

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CATARINA DE MESQUITA OLIVEIRA**

**MICROCÁPSULA DE ÁCIDO SÓRBICO: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO  
EM FILME BIODEGRADÁVEL**

Maringá – PR – Brasil

Fevereiro de 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**MICROCÁPSULA DE ÁCIDO SÓRBICO: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO  
EM FILME BIODEGRADÁVEL**

Catarina de Mesquita Oliveira

Eng<sup>a</sup> de Alimentos, UFMA, 2018

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Bergamasco

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, área de Engenharia de Processos e Produtos na Indústria de Alimentos.

Maringá – PR – Brasil

Fevereiro de 2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

O48m

Oliveira, Catarina de Mesquita

Microcápsula de ácido sórbico : caracterização e aplicação em filme biodegradável /  
Catarina de Mesquita Oliveira. -- Maringá, PR, 2020.  
46 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Bergamasco.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2020.

1. Complexo de inclusão - Caracterização. 2. Filme ativo. 3. Conservante. 4.  
Ressonância magnética nuclear (RMN). I. Bergamasco, Rita de Cássia, orient. II.  
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos. III. Título.

CDD 23.ed. 664

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Catarina de Mesquita Oliveira perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos em 06 de Fevereiro de 2020.

COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Rita de Cássia Bergamasco

Orientador

  
Prof. Gisella Maria Zanin

Membro



Prof. Mônica Regina da Silva Scapim

Membro

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida, a saúde e a fé para me conduzir e vencer esta etapa de minha vida.
- Meus pais (Luis e Maria Lenir) e irmãos, pelo apoio, compreensão, por acreditarem na minha capacidade, pelos risos que recarregaram minhas energias nas idas para casa e pelo esforço empregado na minha formação profissional e pessoal, sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui, essa conquista é dedicada a vocês.
- À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rita de Cássia Bergamasco, pela orientação, paciência, valiosos ensinamentos e amizade nesses dois anos, estando sempre disposta a ajudar. Toda a minha gratidão e admiração.
- Às prof<sup>ª</sup>s da banca, pelas ideias, auxílios e pelas sugestões apresentadas para redação final deste trabalho.
- Às minhas amigas: Brenda, pelo convívio, apoio, cumplicidade, ajuda, risos e por compartilhar os sofrimentos e as vitórias; Angélica e Ludimila pelas conversas e depoimentos diários, pois mesmo de longe fizeram-se presentes e foram muito importantes nessa jornada.
- Às amigas que o mestrado proporcionou, Jiuliane e Andreza.
- Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho e torceram por mim. Meus sinceros agradecimentos.

# **MICROCÁPSULA DE ÁCIDO SÓRBICO: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM FILME BIODEGRADÁVEL**

**AUTOR: CATARINA DE MESQUITA OLIVEIRA**

**ORIENTADORA: RITA DE CÁSSIA BERGAMASCO**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL 13 – 07; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brasil, defendida em 06 de Fevereiro de 2020. 46p.

## **RESUMO**

Microcápsulas de ácido sórbico foram preparadas por inclusão molecular em  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), utilizando a técnica de coprecipitação na razão molar de 1:1, caracterizadas e aplicadas em filme biodegradável ativo. Para a investigação de formação de complexo de inclusão, foram utilizadas técnicas de Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância magnética nuclear de prótons (RMN- $H^1$ ), que permitiram verificar a interação entre as moléculas de ácido sórbico e  $\beta$ -ciclodextrina e a formação do complexo de inclusão. Também foram realizadas análise da capacidade de carga do complexo e teste de estabilidade térmica, cujos resultados foram 104 mg de AS/g de pó e a observação de que o complexo é capaz de suportar as temperaturas de produção do filme (120°C). Os filmes de amido foram elaborados por extrusão, utilizando o ácido sórbico na forma livre (F1) e na forma de complexo de inclusão (F2), e foram submetidos a caracterização quanto a permeabilidade ao vapor de água, não sendo observado diferença significativa entre as duas formulações, e propriedades mecânicas, sendo que a formulação F2 apresentou uma maior capacidade de alongação antes da ruptura e menor módulo de elasticidade, apresentando uma menor rigidez quando comparado a F1.

**Palavras-chave:** Complexo de inclusão; Conservante; Caracterização; RMN; Amido; Filme ativo.

# **SORBIC ACID MICROCAPSULE: CHARACTERIZATION AND APPLICATION ON BIODEGRADABLE FILM**

**AUTHOR: CATARINA DE MESQUITA OLIVEIRA**

**SUPERVISOR: PROF. DR<sup>a</sup>. RITA DE CÁSSIA BERGAMASCO**

Master Thesis; Food Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL 13 – 07; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brazil, presented on 6<sup>th</sup> February 2020. 46p.

## **ABSTRACT**

Sorbic acid microcapsules were prepared by molecular inclusion in  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD), using the 1:1 molar ratio coprecipitation technique, characterized and applied on active biodegradable film. For the investigation of inclusion complex formation, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Proton Nuclear Magnetic Resonance (NMR- $H^1$ ) techniques were used, which allowed to verify the interaction between the sorbic acid molecules and  $\beta$ -cyclodextrin and the formation of the inclusion complex. Analysis of the load capacity of the complex and thermal stability test were also performed, the results of which were 104 mg of AS/g of powder and the observation that the complex is capable of withstanding the film production temperatures (120°C). The starch films were elaborated by extrusion, using sorbic acid in free form (F1) and in the form of inclusion complex (F2), and were submitted to characterization as to water vapor permeability, not being observed any significant difference between the two formulations, and mechanical properties, being that the F2 formulation presented a higher elongation capacity before rupture and lower modulus of elasticity, presenting a lower rigidity when compared to F1.

**Keywords:** Inclusion complex; Conservative; Characterization; NMR; Starch; Active film.

## SUMÁRIO

<b>CAPITULO i - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
1.1.1. Objetivo Geral	2
1.1.2. Objetivos Específicos	2
<b>CAPITULO ii - ESTADO DA ARTE</b>	<b>3</b>
<b>2.1. ÁCIDO SÓRBICO</b>	<b>3</b>
2.1.1. Espectro de atuação do conservante	4
2.1.2. Mecanismos de oxidação e degradação química de AS	5
<b>2.2. CICLODEXTRINA</b>	<b>6</b>
2.2.1. Complexo de inclusão	8
2.2.2. Métodos de complexação	10
2.2.2.1. Coprecipitação	10
2.2.2.2. Mistura física	10
2.2.3. Complexação de ciclodextrina com ácidos orgânicos	11
2.2.4. Caracterização do complexo	11
2.2.4.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	12
2.2.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN- <sup>1</sup> H)	12
<b>2.3. FILMES BIODEGRADÁVEIS ATIVOS</b>	<b>12</b>
2.3.1. Amido	13
2.3.2. Processo de extrusão	14
2.3.3. Propriedades do Filme	<b>15</b>
2.3.3.1. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	15
2.3.3.2. Propriedades mecânicas	16
2.3.3.2.1. Módulo de elasticidade	16
2.3.3.2.2. Elongação na ruptura	16
2.3.3.2.3. Tensão máxima	16
2.3.3.2.4. Espessura	16
2.3.3.2.5. Cor	16
2.3.4. Atividade antimicrobiana	16
2.3.4.1. Teste de halo	16
<b>2.4. REFERÊNCIAS</b>	<b>17</b>

<b>CAPITULO iii - ARTIGO</b>	<b>26</b>
MICROCÁPSULA DE ÁCIDO SÓRBICO: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM FILME BIODEGRADÁVEL	<b>26</b>
<b>CAPITULO iv - ANEXO</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO i - Curva de calibração do ácido sórbico</b>	<b>45</b>

## CAPITULO i

### INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos muitos alimentos são acometidos por contaminação e deterioração, principalmente por fungos, o que ocasiona o descarte de grandes quantidades de alimentos. O desenvolvimento dessa contaminação é visível na superfície do produto, de modo que altera não somente as características de sabor e textura do alimento, mas também sua aparência. Para inibir esse tipo de contaminação, são utilizados alguns compostos considerados conservantes como agente antimicrobiano, entre eles encontra-se o ácido sórbico (LOPES *et al.*, 2012).

O ácido sórbico (E200) é um aditivo alimentar, que atua como conservante e possui a capacidade de inibir ou retardar o desenvolvimento de inúmeros microrganismos, como leveduras, bolores e bactérias (STOPFORTH *et al.*, 2005), e é considerado um composto seguro e não tóxico, quando em comparação a outros compostos que atuam como conservantes (EFSA, 2015).

