratos, ácidos gráxos, celulose, etc...) possa ter contribuído para o desenvolvimento da *E. coli*, o que não ocorreu com a *S. aureus*, que se demonstrou discretamente mais sensível, mas que ainda não foi suficiente para apresentar um potencial de inibição de crescimento, satisfatório contra as duas bactérias.

Os filmes TPS/NAT-C apresentaram uma inibição significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação das concentrações de 2 e 5%, e de TPS/NAT-C 2% e 10%. Entretanto, o padrão entre os grupos entre TPS/NAT-C 5% e 10% não demonstraram diferença de inibição de *E. coli*. Os filmes TPS/IND apresentaram o potencial de inibição significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparadas as concentrações 2 e 5%, entre TPS/IND 2% e 10% e entre TPS/IND 5% e 10%. Quando comparados ao TPS, os filmes tiveram a capacidade inibitória aprimorada contra *E. coli* em 11,2% (TPS/NAT-C 2%), 24,8% (TPS/NAT-C 5%), 24,4% (TPS/NAT-C 10%) e 10,3% (TPS/IND 2%), 31,1% (TPS/IND 5%), 55,2% (TPS/IND 10%). Embora os filmes TPS/NAT-C possam ter a maior quantidade de polifenóis disponíveis e apresentarem potencial de inibição significativo contra os dois microorganismos, demonstraram uma certa saturação na inibição quando aumentada as concentrações entre 5 e 10%, não havendo diferença contra as duas bactérias testadas. Os filmes TPS/IND tiveram o melhor desempenho de inibição microbiana.

Foi possível observar nos resultados de IC<sub>50</sub> (Figura 5.13 c e d), a concentração que reduz 50% do número de células bacterianas não conseguiu ser calculada dos filmes TPS/NAT-F e TPS/NAT-C contra *S. aureus* e *E. coli* com as concentrações testadas, mantendo o índice IC<sub>50</sub> > 10%. Para conseguir ser calculado, seria necessário testar maiores concentrações de cacau NAT-C nos filmes para obtenção de

um valor específico. Já os filmes TPS/IND, apresentaram o índice contra *S. aureus* de 5,9% e de 8,6% contra *E. coli*, demonstrando-se com melhor desempenho de inibição de crescimento bacteriano nas concentrações testadas, contra as duas bactérias.

Uma explicação possível para estes resultados é de que o processamento de alcalinização do cacau IND, possa ter potencializado a ação antimicrobiana dos filmes TPS/IND, devido a possível formação de novos compostos bioativos voláteis durante a alcalinização, que possuem antimicrobianos proeminentes, mas com baixa atividade antioxidante [175]. Resultados semelhantes foram relatados por TODOROVIC *et al.* [100], que comparou a ação antioxidante e antimicrobiana de pós de cacau fermentados natural e alcalinizado, e que embora o natural tenha apresentado a maior quantidade de polifenóis disponíveis, o alcalinizado apresentou melhor desempenho antimicrobiano contra diversas bactérias gram positivas e negativas, com maior sensibilidade de *E. coli*, devido a presença destes compostos no cacau alcalinizado.

No estudo de LI *et al.* [175], foram detectados mais de 80 compostos voláteis na massa de cacau após o processo de alcalinização. Alguns deles foram estudados por suas características antimicrobianas. Além disto, devido ao processo de torrefação e alcalinização, os polifenóis tenderiam a melhorar suas interações com polissacarídeos, o que possivelmente ocorreu durante as ligações entre as cadeias de amilose e amilopectina nos filmes TPS/IND e em menor volume nos filmes TPS/NAT-C.

# Capítulo 6

## Conclusões

Neste trabalho foram sintetizados com êxito os biopolímeros com base e amido termoplástico reforçados com cacau em pó;

Os filmes produzidos com cacau NAT-F, quando comparado aos filmes reforçados com outras amostras de cacau nas concentrações de 2 e 5% , demonstraram melhor resistência mecânica. No entanto, os filmes contendo 10% de cacau NAT-F, sofreram interferências nas suas propriedades mecânicas, de superfície e de interação com água, devido aglomeração das partículas de cacau. Além disso, os filmes produzidos com cacau NAT-F nas três concentrações, não apresentaram potencial de inibição de crescimento bacteriano devido ao não desengorduramento das amostras de pó e consequentemente a ineficácia da extração de polifenóis. Mas interação destes compostos com o amido gelatinizado com glicerol, possivelmente favoreceram as propriedades mecânicas.

Os filmes com cacau NAT-C demonstraram o melhor desempenho, comparado aos demais filmes TPS e outras amostras de cacau no que diz respeito as propriedades físicas, de interação com a água, formato e dispersão de partículas e maior quantidade de polifenóis extraídos. Por outro lado, nas propriedades mecânicas, demonstraram a menor taxa de melhora em relação ao TPS, comparado aos filmes contendo as outras duas amostras de cacau. Também apresentaram um potencial de inibição de crescimento bacteriano, apesar disso, houve uma saturação da inibição a partir da concentração de 5% contra as duas bactérias testadas. Estes resultados foram influenciados pela condição do pó processado em temperatura média de secagem e a não interferência de outros compostos, como alcalinizantes.

Os filmes produzidos com cacau IND demonstraram ótimo desempenho, comparado aos demais filmes com e sem cacau em todos os testes. Os filmes TPS/IND 10%, demonstraram melhor desempenho quando considerados os resultados das propriedades mecânicas, provavelmente devido a melhor dispersão de partículas no filme e os resultados de inibição antimicrobiana, pois mesmo havendo uma saturação de inibição contra *S.aureus*, o índice de IC50, conseguiu ser calculado

contra as duas bactérias com as concentrações testadas, diferente dos outros filmes com outras amostras de cacau, que o índice não conseguiu ser calculado. Estes resultados foram alcançados provavelmente devido ao refino industrial de moagem e alcalinização que aumentou o potencial antimicrobiano, além da possível resistência do material particulado, mesmo com menos polifenóis extraídos em relação ao cacau NAT-C.