Como forma de melhorar as características do composto e de aplicação do mesmo, os complexos de inclusão são produzidos utilizando a técnica de microencapsulação por inclusão molecular, tornando-se uma alternativa viável para o desenvolvimento das técnicas que visam o aumento da eficiência e biodisponibilidade dos compostos (VIKAS *et al.*, 2018).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos que possuem a capacidade de formar complexos. As aplicações atraem não somente o setor alimentício, mas também os campos farmacêuticos, agroquímico e de cosméticos. A complexação formada é capaz de mascarar sabores desagradáveis ou odores, reduzir a volatilização e evaporação de compostos, proteger da luz, oxigênio e interações com outros componentes em sua aplicação (MURA, 2014).

A incorporação de agentes antimicrobianos em embalagens é um modo de garantir a disponibilidade de suas funções durante a vida de prateleira do produto (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2016). As embalagens são, em sua maioria, produzidas sob utilização de altas temperaturas o que pode acarretar em perda dos ingredientes bioativos incorporados, todavia, essa perda pode ser reduzida se o componente ativo estiver na forma microencapsulada (FENYVESI & SZENTE, 2018).

Diferente das embalagens convencionais que tradicionalmente atuam somente como barreira passiva aos efeitos do ambiente, de modo a separar produto embalado do meio

externo, as embalagens ativas são projetadas para interagir com o produto embalado e prolongar sua vida útil. O material que constitui o sistema de embalagem ativo pode conter compostos antimicrobianos que são liberados do revestimento para desempenhar suas funções e retardar a degradação do alimento, inibindo a proliferação de microrganismos (FENYVESI & SZENTE, 2018; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2016).

## **1.1. Objetivos**

### 1.1.1. Objetivo geral

Elaborar microcápsulas de ácido sórbico, visando obter melhora nas propriedades físicas do ácido e facilitar a sua aplicabilidade em produtos, como em formulação de filmes biodegradáveis, além de garantir as propriedades antimicrobianas deste agente conservante.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Elaborar microcápsulas de ácido sórbico por inclusão molecular em  $\beta$ -ciclodextrina;
- Caracterizar as microcápsulas obtidas quanto a capacidade de carga e liberação, estabilidade térmica, e por meio das técnicas de FTIR, RMN- $^1\text{H}$ ;
- Aplicar o ácido sórbico microencapsulado em formulação de filme biodegradável;
- Caracterizar o filme ativo biodegradável, quanto a espessura, permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas e cor;
- Aplicar teste de halo.

## CAPITULO ii

### ESTADO DA ARTE

#### 2.1. ÁCIDO SÓRBICO - AS

A propriedade antimicrobiana do ácido sórbico foi descoberta por Müller no ano de 1938, na Alemanha. Em 1950, o AS já estava disponível industrialmente e sua utilização na preservação de alimentos já se tornava crescente, uma vez que era inofensivo à saúde e não afetava as características dos alimentos (LUCK & JAGER, 1995).

O ácido sórbico (E200) é um aditivo alimentar, que atua como conservante e possui a capacidade de inibir ou retardar o desenvolvimento de inúmeros microrganismos, como leveduras, bolores e bactérias (STOPFORTH *et al.*, 2005), e é considerado um composto seguro e não tóxico, quando em comparação a outros compostos que atuam como conservantes (EFSA, 2015). Suas principais propriedades (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do ácido sórbico (LUCK & JAGER, 1995).

Propriedades	Ácido Sórbico
<b>Nome químico</b>	Ácido hexa-2,4-dienóico
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
<b>Massa molecular</b>	112,13
<b>Solubilidade em H<sub>2</sub>O, 20°C (g/100mL)</b>	0,16
<b>Solubilidade em etanol, 95%(g/100mL)</b>	12.60-14.50
<b>Aparência</b>	Pó branco e cristalino
<b>pH ótimo</b>	< 6,0
<b>pKa (a 25°C)</b>	4,76
<b>Odor</b>	Inodoro

O AS e o seu sal de potássio são as formas mais amplamente utilizadas do composto e são conhecidas como sorbatos. Aplicações práticas de sorbatos incluem a preservação de alimentos, produtos farmacêuticos, produtos cosméticos e materiais de embalagem. São considerados como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), e seu uso pode ser solicitado em qualquer produto alimentício que permita conservantes. As aplicações práticas de sorbato como conservante de alimentos incluem produtos lácteos, produtos de panificação, frutas e vegetais e outros produtos alimentícios (SOFOS & BUSTA, 1981).

A forma ácida do conservante possui maior potência de atividade antimicrobiana, quando comparada ao seu sal de potássio, que possui 75% de potência em relação ao equivalente em peso do ácido, sendo necessária uma maior quantidade de sal para atingir o mesmo potencial antimicrobiano do ácido (STOPFORTH *et al.*, 2005).

Os sorbatos são considerados os agentes antimicrobianos mais utilizados na indústria alimentícia, para a preservação e aumento da vida de prateleira de produtos com umidade intermediária (SEOW & CHEAH, 1985). Segundo Silveira e colaboradores (2007), os ácidos orgânicos como conservantes (sorbico, benzóico e propiônico), podem ser utilizados para aumentar a vida de prateleira de massas frescas se utilizados juntamente com o resfriamento, uma vez que esses produtos não passam por tratamento térmico.

Segundo a FAO/WHO (1970), a atuação do AS se dá somente quando o mesmo está em sua forma não dissociada, sendo dependente do pH, atuando em uma ampla faixa, onde sua maior atividade antimicrobiana é verificada em condições ácidas. Desta forma, os fatores citados podem interferir na atividade antimicrobiana do AS, ampliando e/ou intensificando a ação conservante do mesmo (LIEWEN & MARTH, 1985).

### 2.1.1. Espectro de atuação do AS

Para que exista uma boa ação conservante é necessário conhecer a diversidade microbiana em que o composto atuará, analisando em várias concentrações do agente conservante. Desta forma, é importante conhecer o tipo de microrganismo, componentes e propriedades dos alimentos, pois este último difere de meios sintéticos e as características destes podem alterar drasticamente a atividade do antimicrobiano (DAVIDSON & BRANEN, 2005). Os espectros de ação do AS (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Bactérias inibidas por ácido sórbico (SOFOS *et al.*, 1986).

<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Acetobacter xylinum</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Salmonella heidelberg</i>
<i>Acinetibacter</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella montevideo</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Propionibacterium zeae</i>	<i>Sarcinia lutea</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Prop. Freudenreichii</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Costridium botulinum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Virio parahaemolyticus</i>

Tabela 3. Leveduras inibidas por ácido sórbico, algumas espécies dos gêneros apresentados são inibidas (BELL et al., 1959).

<i>Candida</i>	<i>Brettanomyces</i>
<i>Debarymyces</i>	<i>Endomycopsis</i>
<i>Rhadorula</i>	<i>Sccharomyces</i>
<i>Torulopses</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Torulaspota</i>
<i>Hansenula</i>	

Outros gêneros/espécies em destaque para o espectro de atuação do AS são *Listeria monocytogenes* estudadas por Silveira *et al.* (2007), *A. Niger* por Stratford *et al.* (2013) e *Corynebacterium* por Al-Dagal & Bazaraa (1999) e algumas espécies de *Penicillium* segundo concluíram Finol *et al.* (1982).

### 2.1.2. Mecanismos de oxidação e degradação química de AS

A forma cristalina do ácido sórbico possui uma considerável estabilidade, contudo, é instável em solução aquosa dando origem a vários produtos decorrentes da sua degradação, e estes alteram a coloração da solução (ARYA, 1980; CAMPOS & GERSCHENSON, 1996). O aumento da temperatura também é capaz de ocasionar a degradação do ácido, este sublima sob aquecimento (CHICHESTER & TANNER JR, 1972).

Vários estudos demonstraram a capacidade do ácido sórbico de interagir com vários outros aditivos ou constituintes de alimentos (SEOW & CHEAH, 1985), degradando-se, principalmente, por autooxidação na presença de oxigênio, e formando malonaldeído e outros carbonilos (ARYA, 1980).

Na aplicação do AS na preservação de alimentos, a degradação ácido é lenta e o consumo do alimento contendo o conservante se dá, geralmente, antes que ocorra qualquer alteração aparente no teor de AS; desta forma muitos outros componentes do alimento podem sofrer oxidação antes do ácido (LUCK & JAGER, 1995).

A degradação do AS em alimentos e/ou sistemas modelo pode ocorrer por diversas maneiras, desde mecanismos de oxidação, interações com constituintes ou aditivos presentes em alimentos, ação microbiana e degradação por ação de temperatura (SEOW & CHEAH, 1985).