Em conclusão, observou-se que os filmes contendo cacau, demonstraram melhor desempenho em relação ao TPS em todos os parâmetros testados, com ótima compatibilidade. Em comparação das concentrações, na maioria dos casos houve influência positiva do aumento da quantidade de cacau nos filmes. Os filmes concentrados em 10% (exceto os filmes com cacau NAT-F) apresentaram melhores resultados na maioria dos parâmetros analisados, com destaque maior para os filmes TPS/IND 10%. No entanto, não foi possível identificar os compostos alcalinizantes do processo industrial, que é possível que eles tenham uma grande influência nas propriedades dos filmes.

Assim, considerando a proposta natural no desenvolvimento dos biopolímeros e a não dependência de um processamento industrializado do cacau para o preparo dos filmes, o cacau NAT-C apresentou o melhor desempenho comparados às outras amostras. No entanto, os filmes com este cacau, precisam ser aprimorados nas propriedades mecânicas.

# Capítulo 7

## Sugestões para trabalhos futuros

- Aprimorar o processamento por ultrassom, para extração verde com outros possíveis solventes de baixa toxicidade e compatíveis com a matriz de TPS, para melhor aproveitamento e desengorduramento das sementes, minimizando a perda dos polifenóis;
- Testar diferentes quantidades de glicerol e de cacau na fabricação dos filmes, para investigar com mais detalhes a interação glicerol-cacau e glicerol-amido e o quanto ele interfere nas propriedades dos filmes;
- Realizar identificação dos polifenóis e suas quantidades por HPLC e investigar a ação antioxidante dos pós e dos filmes, para detalhar e obter melhor compreensão das interações dos polifenóis com a matriz de amido;
- Estudar o envelhecimento dos filmes para determinação da validade e aprofundar os detalhes das interações dos polifenóis com a amilopectina e o quanto isso influenciaria na cristalinidade durante o armazenamento;
- Investigar o processo de biodegradação e permeabilidade de vapor dos filmes, para compreender o quanto a redução da hidrofilicidade da superfície dos filmes interfere nestas propriedades;
- Testar microbiologicamente os filmes contra outros microorganismos (bactérias, fungos e/ou leveduras).

# Referências Bibliográficas

- [1] MACHADO, B. A. S., NUNES, I. L., PEREIRA, F. V., et al. “Desenvolvimento e avaliação da eficácia de filmes biodegradáveis de amido de mandioca com nanocelulose como reforço e com extrato de erva-mate como aditivo antioxidante”, *Ciência Rural*, v. 42, pp. 2085–2091, 2012.
- [2] FAMÁ, L., ROJO, P. G., BERNAL, C., et al. “Biodegradable starch based nanocomposites with low water vapor permeability and high storage modulus”, *Carbohydrate polymers*, v. 87, n. 3, pp. 1989–1993, 2012.
- [3] KIM, S., BAEK, S.-K., GO, E., et al. “Application of adzuki bean starch in antioxidant films containing cocoa nibs extract”, *Polymers*, v. 10, n. 11, pp. 1210, 2018.
- [4] NIAOUNAKIS, M. *Biopolymers: applications and trends*. William Andrew, 2015.
- [5] JARAMILLO, C. M., GUTIÉRREZ, T. J., GOYANES, S., et al. “Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films”, *Carbohydrate polymers*, v. 151, pp. 150–159, 2016.
- [6] BELLINI, M. Z., OLIVA-NETO, P. D., MORAES, Â. M. “Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 58, pp. 289–299, 2015.
- [7] ADILAH, A. N., JAMILAH, B., NORANIZAN, M., et al. “Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging”, *Food packaging and shelf life*, v. 16, pp. 1–7, 2018.
- [8] CALATAYUD, M., LÓPEZ-DE DICASTILLO, C., LÓPEZ-CARBALLO, G., et al. “Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications”, *Food Chemistry*, v. 139, n. 1-4, pp. 51–58, 2013.

- [9] TRAN, T. N., ATHANASSIOU, A., BASIT, A., et al. “Starch-based bio-elastomers functionalized with red beetroot natural antioxidant”, *Food Chemistry*, v. 216, pp. 324–333, 2017.
- [10] VEIGA-SANTOS, P., SILVA, L. T., DE SOUZA, C. O., et al. “Coffee-cocoa additives for bio-based antioxidant packaging”, *Food Packaging and Shelf Life*, v. 18, pp. 37–41, 2018.
- [11] DICK, M., COSTA, T. M. H., GOMAA, A., et al. “Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties”, *Carbohydrate Polymers*, v. 130, pp. 198–205, 2015.
- [12] GUTIÉRREZ, T. J., MORALES, N. J., PÉREZ, E., et al. “Physico-chemical properties of edible films derived from native and phosphated cush-cush yam and cassava starches”, *Food Packaging and Shelf Life*, v. 3, pp. 1–8, 2015.
- [13] SUN, Q., GONG, M., LI, Y., et al. “Effect of retrogradation time on preparation and characterization of proso millet starch nanoparticles”, *Carbohydrate polymers*, v. 111, pp. 133–138, 2014.
- [14] FERRO, D. M. *Filmes biodegradáveis de amido e polietileno: desenvolvimento, caracterização e aplicação no acondicionamento de leite pasteurizado*. M.Sc. dissertação, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 2015.
- [15] DAVOODI, M., KAVOOSI, G., SHAKERI, R. “Preparation and characterization of potato starch-thymol dispersion and film as potential antioxidant and antibacterial materials”, *International journal of biological macromolecules*, v. 104, pp. 173–179, 2017.
- [16] KATZ, D. L., DOUGHTY, K., ALI, A. “Cocoa and chocolate in human health and disease”, *Antioxidants & redox signaling*, v. 15, n. 10, pp. 2779–2811, 2011.
- [17] SANTOS, R., OLIVEIRA, D., SODRÉ, G., et al. “Antimicrobial activity of fermented Theobroma cacao pod husk extract”, *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 3, pp. 7725–7735, 2014.
- [18] MARTÍN, M. Á., RAMOS, S. “Health beneficial effects of cocoa phenolic compounds: A mini-review”, *Current Opinion in Food Science*, v. 14, pp. 20–25, 2017.