Lopes e colaboradores (2012) observaram, em experimentos eletroquímicos, o mecanismo de degradação do AS. A oxidação pode ser verificada nas ligações duplas entre os carbonos C2-C3 ou C4-C5 (Figura 1). Contudo, por estar mais próxima do grupo carbonila, a ligação C2-C3 possui menor chance de sofrer auto-oxidação. Assim, o mecanismo de oxidação do AS proposto por esses autores, envolve principalmente a

hidrolise da ligação dupla entre os carbonos C4 e C5, seguida de adição de OH na posição C5 e desprotonação química do produto de oxidação.

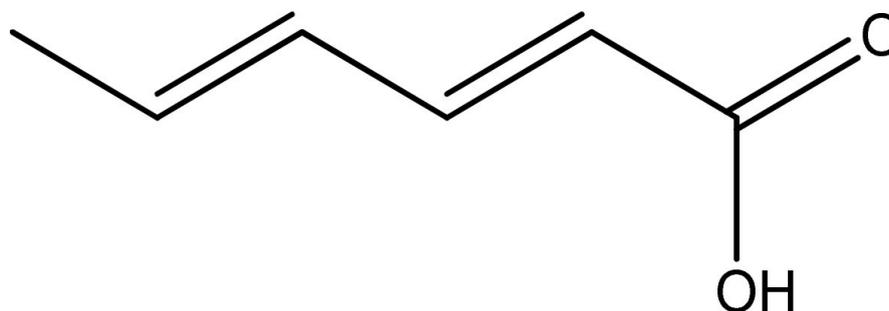


Figura 1. Estrutura molecular do ácido sórbico (EFSA *et al.*, 2019).

Campos e Gerschenson (1996) estudaram o efeito de alguns aditivos utilizados em conjunto com o ácido sórbico em sistemas e verificaram a degradação do AS em sistemas contendo glicina, glicina e glicerol e na presença de nitrito, juntamente com cloreto de sódio. Gliemmo e colaboradores (2001) verificaram a destruição do ácido sórbico em sistema contendo aspartame e glicose. Saxby *et al.* (1982) relataram a rápida degradação do AS em modelos de matrizes alimentar contendo dióxido de enxofre em excesso. A degradação do ácido sórbico por microrganismo também foi observada, fungos podem realizar um processo de degradação por meio da descarboxilação do ácido sórbico (MARTH *et al.*, 1966).

## 2.2. CICLODEXTRINA

As ciclodextrinas (CD) são uma família de oligossacarídeos cíclicos compostos por monômeros de  $\alpha$ -D-glicose, unidos por ligações  $\alpha$ -1,4-glicose. As CDs possuem um exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica, que podem interagir com várias moléculas orgânicas / inorgânicas para formar complexos de inclusão pela da formação de unidades não covalentes ligadas (WANG *et al.*, 2016).

Os três principais oligossacarídeos que correspondem às ciclodextrinas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrina possuem propriedades semelhantes: são cristalinos, homogêneos, não-higroscópicos, constituídos de macro-anéis formados a partir de unidades de glucopiranosose. A  $\alpha$ -ciclodextrina (também denominada de  $\alpha$ -dextrina de Schardinger, ciclomalto-hexaose, ciclohexaglucano, ciclohexaamilose,  $\alpha$ CD, ACD ou C6A) é formada a partir de seis unidades de glucopiranosose, já a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -dextrina de Schardinger, ciclomaltoheptaose, cicloheptaglucano, cicloheptaamilose,  $\beta$ CD, BCD ou C7A) formada a partir de sete unidades

de glucopironase, e a  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -dextrina de Schardinger, ciclomaltooctose, ciclooctaglucono, ciclooctaamilose,  $\gamma$ CD, GCD, C8A) formada a partir de oito unidades (SZEJTLI, 2004). Representações das estruturas das ciclodextrinas (Figura 2), e as principais propriedades (Tabela 4).

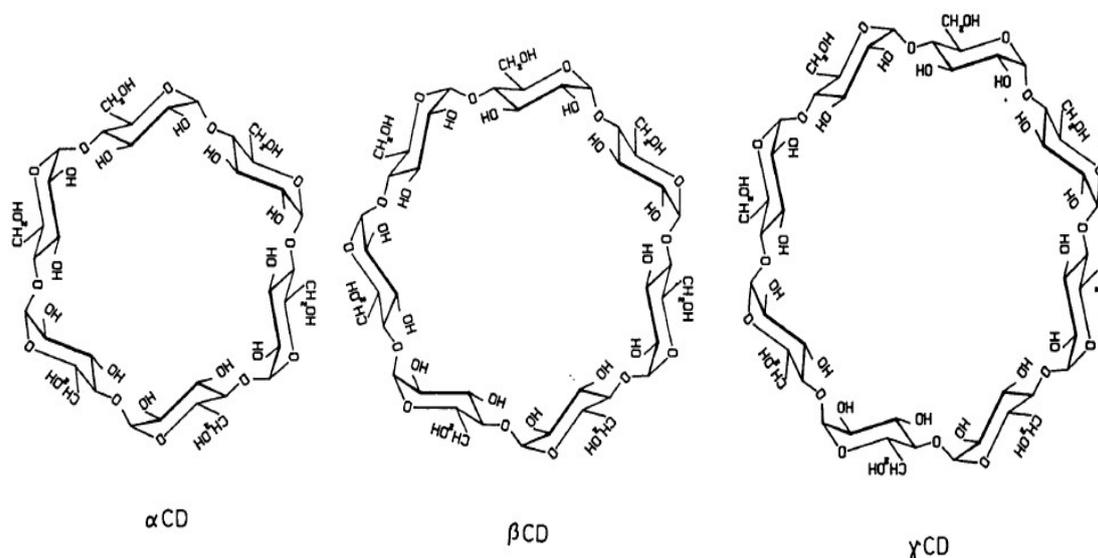


Figura 2. Estrutura da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrina (SZEJTLI, 1988).

Tabela 4. Propriedades físicas e químicas das ciclodextrinas (SÁ BARRETO *et al.*, 2008; SZEJTLI, 1988).

Propriedades	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Unidades de glicose	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Diâmetro da cavidade	0,47-0,53	0,60-0,65	0,75-0,83
Volume da cavidade (nm)	1740	2620	4720
Solubilidade aquosa (25°C) (%)	14,5	1,85	23,2
Moléculas de água na cavidade	6	11	17
Forma cristalina	hexagonal	monoclínica	quadrada
Temperatura de fusão °C	250-260	255-265	240-245
Toxicidade	Sem restrição	Tóxico por via parenteral	Sem restrição

De acordo com Szente *et al.* (2016), existem alguns desafios, ao se analisar as CDs, que devem ser considerados em sua utilização: as CDs, na maioria dos casos, não têm características próprias de absorbância UV para detecção, o que pode afetar o comprimento de onda e o valor de absorbância dos espectros UV e visível de moléculas visitantes e componentes da matriz, podendo ocasionar reações químicas com reagentes.

Contudo, a utilização das CDs como material encapsulante possui diversas vantagens, Venturini (2008) cita a proteção do ingrediente ativo contra oxidação, reações

induzidas pela luz, degradação de substâncias por microorganismo, decomposição pelo calor, volatilidade e sublimação, além disso ocorrem ainda algumas modificações na reatividade do substrato, que inicialmente era hidrofóbico, torna-se hidrofílico quando complexado, e, de acordo com Marques (2010), a redução de higroscopicidade.

### 2.2.1. Complexo de inclusão

Uma das propriedades mais interessantes das CDs é a habilidade de formar complexos de inclusão do tipo hospedeiro/hóspede com uma ampla variedade de moléculas (SZENTE *et al.*, 2016). Esta característica é equivalente ao encapsulamento molecular e é a principal base para a aplicação desse composto nos setores farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos e alimentícios. A inclusão molecular proporciona modificações benéficas nas propriedades físico-químicas das moléculas “hóspede” (MURA, 2014), sendo considerado um método de encapsulação simples e de baixo custo, quando comparado aos outros métodos existentes (MARQUES, 2010).

A principal característica das CDs é sua estrutura cilíndrica, com cavidade interna hidrofóbica e externa hidrofílica, e aberta em ambas as extremidades, que favorece o aprisionamento de uma variedade de moléculas orgânicas, formando assim um complexo de inclusão. As características físico-químicas das CDs (hospedeiro), molécula orgânica (hóspede) e conseqüentemente seus complexos de inclusão são quem determinam a dinâmica do equilíbrio (SÁ BARRETO *et al.*, 2008).

O contato entre as moléculas “hóspede” que ocupam a cavidade interna da ciclodextrina “hospedeira” no complexo de inclusão não é fixo ou permanente, e as ligações são um equilíbrio dinâmico. Desta forma, a força da ligação existente é dependente do quão apropriada é a molécula à cavidade, ou seja, depende do bom encaixe “hospedeiro-hóspede” no complexo, bem como das interações locais entre os átomos da superfície (DEL VALLE, 2004). De acordo com Venturini *et al.* (2008) as forças que influenciam na formação do complexo são decorrentes das características de cada substância.

Os complexos podem ser formados em solução ou no estado cristalino, sendo a água o solvente mais utilizado; todavia, a complexação pode também ser realizada na presença de solvente não aquoso (DEL VALLE, 2004). Na preparação de complexos de inclusão, o etanol é um solvente comum usado juntamente com a água, pois pode ser facilmente deslocado pela molécula hóspede e ser facilmente removido por evaporação (AREE & CHAICHIT, 2003).

De acordo com Del Valle (2004), é importante considerar dois fatores-chave para formação de um complexo de inclusão, relacionados a compatibilidade geométrica e interações termodinâmicas. A figura 3 apresenta um exemplo de complexação, onde as moléculas de água do interior da cavidade da CD são deslocadas para fora, assim que a molécula hidrofóbica hóspede é aprisionada.

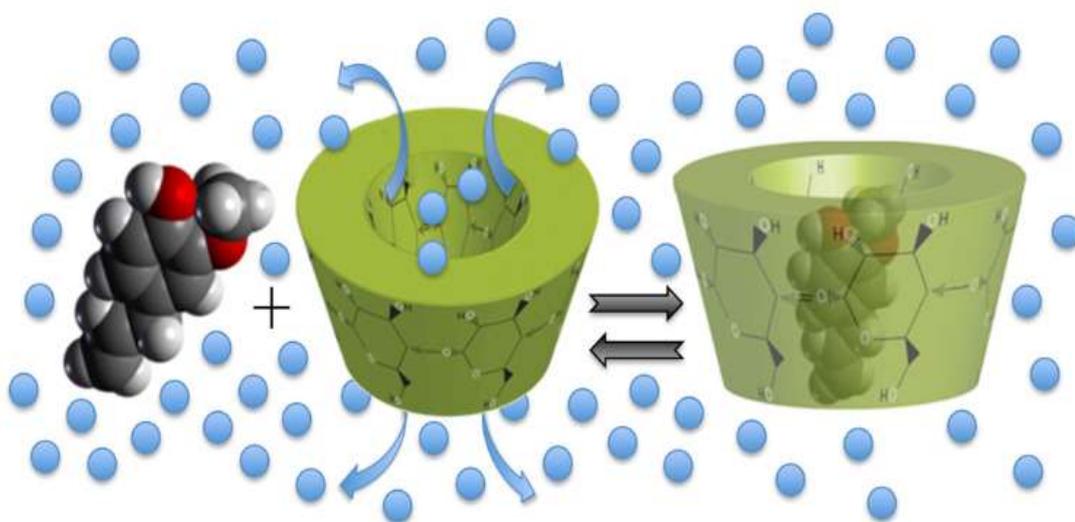


Figura 3. Representação esquemática da formação do complexo de inclusão (MURA, 2014).

As dimensões das moléculas hóspedes devem ser compatíveis com o tamanho da cavidade da ciclodextrina, para que o hóspede seja ‘aprisionado’ de maneira correta. Em relação às interações termodinâmicas entre os componentes do sistema formador do complexo, é necessário uma força motriz capaz de substituir as moléculas de água que ocupam inicialmente a cavidade interna da ciclodextrina, por moléculas ‘hóspede’ apropriadas (DEL VALLE, 2004).

As forças de interação utilizadas para deslocar o equilíbrio para formação do complexo estão relacionadas à polaridade da molécula ‘hóspede’, número de ligações de hidrogênios, redução das forças repulsivas entre os ambientes hidrofóbico e o aquoso, aumento das interações hidrofóbicas à medida que a molécula ‘hóspede’ é inserida na cavidade interna da CD, onde ocorre ajustes conformacionais por forças de Van Der Waals (DEL VALLE, 2004).

Moléculas (hóspedes) hidrofóbicas são incluídas na cavidade da ciclodextrina formando complexos de clivagem, desta forma uma ou mais moléculas hóspedes podem ser capturadas por uma ou duas CDs (DEL VALLE, 2004). Segundo Marques (2010), também

é possível incluir somente parcialmente o ‘hóspede’ na cavidade da CD, de forma que apenas uma parte específica da molécula hóspede fique exposta fora do complexo.

### **2.2.2. Métodos de complexação**

Não existe uma metodologia universal para a preparação dos complexos com ciclodextrina, contudo, os procedimentos existentes são considerados simples (SZEJTLI, 1988). Os métodos mais comuns na preparação de complexos de inclusão são coprecipitação, *slurry*, *kneading* e mistura física, e a quantidade de água utilizada diminui, respectivamente, a cada método (HEDGES, 1998).

#### **2.2.2.1. Coprecipitação**

Este método é geralmente utilizado em ensaios laboratoriais. A técnica consiste em adição da molécula ‘hóspede’, ou sua solução, em solução aquosa de ciclodextrina, sob agitação e aquecimento, para que a CD seja completamente dissolvida. O equilíbrio do complexo é atingido sob resfriamento lento (SZEJTLI, 1988; HEDGES, 1998). Após, a água presente pode ser removida por liofilização, secagem por pulverização ou qualquer outro método (SZEJTLI, 1988).

A coprecipitação possui como vantagem a facilidade de observação da formação do complexo, pela inclusão do “hospede” na cavidade interna da CD, todavia, é somente utilizado para produção em escala laboratorial, pois faz uso de uma quantidade elevada de água. Sua utilização permite provar a viabilidade de complexação de uma molécula em particular e posterior caracterização do complexo formado para aplicação em outras metodologias (HEDGES, 1998; DEL VALLE, 2004).

#### **2.2.2.2. Mistura física**

Este método consiste na mistura da ciclodextrina com o “hospede” sem a adição de água (HEDGER, 1998; PATIL, 2010; DELL VALE, 2004). Essa metodologia não é eficiente para fazer complexos de inclusão, pois o tempo de complexação pode levar dias, no entanto, sua utilização é indicada para formar complexos com “hóspedes” líquidos ou óleos, onde o “hospede” serve como solvente para o “hospedeiro” e a complexação é completada mais rapidamente (HEDGER, 1998).

A não necessidade de adicionar água é a principal vantagem do método, a menos que seja necessária uma etapa de lavagem. Como desvantagem, tem-se o risco de complexação

incompleta, devido a falhas na mistura em casos de produção em grande escala (DEL VALLE, 2004).

### **2.2.3. Complexação de ciclodextrina com ácidos orgânicos**

Muitos estudos sugerem a formação de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e ácidos orgânicos, verificando uma interação existente entre os componentes, todavia, essa interação ainda é incerta (BARILLARO *et al.*, 2008), e de difícil interpretação (ZHANG *et al.*, 2010).

Schlenk & Sand (1960) estudaram a associação de ciclodextrinas com ácidos orgânicos de estrutura simples, em solução aquosa, e reportaram que o tamanho e estrutura da molécula orgânica são fatores decisivos para formação do complexo, uma vez que a compatibilidade da molécula hóspede com a cavidade da ciclodextrina, determina a estabilidade do complexo. A estrutura molecular do hóspede pode também interferir na configuração de rotação óptica da CD, e o ácido sórbico possui essa característica, devido à insaturação presente ao longo de sua cadeia estrutural.

A complexação de ácidos orgânicos em ciclodextrinas tem sido amplamente estudada: Complexos de inclusão de ciclodextrina com ácido ascórbico (SAHA *et al.*, 2016), ácido maleico, fumárico e tartárico (BARILLARO *et al.*, 2008), ácido cinâmico (UEKAMA *et al.*, 1975), ácido benzóico (SALVATIERRA *et al.*, 1996), ácido fórmico e acético (AREE *et al.*, 2003), além do ácido sórbico (ZHANG *et al.*, 2010), que objetivou a caracterização estrutural do complexo de inclusão contendo o ácido sórbico.