- [19] PRAMEELA, K., MOHAN, C. M., RAMAKRISHNA, C. “Biopolymers for food design: consumer-friendly natural ingredients”. In: *Biopolymers for food design*, Elsevier, pp. 1–32, 2018.
- [20] SHANKAR, S., RHIM, J.-W. “Bionanocomposite films for food packaging applications”, *Reference module in food science*, v. 1, pp. 1–10, 2018.
- [21] YOUNES, B. “Classification, characterization, and the production processes of biopolymers used in the textiles industry”, *The journal of the textile institute*, v. 108, n. 5, pp. 674–682, 2017.
- [22] MTIBE, A., MOTLOUNG, M. P., BANDYOPADHYAY, J., et al. “Synthetic biopolymers and their composites: Advantages and limitations—An overview”, *Macromolecular Rapid Communications*, p. 2100130, 2021.
- [23] ZHONG, Y., GODWIN, P., JIN, Y., et al. “Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review”, *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, v. 3, n. 1, pp. 27–35, 2020.
- [24] D6400-12, A. “Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities”. 2012.
- [25] KASEEM, M., HAMAD, K., DERI, F. “Thermoplastic starch blends: A review of recent works”, *Polymer Science Series A*, v. 54, n. 2, pp. 165–176, 2012.
- [26] ZHANG, Y., REMPEL, C., LIU, Q. “Thermoplastic starch processing and characteristics—a review”, *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 54, n. 10, pp. 1353–1370, 2014.
- [27] BULEON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., et al. “Starch granules: structure and biosynthesis”, *International journal of biological macromolecules*, v. 23, n. 2, pp. 85–112, 1998.
- [28] MIAO, M., JIANG, B., CUI, S. W., et al. “Slowly digestible starch—A review”, *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 55, n. 12, pp. 1642–1657, 2015.
- [29] DENARDIN, C. C., SILVA, L. P. D. “Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas”, *Ciência Rural*, v. 39, pp. 945–954, 2009.
- [30] ANGELLIER, H., MOLINA-BOISSEAU, S., DOLE, P., et al. “Thermoplastic starch- waxy maize starch nanocrystals nanocomposites”, *Biomacromolecules*, v. 7, n. 2, pp. 531–539, 2006.

- [31] SVIHUS, B., UHLEN, A. K., HARSTAD, O. M. “Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review”, *Animal Feed Science and Technology*, v. 122, n. 3-4, pp. 303–320, 2005.
- [32] LAJOLO, F. M., MENEZES, E. W. D. “Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos”. In: *Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos*, pp. 646–646, 2006.
- [33] MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., YAMASHITA, F. “Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização”, *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 1, pp. 137–155, 2010.
- [34] MASINA, N., CHOONARA, Y. E., KUMAR, P., et al. “A review of the chemical modification techniques of starch”, *Carbohydrate polymers*, v. 157, pp. 1226–1236, 2017.
- [35] FAZELI, M. *DEVELOPMENT OF HYDROPHOBIC THERMOPLASTIC STARCH COMPOSITES*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.
- [36] DA SILVA, M. A., BIERHALZ, A. C. K., KIECKBUSCH, T. G. “Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca<sup>2+</sup> ions: Effect of the plasticizer concentration”, *Carbohydrate polymers*, v. 77, n. 4, pp. 736–742, 2009.
- [37] BASTIOLI, C., MAGISTRALI, P., GARCIA, S. G. “Starch in polymers technology”, *Degradable Polymers and Materials: Principles and Practice (2nd Edition)*, pp. 87–112, 2012.
- [38] LENDVAI, L., SAJÓ, I., KARGER-KOCSIS, J. “Effect of storage time on the structure and mechanical properties of starch/bentonite nanocomposites”, *Starch-Stärke*, v. 71, n. 1-2, pp. 1800123, 2019.
- [39] VAN SOEST, J. “The development of fully biodegradable starch plastics: Process-structure-property relationships”, *Agro Food Industry Hi-Tech*, v. 8, n. 2, pp. 17–22, 1997.
- [40] VAN SOEST, J. J., VLIEGENTHART, J. F. “Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties”, *Trends in biotechnology*, v. 15, n. 6, pp. 208–213, 1997.
- [41] YU, L., CHRISTIE, G. “Microstructure and mechanical properties of orientated thermoplastic starches”, *Journal of materials science*, v. 40, n. 1, pp. 111–116, 2005.

- [42] OLIVEIRA, C. F. D. P. *Obtenção e caracterização de amido termoplástico e de suas misturas com polipropileno*. Tese de Doutorado, Dissertação]. São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2015.
- [43] SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., et al. “Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources”, *Food chemistry*, v. 81, n. 2, pp. 219–231, 2003.
- [44] WANG, S., LI, C., COPELAND, L., et al. “Starch retrogradation: A comprehensive review”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 14, n. 5, pp. 568–585, 2015.
- [45] SOUZA, R. C., ANDRADE, C. T. “Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho”, *Polímeros*, v. 10, pp. 24–30, 2000.
- [46] THIRÉ, R. *Obtenção e Caracterização de Filmes Biodegradáveis a Base de Amido de Milho com Reduzida Sensibilidade à Água*. Tese de Doutorado, Tese de D. Sc., PEMM/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.
- [47] HOOVER, R., HUGHES, T., CHUNG, H., et al. “Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review”, *Food research international*, v. 43, n. 2, pp. 399–413, 2010.
- [48] LEE, J.-S., LEE, E.-S., HAN, J. “Enhancement of the water-resistance properties of an edible film prepared from mung bean starch via the incorporation of sunflower seed oil”, *Scientific reports*, v. 10, n. 1, pp. 1–15, 2020.
- [49] THAKUR, R., PRISTIJONO, P., SCARLETT, C. J., et al. “Starch-based films: Major factors affecting their properties”, *International journal of biological macromolecules*, v. 132, pp. 1079–1089, 2019.
- [50] VAN SOEST, J. *Starch plastics: Structureproperty relationships*. Tese de Doutorado, Utrecht University, 1996.
- [51] VERSINO, F., LOPEZ, O. V., GARCIA, M. A., et al. “Starch-based films and food coatings: An overview”, *Starch-Stärke*, v. 68, n. 11-12, pp. 1026–1037, 2016.
- [52] FAKHOURI, F. M., COSTA, D., YAMASHITA, F., et al. “Comparative study of processing methods for starch/gelatin films”, *Carbohydrate polymers*, v. 95, n. 2, pp. 681–689, 2013.

- [53] BADER, H. G., GÖRITZ, D. “Investigations on high amylose corn starch films. Part 3: stress strain behaviour”, *Starch-Stärke*, v. 46, n. 11, pp. 435–439, 1994.
- [54] MATHEW, A. P., DUFRESNE, A. “Plasticized waxy maize starch: effect of polyols and relative humidity on material properties”, *Biomacromolecules*, v. 3, n. 5, pp. 1101–1108, 2002.
- [55] VIEIRA, M. G. A., DA SILVA, M. A., DOS SANTOS, L. O., et al. “Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review”, *European polymer journal*, v. 47, n. 3, pp. 254–263, 2011.
- [56] BASIAK, E., LENART, A., DEBEAUFORT, F. “How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films”, *Polymers*, v. 10, n. 4, pp. 412, 2018.
- [57] ZHANG, Y., REMPEL, C. “Retrogradation and antiplasticization of thermoplastic starch”, *Thermoplastic elastomers*, v. 118119, 2012.
- [58] ABDORREZA, M. N., CHENG, L., KARIM, A. “Effects of plasticizers on thermal properties and heat sealability of sago starch films”, *Food hydrocolloids*, v. 25, n. 1, pp. 56–60, 2011.
- [59] HAZRATI, K., SAPUAN, S., ZUHRI, M., et al. “Effect of plasticizers on physical, thermal, and tensile properties of thermoplastic films based on *Dioscorea hispida* starch”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021.
- [60] TAN, I., WEE, C. C., SOPADE, P. A., et al. “Investigation of the starch gelatinisation phenomena in water–glycerol systems: application of modulated temperature differential scanning calorimetry”, *Carbohydrate Polymers*, v. 58, n. 2, pp. 191–204, 2004.
- [61] MOHAMMADI NAFCHI, A., MORADPOUR, M., SAEIDI, M., et al. “Thermoplastic starches: Properties, challenges, and prospects”, *Starch-Stärke*, v. 65, n. 1-2, pp. 61–72, 2013.
- [62] XU, H., CHAI, Y., ZHANG, G. “Synergistic effect of oleic acid and glycerol on zein film plasticization”, *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, n. 40, pp. 10075–10081, 2012.
- [63] HAZROL, M., SAPUAN, S., ZAINUDIN, E., et al. “Corn starch (*zea mays*) biopolymer plastic reaction in combination with sorbitol and glycerol”, *Polymers*, v. 13, n. 2, pp. 242, 2021.

- [64] CHUNG, Y.-L., ANSARI, S., ESTEVEZ, L., et al. “Preparation and properties of biodegradable starch–clay nanocomposites”, *Carbohydrate polymers*, v. 79, n. 2, pp. 391–396, 2010.
- [65] LÓPEZ, O. V., CASTILLO, L. A., GARCIA, M. A., et al. “Food packaging bags based on thermoplastic corn starch reinforced with talc nanoparticles”, *Food Hydrocolloids*, v. 43, pp. 18–24, 2015.
- [66] FLORES-HERNÁNDEZ, C. G., COLÍN-CRUZ, A., VELASCO-SANTOS, C., et al. “All green composites from fully renewable biopolymers: Chitosan-starch reinforced with keratin from feathers”, *Polymers*, v. 6, n. 3, pp. 686–705, 2014.
- [67] MÜLLER, C. M., LAURINDO, J. B., YAMASHITA, F. “Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films”, *Food hydrocolloids*, v. 23, n. 5, pp. 1328–1333, 2009.
- [68] CHEN, Q., LIU, Y., CHEN, G. “A comparative study on the starch-based biocomposite films reinforced by nanocellulose prepared from different non-wood fibers”, *Cellulose*, v. 26, n. 4, pp. 2425–2435, 2019.
- [69] MA, X., JIAN, R., CHANG, P. R., et al. “Fabrication and characterization of citric acid-modified starch nanoparticles/plasticized-starch composites”, *Biomacromolecules*, v. 9, n. 11, pp. 3314–3320, 2008.
- [70] SARTORI, T., MENEGALLI, F. C. “Development and characterization of unripe banana starch films incorporated with solid lipid microparticles containing ascorbic acid”, *Food Hydrocolloids*, v. 55, pp. 210–219, 2016.
- [71] FLOREZ, J. P., FAZELI, M., SIMÃO, R. A. “Preparation and characterization of thermoplastic starch composite reinforced by plasma-treated poly (hydroxybutyrate) PHB”, *International journal of biological macromolecules*, v. 123, pp. 609–621, 2019.
- [72] YOON, S.-D., PARK, M.-H., BYUN, H.-S. “Mechanical and water barrier properties of starch/PVA composite films by adding nano-sized poly (methyl methacrylate-co-acrylamide) particles”, *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 1, pp. 676–686, 2012.
- [73] NAZRIN, A., SAPUAN, S., ZUHRI, M., et al. “Nanocellulose reinforced thermoplastic starch (TPS), polylactic acid (PLA), and polybutylene succinate (PBS) for food packaging applications”, *Frontiers in chemistry*, v. 8, pp. 213, 2020.