### **2.2.4. Caracterização do complexo**

A caracterização dos complexos de inclusão é de fundamental importância e visa melhorar sua aplicabilidade. A necessidade de informações mais profundas sobre os complexos é necessária para melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na inclusão tipo “hospedeiro-hóspede”. Para a caracterização é requerida a utilização de vários métodos analíticos diferentes, uma vez que cada técnica explora uma característica específica do complexo e baseia-se na detecção de qualquer variação das propriedades físicas e químicas do ‘hóspede’, ocasionadas pela formação do complexo de inclusão (MURA, 2014). Alguns métodos de caracterização são descritos a seguir:

#### **2.2.4.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR)**

No caso a técnica FTIR-ATR baseia-se no princípio de que a radiação infravermelha é completamente refletida após passar por um prisma de alto índice de refração (MURA, 2015), permitindo a detecção da formação do complexo, e apontando diferentes grupos funcionais tanto na molécula hóspede, como na hospedeira, na complexação, ao analisar as mudanças na forma e posição das bandas de absorbância (CANAVÀ *et al.*, 2008).

#### **2.2.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN-H<sup>1</sup>)**

O método de RMN-H<sup>1</sup> é considerado completo em relação às informações obtidas na investigação das interações entre CDs e o hóspede. Os espectros fornecem informações específicas sobre a estrutura do complexo e sua orientação dentro da cavidade (MURA, 2014). A formação do complexo de inclusão resulta em desvios dos prótons C3-H e C5-H para o interior da cavidade, devido à inclusão da molécula 'hóspede'. Já os prótons C1-H, C2-H e C4-H não sofrem alterações, permanecendo no exterior da cavidade (SZEJTLI, 1988).

### **2.3. FILMES BIODEGRADÁVEIS ATIVOS**

Diferente das embalagens convencionais, que tradicionalmente atuam somente como barreira passiva aos efeitos do ambiente, de modo a separar o produto embalado do meio externo, as embalagens ativas são projetadas para interagir com o produto embalado e prolongar sua vida útil (FENYVESI *et al.*, 2018; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2016).

O material que constitui o sistema de embalagem ativo pode conter compostos antimicrobianos ou outros compostos, que são liberados do revestimento, para desempenhar suas funções e retardar a degradação do alimento, inibindo a proliferação de microrganismos (FENYVESI *et al.*, 2018; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2016). Desta forma, a quantidade de compostos antimicrobianos é reduzida, considerando a quantidade geralmente incorporada diretamente nas formulações dos produtos alimentícios (GHANSENLOU *et al.*, 2013).

Agentes antimicrobianos têm sido aplicados em filmes e/ou revestimentos alimentícios como forma de elevar a eficiência no controle da segurança alimentar, quanto à contaminação dos alimentos. São geralmente incorporados em polímeros para a produção de embalagens ativas o ácido sórbico e seus sais de potássio (SOUSA, 2013). Alguns estudos sobre a incorporação de sorbato em filmes já foram realizados por Rodriguez-Martinez *et al.*

(2016), Hu *et al.* (2017), Dobre *et al.* (2012), Guillard *et al.* (2009), Sousa *et al.* (2013), Sousa *et al.* (2016), Hauser & Wunderlich (2011), Flores *et al.* (2007).

A biodegradabilidade do material de embalagem é de grande importância atualmente, desta maneira, a utilização de polímeros renováveis e inatos, como forma de substituição dos materiais tradicionais utilizados na fabricação de embalagens sintéticos, de origem petrolífera e não biodegradáveis (KUMAR & MAITI, 2015), são uma interessante alternativa. Por exemplo, em especial o uso do amido, considerado biodegradável, comestível, não depende de fontes fósseis e amplamente encontrado na natureza (SADEGHIZADEH-YAZDI *et al.*, 2019).

A substituição de polímeros não degradáveis pela indústria de embalagem plásticas promove benefícios ao meio ambiente, já que o material de descarte se degrada mais facilmente sem acúmulo (CHEVALIER *et al.*, 2018; KUMAR & MAITI, 2016; JARAMILLO *et al.*, 2016).

### 2.3.1. Amido

A funcionalidade e forma do amido variam muito entre espécies botânicas, o que atribui diversas propriedades ao mesmo (COPELAND *et al.*, 2009). Todavia, esse carboidrato é comumente utilizado na indústria alimentícia, com diversas funções, como modificador de textura, viscosidade, adesão, retenção de umidade, formação de gel e filmes (WATERSCHOOT *et al.*, 2015, COPELAND *et al.*, 2009).

Considerado a matéria prima de origem natural mais utilizada pela indústria de embalagens, o amido é utilizado em formulações de filmes biodegradáveis, devido à sua alta disponibilidade e baixo custo (GHASEMLOU *et al.*, 2013; MENDES *et al.*, 2016; BEMILLER & WHISTLER, 2009). Além disso, é produzido em escala industrial, ponto de grande importância para inserção deste, na fabricação de embalagens (LUCHESE *et al.*, 2018).

O amido é um polissarídeo disponível nos vegetais, principalmente em suas raízes e tubérculos (BASIK *et al.*, 2017). Composto por duas macromoléculas: amilose, um polissacarídeo essencialmente linear, e amilopectina, um polissacarídeo ramificado considerado insolúvel em água fria, devido as ligações de hidrogênios que mantem a união das cadeias de amido (DOMENE-LÓPEZ *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2011). Essas duas macromoléculas, embora sejam resíduos de glicose, apresentam diferentes propriedades físico-químicas devido às suas diferentes estruturas (LI *et al.*, 2011), sendo que grande

quantidade de amilose ou amilopectina presente no grânulo afeta de maneira significativa a funcionalidade do amido (GAO *et al.*, 2014).

É um polissacarídeo semi-cristalino (15-45%), sendo esta cristalinidade dependente da proporção de amilose/amilopectina, pois as regiões cristalinas são formadas pelas cadeias curtas ramificadas da amilopectina. Já a amilose propicia, juntamente com as ramificações da amilopectina, uma região amorfa (CAZÓN *et al.*, 2017).

Como forma de obter um filme de amido termoplástico (TPS), deve-se submeter os grânulos de amido à gelatinização com um plastificante, sendo os de uso recorrente monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos (glicose, frutose) e polióis (glicerol, sorbitol) (DOMENE-LÓPEZ *et al.*, 2019). A incorporação de outros biopolímeros e plastificantes é a solução encontrada, de modo a superar as fragilidades, problemas mecânicos e de propriedades de barreira de vapor de água dos filmes obtidos de polímeros biodegradáveis (TANG *et al.*, 2012).

### 2.3.2. Processo de extrusão

Existem diversas técnicas que podem ser empregadas na produção de filmes biodegradáveis, são exemplo: casting, extrusão, calandragem, moldagem por injeção, entre outros (OTONI *et al.*, 2017).

A extrusão consiste em um processo termomecânico, onde os materiais são física e quimicamente transformados, quando submetidos a tensões térmicas e mecânicas, geradas pelos parafusos rotativos e os barris aquecidos (EMIN *et al.*, 2016).

A técnica de extrusão é utilizada a fim de viabilizar a produção de filmes de amido em escala industrial, onde emprega-se processo contínuo com baixa quantidade de água, alta temperatura e forças de cisalhamento que garantem a transformação dos grânulos de amido em amido termoplástico (JI *et al.*, 2017).

A gelatinização e a fusão são dois fenômenos utilizados para a obtenção de um material termoplástico a partir do amido, para a produção de filmes. Esses processos possibilitam a destruição da organização dos grânulos de amido, obtendo-se assim uma matriz polimérica homogênea e amorfa (BALAN, 2013).

No processamento de filmes de amido termoplásticos (TPS) pode ser utilizada técnica de extrusão por sopro (figura 4), onde o TPS é expandido por sopro em uma forma tubular. A adição de plastificantes, capazes de diminuir a temperatura de fusão do amido e aumentar a flexibilidade do mesmo é necessária para a produção de filmes mais elásticos e menos quebradiços (BRANDELEIRO *et al.*, 2010). Além disso, promove mudanças

estruturais no amido, como gelatinização, fusão e fragmentação (MARTINEZ *et al.*, 2014a, 2014b).

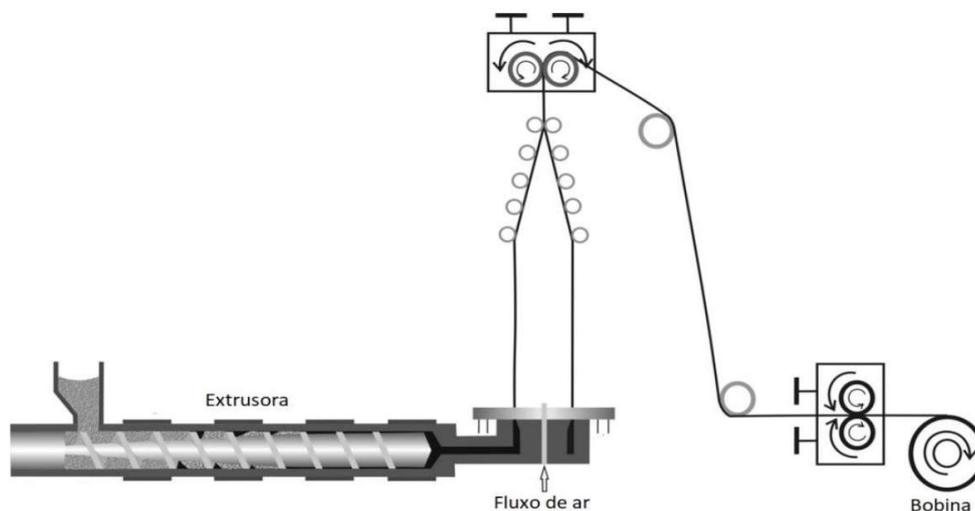


Figura 4. Diagrama de fluxo de processamento de filme com extrusão por sopro (Adaptado LI *et al.*, 2014).

### 2.3.3. Propriedades do filme

#### 2.3.3.1. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade consiste no transporte de gases e vapores através da embalagem, sendo resultado dos efeitos da solubilidade e difusão das moléculas de vapor. Na etapa de solubilidade o permeado se dissolve na matriz do filme na parte superior, difundindo-se através do filme, impulsionado por um gradiente de concentração, e evapora do outro lado da superfície. A diferença na solubilidade de gases pode influenciar na difusividade dos gases através do filme. A segunda etapa, difusão, é dependente do tamanho, forma e polaridade da molécula penetrante, grau de reticulação e movimento da cadeia polimérica (SIRACUSA, 2012).

#### 2.3.3.2. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes constituídos de amido, são de grande importância, pois são as que mais podem restringir a aplicação dos filmes poliméricos (CARMO & PAIVA 2015). Essas propriedades podem mudar significativamente com alterações de temperatura e umidade durante realização dos testes, do mesmo modo para as embalagens sintéticas tradicionais (MALI, 2010).

### **2.3.3.2.1. Módulo de elasticidade**

O módulo de elasticidade, também conhecido como módulo de Young ( $E$ ) é um indicador da rigidez do filme. Quanto maior for o módulo, menor será deformação elástica resultante da aplicação de uma tensão (CALLISTER, 2007). Corresponde à parte linear referente a uma curva tensão-deformação, em que a deformação que o material sofre ainda é considerada reversível (ASTM, 2009).

### **2.3.3.2.2. Elongação na ruptura**

A elongação na ruptura ( $\epsilon$ ) trata-se da forma como o material pode deformar-se até a ruptura, deformação total, relacionado à variação no comprimento (CALLISTER, 2007).

### **2.3.3.2.3. Tensão máxima**

A tensão máxima na ruptura ( $\sigma$ ) é a resistência oferecida pelo material no ponto de ruptura (CALLISTER, 2007).

### **2.3.3.2.4. Espessura**

Este parâmetro é muito importante nas análises de filmes plásticos e é definido como a distância entre as duas superfícies do material. Atráves desta propriedade é possível obter informações sobre a homogeneidade de um filme, bem como de suas propriedades mecânicas e de barreiras (CETEA, 1996)

### **2.3.3.2.5. Cor**

A imagem de um produto está sempre relacionado à cor e ao brilho das embalagens, uma vez que é a única forma de exposição ao consumidor antes da sua compra (MARCH & BUGUSU, 2007; COSTA, 2008)

Geralmente, filmes que utilizam como base o amido, apresentam certa opacidade ou barreira à transmissão de luz. Quando adicionados de materiais como: proteínas, lipídios, plastificantes e emulsificantes, sofrem reações que resultam em mudanças de cor (SAKANAKA, 2007).

## **2.3.4. Atividade Antimicrobiana**

### **2.3.4.1. Teste de halo**

É um teste de sensibilidade antimicrobiano que mede a capacidade de um agente antimicrobiano em inibir o crescimento de bactérias *in vitro* (WHO, 2006)

## REFERÊNCIAS

AL-DAGAL, M. M.; BAZARAA, W. A. Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, v. 62, n. 1, p. 51-56, 1999.

AREE, T.; CHAICHIT, N. A new crystal form of  $\beta$ -cyclodextrin-ethanol inclusion complex: channel-type structure without long guest molecules. *Carbohydrate Research*, v. 338, p. 1581-1589, 2003.

AREE, T.; SCHULZ, B.; RECK, G. Crystal structures of  $\beta$ -cyclodextrin complexes with formic acid and acetic acid. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 47, p. 39-45, 2003.

ARYA, S. S. Stability of sorbic acid in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 28, n. 6, 1980.

ASTM – American Society for Testing and Materials. **Standart test method for tensile properties of thin plastic sheeting – D882-09**. Pennsylvania, 2009.

BALAN, G. C. **Elaboração e aplicação de filme a base de amido na conservação de queijo tipo mussarela**. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.

BARILLARO, V.; DIVE, G.; BERTHOLET, P. et al. Theoretical and experimental investigations of organic acids/cyclodextrin complexes and their consequences upon the formation of miconazole/cyclodextrin/acid ternary inclusion complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 347, p. 62-70, 2008.

BASIAK, E.; LENART, A.; DEBEAUFORT, F. Effect of starch type on the physico-chemical properties of edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 98, p. 348–356, 2017

BELL, T. A.; ETCHELLS, J. L.; BORG, A. F. Influence of sorbic acid on the growth of certain species of bacteria, yeasts, and filamentous fungi. *Journal of Bacteriology*, v. 77, n. 5, p. 573-580, 1959.

BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch: chemistry and technology**. 3rd ed. [S.l.]: Elsevier, 2009.

BRANDELEIRO, R. P. H.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. The effect of surfactant Tween 80 on the hydrophilicity, water vapor permeation, and the mechanical properties of cassava starch and poly(butylene adipate-coterephthalate) (PBAT) blend films. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 1102–1109, 2010.

CALLISTER JR, W. D.; **Materials Science and Engineering: An Introduction**; Wiley:New York, 2007.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N. Effect of certain additives on sorbate stability. *Food Research International*, v. 29, n. 2, p. 147-154, 1996.

CANAVÀ, C.; CRUPI, V.; FICARRA, P. et al. Physicochemical characterization of coumestrol/ $\beta$ -cyclodextrins inclusion complex by UV-vis and FTIR-ATR spectroscopies. *Vibrational Spectroscopy*, v. 48, p. 172-178, 2008.

CARMO, K. P.; PAIVA, J. M. F. Filmes biodegradáveis de amido e composições com outros materiais. *Revista Virtual de Química*, v.7, n. 6, p. 2377-2386, 2015.

CAZÓN, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A. et al. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: a review. *Food Hydrocolloids*, v. 68, p. 136-148, 2017.

CENTRO DE TECNOLOGIA DE EMBALAGENS – CETEA. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis**. Campinas, p. 2019, 1996.

CHEVALIER, E.; ASSEZAT, G.; PROCHAZKA, F. et al. Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration. *Food Hydrocolloids*, v. 75, p. 182-191, 2018.

CHICHESTER, D. F.; TANNER JR, F. W. **Handbook of food additives**. 2. ed. Cleveland: CRC Press LLC, 1972.

COPELAND, J. L.; BLAZEK, H.; SALMAN, M.C. Tang, Form and functionality of starch, *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 1527–1534, 2009.

COSTA, D. L. M. G. **Produção por extrusão de filmes de alto teor de amido termoplástico de mandioca com poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT)**. 2008. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in food**. Chapters 1 (3rd ed.). Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2005

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, v.39, p. 1033-1046, 2004.

DOBRE, L.; STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M. et al. Modelling of sorbic acid diffusion through bacterial cellulose-based antimicrobial films. *Chemical Papers*, v. 66, n. 2, p. 144-151, 2012.

DOMENE-LÓPEZ, D.; GARCÍA-QUESADA, J. C.; MARTIN-GULLON, I. et al. Influence of starch composition and molecular weight on physicochemical properties of biodegradable films. *Polymers*, v. 11, 2019.

EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), 2015. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. *EFSA Journal*, v. 13, n. 6, p. 91, 2015.

EFSA FAF Panel (EFSA Panel on Food Additives and Flavourings); YOUNES M.; AQUILINA G.; et al. Scientific Opinion on the follow-up of the re-evaluation of sorbic acid (E200) and potassium sorbate (E202) as food additives. *EFSA Journal*, v. 17, n. 3, p. 21, 2019.