- [74] LIU, R., XU, C., CONG, X., et al. “Effects of oligomeric procyanidins on the retrogradation properties of maize starch with different amylose/amyllopectin ratios”, *Food chemistry*, v. 221, pp. 2010–2017, 2017.
- [75] TAVARES, K. M., DE CAMPOS, A., MITSUYUKI, M. C., et al. “Corn and cassava starch with carboxymethyl cellulose films and its mechanical and hydrophobic properties”, *Carbohydrate polymers*, v. 223, pp. 115055, 2019.
- [76] BAUER, D., DE ABREU, J. P., OLIVEIRA, H. S. S., et al. “Antioxidant activity and cytotoxicity effect of cocoa beans subjected to different processing conditions in human lung carcinoma cells”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, 2016.
- [77] GARCIA-BRAND, A. J., MORALES, M. A., HOZMAN, A. S., et al. “Bioactive Poly (lactic acid)–Cocoa Bean Shell Composites for Biomaterial Formulation: Preparation and Preliminary In Vitro Characterization”, *Polymers*, v. 13, n. 21, pp. 3707, 2021.
- [78] LUBIS, M., GANA, A., MAYSARAH, S., et al. “Production of bioplastic from jackfruit seed starch (*Artocarpus heterophyllus*) reinforced with microcrystalline cellulose from cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) using glycerol as plasticizer”. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, v. 309, p. 012100. IOP Publishing, 2018.
- [79] KARAČA, S., TRIFKOVIĆ, K., MARTINIĆ, A., et al. “Development and characterisation of functional cocoa (*Theobroma cacao* L.)-based edible films”, *International Journal of Food Science & Technology*, v. 55, n. 3, pp. 1326–1335, 2020.
- [80] EFRAIM, P., ALVES, A. B., JARDIM, D. C. P. “Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde”, *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 14, n. 3, pp. 181–201, 2011.
- [81] FOWLER, M. S., COUTEL, F. “Cocoa beans: from tree to factory”, *Beckett's industrial chocolate manufacture and use*, pp. 9–49, 2017.
- [82] JAHURUL, M., ZAIDUL, I., NORULAINI, N., et al. “Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics”, *Journal of Food engineering*, v. 117, n. 4, pp. 467–476, 2013.
- [83] LOULLIS, A., PINAKOULAKI, E. “Carob as cocoa substitute: a review on composition, health benefits and food applications”, *European Food Research and Technology*, v. 244, n. 6, pp. 959–977, 2018.

- [84] SCHINELLA, G., MOSCA, S., CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E., et al. “Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed”, *Food Research International*, v. 43, n. 6, pp. 1614–1623, 2010.
- [85] FRANCO, R., OÑATIBIA-ASTIBIA, A., MARTÍNEZ-PINILLA, E. “Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate”, *Nutrients*, v. 5, n. 10, pp. 4159–4173, 2013.
- [86] ORACZ, J., NEBESNY, E. “Antioxidant properties of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): influence of cultivar and roasting conditions”, *International Journal of Food Properties*, v. 19, n. 6, pp. 1242–1258, 2016.
- [87] ANDRES-LACUEVA, C., MONAGAS, M., KHAN, N., et al. “Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process”, *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 56, n. 9, pp. 3111–3117, 2008.
- [88] WOLLGAST, J., ANKLAM, E. “Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification”, *Food Research International*, v. 33, n. 6, pp. 423–447, 2000.
- [89] LAU-CAM, C. A. “The absorption, metabolism, and pharmacokinetics of chocolate polyphenols”. In: *Chocolate in Health and Nutrition*, Springer, pp. 201–246, 2013.
- [90] BARIŠIĆ, V., KOPJAR, M., JOZINOVIC, A., et al. “The chemistry behind chocolate production”, *Molecules*, v. 24, n. 17, pp. 3163, 2019.
- [91] BECKETT, S. T. *Industrial chocolate manufacture and use*. John Wiley & Sons, 2011.
- [92] BERNAERT, H., BLONDEEL, I., ALLEGAERT, L., et al. “Industrial treatment of cocoa in chocolate production: Health implications”. In: *Chocolate and health*, Springer, pp. 17–31, 2012.
- [93] HII, C., LAW, C., SUZANNAH, S., et al. “Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.)”. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, v. 2, n. 4, pp. 702–722, 2009.
- [94] APROTOSOAIE, A. C., LUCA, S. V., MIRON, A. “Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, n. 1, pp. 73–91, 2016.

- [95] NOOR-SOFFALINA, S., JINAP, S., NAZAMID, S., et al. “Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavour precursors in a lipidic model system”, *International journal of food science & technology*, v. 44, n. 1, pp. 168–180, 2009.
- [96] LESSA, O. A., DOS SANTOS REIS, N., LEITE, S. G. F., et al. “Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids”, *Food science and biotechnology*, v. 27, n. 1, pp. 107–113, 2018.
- [97] ŹYŽELEWICZ, D., BUDRYN, G., KRYSIAK, W., et al. “Influence of roasting conditions on fatty acid composition and oxidative changes of cocoa butter extracted from cocoa bean of Forastero variety cultivated in Togo”, *Food Research International*, v. 63, pp. 328–343, 2014.
- [98] TOMAS-BARBERÁN, F. A., CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E., MARÍN, A., et al. “A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 10, pp. 3926–3935, 2007.
- [99] MAZOR JOLIĆ, S., RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ, I., MARKOVIĆ, K., et al. “Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing”, *International journal of food science & technology*, v. 46, n. 9, pp. 1793–1800, 2011.
- [100] TODOROVIC, V., MILENKOVIC, M., VIDOVIC, B., et al. “Correlation between antimicrobial, antioxidant activity, and polyphenols of alkalized/nonalkalized cocoa powders”, *Journal of Food Science*, v. 82, n. 4, pp. 1020–1027, 2017.
- [101] MD YUSOF, A. H., ABD GANI, S. S., ZAIDAN, U. H., et al. “Optimization of an ultrasound-assisted extraction condition for flavonoid compounds from cocoa shells (*Theobroma cacao*) using response surface methodology”, *Molecules*, v. 24, n. 4, pp. 711, 2019.
- [102] OTHMAN, A., ISMAIL, A., GHANI, N. A., et al. “Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans”, *Food chemistry*, v. 100, n. 4, pp. 1523–1530, 2007.
- [103] AFOAKWA, E. O., PATERSON, A., FOWLER, M. “Effects of particle size distribution and composition on rheological properties of dark chocolate”, *European Food Research and Technology*, v. 226, n. 6, pp. 1259–1268, 2008.

- [104] RUZAIDI, A., AMIN, I., NAWALYAH, A., et al. “The effect of Malaysian cocoa extract on glucose levels and lipid profiles in diabetic rats”, *Journal of ethnopharmacology*, v. 98, n. 1-2, pp. 55–60, 2005.
- [105] GENWALI, G. R., ACHARYA, P. P., RAJBHANDARI, M. “Isolation of gallic acid and estimation of total phenolic content in some medicinal plants and their antioxidant activity”, *Nepal journal of science and technology*, v. 14, n. 1, pp. 95–102, 2013.
- [106] QUEIROZ, V. M., KLING, I. C., ELTOM, A. E., et al. “Corn starch films as a long-term drug delivery system for chlorhexidine gluconate”, *Materials Science and Engineering: C*, v. 112, pp. 110852, 2020.
- [107] EDHIREJ, A., SAPUAN, S., JAWAID, M., et al. “Preparation and characterization of cassava bagasse reinforced thermoplastic cassava starch”, *Fibers and Polymers*, v. 18, n. 1, pp. 162–171, 2017.
- [108] ILYAS, R., SAPUAN, S., ATIQAH, A., et al. “Sugar palm (Arenga pinnata [Wurmb.] Merr) starch films containing sugar palm nanofibrillated cellulose as reinforcement: Water barrier properties”, *Polymer Composites*, v. 41, n. 2, pp. 459–467, 2020.
- [109] FOR TESTING, A. S., MATERIALS-ASTM. “ASTM D570-98—Standard Test Method for Water Absorption of Plastics”. ASTM West Conshohocken, 2010.
- [110] ASTM. “Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, D882-10”, *Annual Book of American Standard Testing Methods*, 2010.
- [111] ROMANO, C. S., ABADI, K., REPETTO, V., et al. “Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives”, *Food chemistry*, v. 115, n. 2, pp. 456–461, 2009.
- [112] BISIGNANO, C., FILOCAMO, A., FAULKS, R. M., et al. “In vitro antimicrobial activity of pistachio (*Pistacia vera L.*) polyphenols”, *FEMS microbiology letters*, v. 341, n. 1, pp. 62–67, 2013.
- [113] FENG, M., YU, L., ZHU, P., et al. “Development and preparation of active starch films carrying tea polyphenol”, *Carbohydrate polymers*, v. 196, pp. 162–167, 2018.
- [114] CLSI. “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition, document M07-A9”. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2012.

- [115] WOLLGAST, J. *Qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health.* Tese de D.Sc., Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics, and Environmental Management - Institute of Nutritional Sciences, Giessen, Germany, 2004.
- [116] SHITTU, T., LAWAL, M. “Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages”, *Food Chemistry*, v. 100, n. 1, pp. 91–98, 2007.
- [117] D’SOUZA, R. N., GRIMBS, S., BEHRENDS, B., et al. “Origin-based polyphenolic fingerprinting of Theobroma cacao in unfermented and fermented beans”, *Food Research International*, v. 99, pp. 550–559, 2017.
- [118] AGUS, B. A. P., MOHAMAD, N. N., HUSSAIN, N. “Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malaysia”, *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 12, n. 4, pp. 2581–2589, 2018.
- [119] TORO-URIBE, S., GODOY-CHIVATÁ, J., VILLAMIZAR-JAIMES, A. R., et al. “Insight of polyphenol oxidase enzyme inhibition and total polyphenol recovery from cocoa beans”, *Antioxidants*, v. 9, n. 6, pp. 458, 2020.
- [120] TSAO, R. “Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols”, *Nutrients*, v. 2, n. 12, pp. 1231–1246, 2010.
- [121] URBAŃSKA, B., KOWALSKA, J. “Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the world”, *Antioxidants*, v. 8, n. 8, pp. 283, 2019.
- [122] INDIARTO, R., PRANOTO, Y., SANTOSO, U., et al. “In vitro Antioxidant Activity and Profile of Polyphenol Compounds Extracts and their Fractions on Cacao Beans.” *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, v. 22, n. 1, pp. 34–44, 2019.
- [123] FAJARDO DAZA, J. A., IBARRA, C. A., PERDOMO, D. A., et al. “OPTIMIZATION OF ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF POLYPHENOLS IN COCOA BEANS”, *Vitae*, v. 27, n. 1, 2020.
- [124] ALI, F., RANNEH, Y., ISMAIL, A., et al. “Identification of phenolic compounds in polyphenols-rich extract of Malaysian cocoa powder using

- the HPLC-UV-ESI—MS/MS and probing their antioxidant properties”, *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 4, pp. 2103–2111, 2015.
- [125] LI, Y., ZHU, S., FENG, Y., et al. “Influence of alkalization treatment on the color quality and the total phenolic and anthocyanin contents in cocoa powder”, *Food Science and Biotechnology*, v. 23, n. 1, pp. 59–63, 2014.
- [126] SONG, X., ZUO, G., CHEN, F. “Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films”, *International journal of biological macromolecules*, v. 107, pp. 1302–1309, 2018.
- [127] TRAVALINI, A. P., LAMSAL, B., MAGALHÃES, W. L. E., et al. “Cassava starch films reinforced with lignocellulose nanofibers from cassava bagasse”, *International journal of biological macromolecules*, v. 139, pp. 1151–1161, 2019.
- [128] TARIQUE, J., SAPUAN, S., KHALINA, A. “Effect of glycerol plasticizer loading on the physical, mechanical, thermal, and barrier properties of arrowroot (*Maranta arundinacea*) starch biopolymers”, *Scientific reports*, v. 11, n. 1, pp. 1–17, 2021.
- [129] PETIT, J., MICHAUX, F., JACQUOT, C., et al. “Storage-induced caking of cocoa powder”, *Journal of Food Engineering*, v. 199, pp. 42–53, 2017.
- [130] RIAZ, A., LAGNIKA, C., ABDIN, M., et al. “Preparation and characterization of chitosan/gelatin-based active food packaging films containing apple Peel nanoparticles”, *Journal of Polymers and the Environment*, v. 28, n. 2, pp. 411–420, 2020.
- [131] DYER, B. “Alkalized cocoa powders”, *Manufacturing Confectioner*, v. 83, n. 6, pp. 47–54, 2003.
- [132] LIU, Y., WANG, S., LAN, W., et al. “Development of ultrasound treated polyvinyl alcohol/tea polyphenol composite films and their physicochemical properties”, *Ultrasonics sonochemistry*, v. 51, pp. 386–394, 2019.
- [133] THIRÉ, R. M., RIBEIRO, T. A., ANDRADE, C. T. “Effect of starch addition on compression-molded poly (3-hydroxybutyrate)/starch blends”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 100, n. 6, pp. 4338–4347, 2006.

- [134] JACQUOT, C., PETIT, J., MICHAUX, F., et al. “Cocoa powder surface composition during aging: A focus on fat”, *Powder Technology*, v. 292, pp. 195–202, 2016.
- [135] PALMIERI, P. A., HARTEL, R. W. “Crystallization of Cocoa Butter in Cocoa Powder”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 96, n. 8, pp. 911–926, 2019.
- [136] DE SOUZA, A. G., DOS SANTOS, N. M. A., DA SILVA TORIN, R. F., et al. “Synergic antimicrobial properties of Carvacrol essential oil and montmorillonite in biodegradable starch films”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 164, pp. 1737–1747, 2020.
- [137] ZHU, F. “Interactions between starch and phenolic compound”, *Trends in Food Science & Technology*, v. 43, n. 2, pp. 129–143, 2015.
- [138] SALAS-VALERO, L. M., TAPIA-BLÁCIDO, D. R., MENEGALLI, F. C. “Biofilms based on canihua flour (*Chenopodium pallidicaule*): design and characterization”, *Química Nova*, v. 38, pp. 14–21, 2015.
- [139] BORDENAVE, N., HAMAKER, B. R., FERRUZZI, M. G. “Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods”, *Food & function*, v. 5, n. 1, pp. 18–34, 2014.
- [140] HAN, X., ZHANG, M., ZHANG, R., et al. “Physicochemical interactions between rice starch and different polyphenols and structural characterization of their complexes”, *LWT*, v. 125, pp. 109227, 2020.
- [141] WU, Y., CHEN, Z., LI, X., et al. “Effect of tea polyphenols on the retrogradation of rice starch”, *Food Research International*, v. 42, n. 2, pp. 221–225, 2009.
- [142] ZHAO, Y., TEIXEIRA, J. S., GÄNZLE, M. M., et al. “Development of antimicrobial films based on cassava starch, chitosan and gallic acid using subcritical water technology”, *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 137, pp. 101–110, 2018.
- [143] XIAO, H., LIN, Q., LIU, G.-Q., et al. “Inhibitory effects of green tea polyphenols on the retrogradation of starches from different botanical sources”, *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, n. 8, pp. 2177–2181, 2013.
- [144] GIUBERTI, G., ROCCHETTI, G., LUCINI, L. “Interactions between phenolic compounds, amylolytic enzymes and starch: An updated overview”, *Current Opinion in Food Science*, v. 31, pp. 102–113, 2020.

- [145] DE CAMPOS, A., DE SENA NETO, A. R., RODRIGUES, V. B., et al. “Bionanocomposites produced from cassava starch and oil palm mesocarp cellulose nanowhiskers”, *Carbohydrate polymers*, v. 175, pp. 330–336, 2017.
- [146] ZHANG, Y., ZHANG, G. “Starch content and physicochemical properties of green wheat starch”, *International Journal of Food Properties*, v. 22, n. 1, pp. 1463–1474, 2019.
- [147] LESSA, O. A., DE CARVALHO TAVARES, I. M., SOUZA, L. O., et al. “New biodegradable film produced from cocoa shell nanofibrils containing bioactive compounds”, *Journal of Coatings Technology and Research*, pp. 1–12, 2021.
- [148] BATISTA, N. N., DE ANDRADE, D. P., RAMOS, C. L., et al. “Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR”, *Food Research International*, v. 90, pp. 313–319, 2016.
- [149] MENDES, J. F., NORCINO, L. B., MARTINS, H. H., et al. “Development of quaternary nanocomposites made up of cassava starch, cocoa butter, lemongrass essential oil nanoemulsion, and brewery spent grain fibers”, *Journal of Food Science*, v. 86, n. 5, pp. 1979–1996, 2021.
- [150] ORACZ, J., ZYZELEWICZ, D. “In vitro antioxidant activity and ftir characterization of high-molecular weight melanoidin fractions from different types of cocoa beans”, *Antioxidants*, v. 8, n. 11, pp. 560, 2019.
- [151] GOMEZ HOYOS, C., MAZO MARQUEZ, P., PENAGOS VÉLEZ, L., et al. “Cocoa shell: an industrial by-product for the preparation of suspensions of holocellulose nanofibers and fat”, *Cellulose*, v. 27, pp. 10873–10884, 2020.
- [152] AKINJOKUN, A. I., PETRIK, L. F., OGUNFOWOKAN, A. O., et al. “Isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from cocoa pod husk (CPH) biomass wastes”, *Heliyon*, v. 7, n. 4, pp. e06680, 2021.
- [153] KANEKO, F., OONISHI, K., UEHARA, H., et al. “Polarized FTIR ATR Spectroscopic Study on the Structure of Chocolate: Influence of Mold on Fat Crystalline Structures”, *Crystal Growth & Design*, v. 21, n. 6, pp. 3290–3298, 2021.
- [154] GRILLO, G., BOFFA, L., BINELLO, A., et al. “Analytical dataset of Ecuadorian cocoa shells and beans”, *Data in brief*, v. 22, pp. 56–64, 2019.

- [155] PEIDAYESH, H., AHMADI, Z., KHONAKDAR, H. A., et al. “Fabrication and properties of thermoplastic starch/montmorillonite composite using dialdehyde starch as a crosslinker”, *Polymer International*, v. 69, n. 3, pp. 317–327, 2020.
- [156] ZHANG, K., SU, T., CHENG, F., et al. “Effect of sodium citrate/polyethylene glycol on plasticization and retrogradation of maize starch”, *International journal of biological macromolecules*, v. 154, pp. 1471–1477, 2020.
- [157] ZULLO, R., IANNACE, S. “The effects of different starch sources and plasticizers on film blowing of thermoplastic starch: Correlation among process, elongational properties and macromolecular structure”, *Carbohydrate Polymers*, v. 77, n. 2, pp. 376–383, 2009.
- [158] BODIRLAU, R., TEACA, C.-A., SPIRIDON, I. “Influence of natural fillers on the properties of starch-based biocomposite films”, *Composites Part B: Engineering*, v. 44, n. 1, pp. 575–583, 2013.
- [159] KALIC, M., KRSTONOSIC, V., HADNADEV, M., et al. “Impact of different sugar and cocoa powder particle sizes on crystallization of fat used for the production of confectionery products: Particle size distribution influences fat crystallization”, *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 42, n. 12, pp. e13848, 2018.
- [160] DAUD, Z., AWANG, H., MOHD KASSIM, A. S., et al. “Cocoa pod husk and corn stalk: Alternative paper fibres study on chemical characterization and morphological structures”. In: *Advanced Materials Research*, v. 911, pp. 331–335. Trans Tech Publ, 2014.
- [161] BHAT, R., ABDULLAH, N., DIN, R. H., et al. “Producing novel sago starch based food packaging films by incorporating lignin isolated from oil palm black liquor waste”, *Journal of Food Engineering*, v. 119, n. 4, pp. 707–713, 2013.
- [162] CALGERIS, İ., ÇAKMAKÇI, E., OGAN, A., et al. “Preparation and drug release properties of lignin–starch biodegradable films”, *Starch-Stärke*, v. 64, n. 5, pp. 399–407, 2012.
- [163] ALI, A., CHEN, Y., LIU, H., et al. “Starch-based antimicrobial films functionalized by pomegranate peel”, *International journal of biological macromolecules*, v. 129, pp. 1120–1126, 2019.

- [164] BAO, N., RASHED, M. M., JIANG, B., et al. “Green and Efficient Extraction Approach for Polyphenol Recovery from Lotus Seedpods (*Receptaculum Nelumbinis*): Gas-Assisted Combined with Glycerol”, *ACS omega*, v. 6, n. 40, pp. 26722–26731, 2021.
- [165] HUAMÁN-CASTILLA, N. L., MARIOTTI-CELIS, M. S., MARTÍNEZ-CIFUENTES, M., et al. “Glycerol as alternative co-solvent for water extraction of polyphenols from Carménère pomace: Hot pressurized liquid extraction and computational chemistry calculations”, *Biomolecules*, v. 10, n. 3, pp. 474, 2020.
- [166] PIÑEROS-HERNANDEZ, D., MEDINA-JARAMILLO, C., LÓPEZ-CÓRDOBA, A., et al. “Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging”, *Food hydrocolloids*, v. 63, pp. 488–495, 2017.
- [167] CHOI, I., LEE, S. E., CHANG, Y., et al. “Effect of oxidized phenolic compounds on cross-linking and properties of biodegradable active packaging film composed of turmeric and gelatin”, *Lwt*, v. 93, pp. 427–433, 2018.
- [168] HE, T., WANG, K., ZHAO, L., et al. “Interaction with longan seed polyphenols affects the structure and digestion properties of maize starch”, *Carbohydrate Polymers*, v. 256, pp. 117537, 2021.
- [169] MELO, P. E., SILVA, A. P. M., MARQUES, F. P., et al. “Antioxidant films from mango kernel components”, *Food Hydrocolloids*, v. 95, pp. 487–495, 2019.
- [170] BARROS, F., AWIKA, J. M., ROONEY, L. W. “Interaction of tannins and other sorghum phenolic compounds with starch and effects on in vitro starch digestibility”, *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, n. 46, pp. 11609–11617, 2012.
- [171] ZIYATDINOVA, G., BUDNIKOV, H. C. “Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: state of the art and prospects of development”, *Russian Chemical Reviews*, v. 84, n. 2, pp. 194, 2015.
- [172] SERVENT, A., BOULANGER, R., DAVRIEUX, F., et al. “Assessment of cocoa (*Theobroma cacao L.*) butter content and composition throughout fermentations”, *Food Research International*, v. 107, pp. 675–682, 2018.

- [173] LÓPEZ-CÓRDOBA, A., MEDINA-JARAMILLO, C., PIÑEROS-HERNANDEZ, D., et al. “Cassava starch films containing rosemary nanoparticles produced by solvent displacement method”, *Food Hydrocolloids*, v. 71, pp. 26–34, 2017.
- [174] PARDO-FIGUEREZ, M., CHIVA-FLOR, A., FIGUEROA-LOPEZ, K., et al. “Antimicrobial Nanofiber Based Filters for High Filtration Efficiency Respirators”, *Nanomaterials*, v. 11, n. 4, pp. 900, 2021.
- [175] LI, Y., FENG, Y., ZHU, S., et al. “The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder”, *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 25, n. 1, pp. 17–23, 2012.