EMIN, M. A.; TEUMER, T.; SCHMITT, W.; et al. Measurement of the true melt temperature in a twin-screw extrusion processing of starch based matrices via infrared sensor. *Journal of Food Engineering*, v. 170, p. 119-124, 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United States. Evaluation of Food Additives. **FAO/WHO**, Geneva, Italy. 1970.

FENYVESI, É.; SZENTE, L. Cyclodextrin-enabled polymer composites for packaging. *Molecules*, v. 23, 2018.

FINOL, M. L.; MARTH, E. H.; LINDSAY, R. C. Depletion of sorbate from different media during growth of *penicillium* species. *Journal of Protection*, v. 45, n. 5, p. 398-404, 1982.

FLORES, S.; HAEDO, A. S.; CAMPOS, C. et al. Antimicrobial performance of potassium sorbate supported in tapioca starch edible films. *European Food Research and Technology*, v. 225, p. 375-384, 2007.

GAO, H.; CAI, J.; HAN, W.; et al. Comparison of starches isolated from three different *Trapa* species. *Food Hydrocolloids*, v. 37, p. 174-181, 2014.

GHASEMLOU, M. et al. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate Polymer*, v. 98, p. 1117-1126, 2013.

GLIEMMO, M. F.; CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N. Interaction between potassium sorbate and aspartame in aqueous model sugar systems. *Journal of Food Science*, v. 66, n. 3, p. 428-431, 2001.

GUILLARD, V.; ISSOUPOV, V.; REDL, A. et al. Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 10, p. 108-115, 2009.

HAUSER, C.; WUNDERLICH, J.; Antimicrobial packaging films with a sorbic acid based coating. *Procedia Food Science*, v. 1, p. 197-202, 2011.

HEDGES, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, v. 98, p. 2035-2044, 1998.

HU, S.; YU, J.; WANG, Z. et al. Effects of sorbic acid-chitosan microcapsules as antimicrobial agent on the properties of ethylene vinyl alcohol copolymer film for food packaging. *Journal of Food Science*, v. 82, n. 6, 2017.

HUANG, Y.; WILSON, M.; CHAPMAN, B. et al. Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems. *Food microbiology*, v. 27, p. 33-36, 2010.

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, p. 150-159, 2016.

JI, Z.; YU, L.; LIU, H. et al. Effect of pressure with shear stress on gelatinization of starches with different amylose/amylopectin ratios. *Food Hydrocolloids*, v. 72, p. 331-337, 2017.

KUMAR, S.; MAITI, P. Controlled biodegradation of polymers using nanoparticles and its application. *Royal Society of Chemistry*, v. 76, p. 25-33, 2015.

KUMAR, S.; MAITI, P. Understanding the controlled biodegradation of polymers using nanoclays. *Polymer*, v. 6, p. 67449–67480, 2016.

LI, H.; CHANG, J.; QIN, Y. et al. Poly(lactide-co-trimethylene carbonate) and polylactide/polytrimethylene carbonate blown films. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, p. 2608-2621, 2014.

LI, P. M.; LIU, Z.; WEI, L. et al. Extrusion processing and characterization of edible starch films with different amylose contents. *Journal of Food Engineering*, v. 106, p. 95-101, 2011.

LIEWEN, M. B.; MARTH, E. H. Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: a review. *Journal of Food Protection*, v. 48, n. 4, p. 364-375, 1985.

LOPES, I.C.; SANTOS, P. V. F.; DICULESCY, V. C. et al. Sorbic acid and its degradation products: electrochemical characterization. *Analytical Letters*, v. 45, p. 408-417, 2012.

LUCHESE, C. L.; BENELLI, P.; SPADA, J. C. et al. Impact of the starch source on the physicochemical properties and biodegradability of different starch-based films. *Journal Applied Polymer Science*, v. 135, p. 46564, 2018.

LUCK, E.; JAGER, M. **Antimicrobial Food Additives**: characteristics, uses e effects. 2. ed. Berlin: Springer, 1997.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n.1, p. 137-156, 2010.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 25, p. 313-326, 2010.

MARSH, K.; BUGUSU, B. Food packaging: roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 72, n.3, p. R39-R55, 2007.

MARTH, E. H.; CAPP, C. M.; HASENZAH., L. et al. Degradation of potassium sorbate by *Penicillium* species. *Journal of Dairy Science*, v. 49, p. 1197-1205, 1966.

MARTINEZ, M.M. CALVIÑO, A. ROSELL, C.M. GOMEZ, M. Effect of different extrusion treatments and particle size distribution on the physicochemical properties of rice flour. *Food Bioprocess Technol.*, v. 7, p. 2657-2665, 2014a.

MARTINEZ, M. M.; ROSELL, C. M.; GOMEZ, M. Modification of wheat flour functionality and digestibility through different extrusion conditions. *Journal of Food Engineering*, v. 143, p. 74-79, 2014b.

MENDES, J. F.; PASCHOALIN, R.; CARMONA, V. B. et al. Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion. *Carbohydrate Polymers*, v. 137, p. 452–458, 2016.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 101, p. 238-250, 2014.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complex in the solid state: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 113, p. 226-238, 2015.

OTONI, C. G.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; AZEREDO, H. M. C. et al. Recent advances on edible films based on fruits and vegetables – a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 2017.

PATIL, J. S.; KADAM, D. V.; MARAPUR, S. C. et al. Inclusion complex system; a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v. 2, p. 29-34, 2010.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, A. V.; SENDÓN, R.; ABAD, M. J. et al. Migration kinetics of sorbic acid from polylactic acid and seaweed based films into food simulants. *LWT- Food Science and Technology*, v. 65, p. 630-636, 2016.

SÁ BARRETO, L. C. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: Importante excipiente farmacêutico funcional. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n. 4, p. 629-636, 2008.

SADEGHIZADEH-YAZDI, J.; HABIBI, M.; KAMALI, A. A. et al. Application of edible and biodegradable starch-based films in food packaging: a systematic review and meta-analysis. *Current Research in Nutrition and Food Science*, v. 7, 2019.

SAHA, S.; ROY, A.; ROY, K. et al. Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with vitamin molecules. *Scientific Reports*, v. 6, 2016.

SAKANAKA, L. S. **Confecção de filmes biodegradáveis por extrusão de blendas de amido termoplástico e polibutileno succinato co-adipato (PBSA)**. Londrina, 2007. Tese de doutorado (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.

SALVATIERRA, D.; JAIME, C.; VIRGILI, A. et al. Determination of the inclusion geometry for the  $\beta$ -cyclodextrin/benzoic acid complex by nmr and molecular modeling. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 61, n. 26, p. 9578-9581, 1996.

SAXBY, M. J.; STEPHENS, M. A.; REID, R. G. Degradation of sorbic acid in model food systems. *Food Chemistry*, v. 9, p. 283-287, 1982.

SCLLENK, H.; SAND, D. M. The association of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins with organic acids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 63, n. 10, p. 2312-2320, 1961.

SEOW, C. C.; CHEAH, P. B. Kinetics of degradation of sorbic acid in aqueous glycerol solutions. *Food Chemistry*, v. 17, 1985.

SILVEIRA, M. F. A.; SOARES, N. F. F.; GERALDINE, R. M. et al. Active film incorporated with sorbic acid on pastry dough conservation. *Food Control*, v. 18, p. 1063-1067, 2007.

SIRACUSA, V. Food packaging permeability behaviour: a report. *International Journal of Polymer Science*, v. 2012, 2012.

SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. Antimicrobial activity of sorbate. *Journal of Food Protection*, v. 44, n. 8, 1981.

SOFOS, J. N.; PIERSON, M. D.; BLOCHER, J. C. et al. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*, v. 3, p. 1-17, 1986.

SOUSA, G. M.; JÚNIOR SOARES, M. S.; YAMASHITA, F. Active biodegradable films produced with blends of rice flour and poly(butylene adipate co-terephthalate): Effect of potassium sorbate on film characteristics. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, p. 3153-3159, 2013.

SOUSA, G. M.; YAMASHITA, F.; JÚNIOR, M. S. S. Application of biodegradable films made from rice flour, poly(butylene adipate-co-terephthalate), glycerol and potassium sorbate in the preservation of fresh food pastas. *LWT-Food Science and Technology*, v. 65, p. 39-45, 2016.

STOPFORTH, J. D.; SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. **Antimicrobials in food**. Chapters 3(3rd ed.). Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2005.

STRATFORD, M.; NEBE-VON-CARON, G.; STEELS, H. et al. Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 161, p. 164-171, 2013.

SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*, V. 76, n. 10, pp. 1825-1845, 2004.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 79-173, 1988.

SZENTE, L.; ZZEMÁN, J.; SOHAJDA, T. Analytical characterization of cyclodextrins: history, official methods and recommended new techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 130, p. 347-365, 2016.

TANG, X. Z.; KUMAR, P.; ALAVI, S. et al. Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 52, n. 5, p. 426-442, 2012.

UEKAMA, K.; OTAGIRI, M.; KANIE, Y. et al. Inclusion complexes of cinnamic acids with cyclodextrins – mode of inclusion in aqueous solution. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 23, n. 7, p. 1421-1430, 1975.

VIKAS, Y.; SANDEEP, K.; BRAHAM, D. et al. Cyclodextrin complexes: an approach to improve the physicochemical properties of drugs and applications of cyclodextrin complexes. *Asian Journal of Pharmaceutics*, v. 12, 2018.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

WANG, L.; ZHENG, W.; CHEN, S. et al. Development of rectal delivered thermo-reversible gelling film encapsulating a 5-fluorouracil hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex. *Carbohydrate Polymers*, v. 137, 2016.

WATERSCHOOT, J.; GOMAND, S. V.; FIERENS, E. et al. Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. *Starch/Staerke*, v. 67, n. 1-2, p. 14-29, 2015.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial Susceptibility Testing. Disponível na internet em < <http://w3.who.sea.org/microbio/ch7.htm> >. Acesso em 09/fev/2020.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; LIU, W. et al. Characterization of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin with sorbic acid in the solid state and in aqueous solution. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 67, 2010.

### CAPITULO iii

## MICROCÁPSULA DE ÁCIDO SÓRBICO: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM FILME BIODEGRADÁVEL

Catarina de M. Oliveira, Rita de C. Bergamasco

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia de Alimentos, Av. Colombo 5700, Maringá, Brasil

### RESUMO

Microcápsulas de ácido sórbico foram preparadas por inclusão molecular em  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), utilizando a técnica de coprecipitação, caracterizadas e aplicadas em filme biodegradável ativo. Para a investigação de formação de complexo de inclusão, foram utilizadas técnicas de Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância magnética nuclear de prótons (RMN- $H^1$ ), que permitiu verificar a interação entre as moléculas de ácido sórbico e  $\beta$ -ciclodextrina e a formação do complexo de inclusão. Além disso, foram realizadas análise da capacidade de carga do complexo e teste de estabilidade térmica, este último indicando que o complexo é capaz de suportar as temperaturas de produção do filme. Os filmes de amido foram elaborados por extrusão, utilizando o ácido sórbico na forma livre (F1) e na forma de complexo de inclusão (F2), e foram submetidos à caracterização quanto à permeabilidade ao vapor de água, não sendo observado diferença significativa entre as duas formulações, e propriedades mecânicas, sendo que a formulação F2 apresentou uma maior capacidade de alongação antes da ruptura quando comparado a F1.

Palavras-chave: Complexo de inclusão. Conservante. Caracterização. RMN. Amido. Filme ativo.

## INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, muitos alimentos são acometidos por contaminação e deterioração, principalmente por fungos, o que ocasiona no descarte de grandes quantidades de alimentos. O desenvolvimento dessa contaminação é visível na superfície do produto, de modo que altera não somente as características de sabor e textura do alimento, mas também sua aparência. Para inibir esse tipo de contaminação, são utilizados alguns compostos considerados conservantes como agente antimicrobiano, entre eles encontra-se o ácido sórbico.<sup>1</sup>

O ácido sórbico (E200) é um aditivo alimentar, que atua como conservante e possui a capacidade de inibir ou retardar o desenvolvimento de numerosos microrganismos, como leveduras, bolores e bactérias,<sup>2</sup> e é considerado um composto seguro e não tóxico, quando em comparação a outros compostos que atuam como conservantes.<sup>3</sup> Contudo, em solução aquosa, o ácido sórbico sofre autooxidação, formando malonaldeído e outras carbonilas, o que pode prejudicar as características sensoriais do alimento em que este é incorporado, além de reduzir a sua ação antimicrobiana.<sup>4</sup> A incorporação deste agente antimicrobiano em embalagens/filmes é um modo de garantir a disponibilidade de suas funções durante a vida de prateleira do produto.<sup>5</sup>

Diferente das embalagens convencionais, que tradicionalmente atuam somente como barreira passiva aos efeitos do ambiente, de modo a separar produto embalado do meio externo, as embalagens ativas são projetadas para interagir com o produto embalado e prolongar sua vida útil. O material que constitui o sistema de embalagem ativo, pode conter compostos antimicrobianos que são liberados do revestimento para desempenhar suas funções e retardar a degradação do alimento, inibindo a proliferação de microrganismos.<sup>5,6</sup> No entanto, as embalagens são, em sua maioria, produzidas sob utilização de altas temperaturas, o que pode acarretar na perda dos ingredientes ativos incorporados; porém,

essa perda pode ser reduzida se o componente ativo for introduzido no filme na forma microencapsulada.<sup>6</sup>

As ciclodextrinas são oligossacarídeos que podem atuar como agentes encapsulantes, pois possuem a capacidade de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de compostos. As aplicações atraem não somente o setor alimentício, mas também os campos farmacêutico, agroquímico e de cosméticos. A complexação formada é capaz de mascarar sabores desagradáveis ou odores, reduzir a volatilização e evaporação de compostos, proteger da luz, oxigênio e interações com outros componentes em sua aplicação.<sup>7</sup>

Diante disto, o objetivo geral deste trabalho foi preparar e caracterizar complexos de inclusão de ácido sórbico em  $\beta$ -ciclodextrina, visando obter melhora nas propriedades físicas do ácido, de modo a facilitar sua aplicabilidade em produtos, como em formulação de filmes biodegradáveis ativos, além de melhorar as propriedades antimicrobianas deste agente conservante.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Preparo do complexo de inclusão.** Seguindo metodologia descrita por Zhang *et al.*<sup>8</sup> na razão molar de 1:1, o ácido sórbico (AS) (USP Quimisul Ltda) e a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) (Roquette®), foram dissolvidos separadamente em etanol (4 mL) e água (96 mL), respectivamente. Em seguida, as soluções foram misturadas, mantendo-as sob agitação a 70 °C/2 h. Ao fim, a solução foi filtrada e deixada para resfriar à temperatura ambiente (25°C). O filtrado foi colocado em placas de Petri para evaporar espontaneamente, a temperatura de 25°C. Após 4 dias, os cristais incolores foram obtidos e armazenados para posterior análise.

Uma mistura física (MS) entre o AS e a  $\beta$ -CD, na razão molar de 1:1, foi homogeneizada manualmente em placa de Petri e armazenada em frasco fechado para posterior análise. A mistura física foi preparada para efeito de comparação.

**Extração e quantificação do AS do complexo de inclusão.** A extração do ácido sórbico complexado foi realizada com 0,1g do suposto complexo de inclusão em 10 mL de água, à temperatura ambiente (25 °C), sob constante agitação, durante 60 minutos. Alíquotas da amostra (0,3 mL) foram coletadas nos tempos 0, 5, 15, 30, 45 e 60 minutos, e adicionadas a 100 mL de água destilada, sendo desta recolhido 2 mL para a quantificação do AS. A cada retirada de alíquota da solução, um mesmo volume de água destilada era adicionado, para manter o equilíbrio da solução.

A quantificação do AS foi determinada tendo como base a metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz<sup>9</sup>, onde verificou-se a oxidação do ácido sórbico em reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico, com posterior leitura espectrofotométrica a 530 nm. Uma curva de calibração foi preparada na concentração de  $\mu\text{g AS}/6 \text{ mL}$ .

**Capacidade de carga do AS.** A capacidade de carga de ácido sórbico no complexo de inclusão AS-CD foi calculada usando a Equação (1):

$$CC = \frac{CAS}{CP} \quad \text{Eq. (1)}$$

na qual, o CC corresponde à capacidade de carga do AS (mg AS/g CD), CAS é a quantidade de AS extraída do complexo (mg) e CP é a quantidade de ciclodextrina inicial no pó (g).

**Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR).** O complexo de inclusão e as substâncias puras foram analisadas por um espectrofotômetro FT-IR (Vertex 70v modelo, Bruker, Alemanha), onde as amostras foram colocadas em contato com a superfície refletora do cristal ATR, e os espectros foram registrados na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , com utilização de acessório para Reflectância Total Atenuada (ATR). Os dados obtidos foram padronizados por meio de normalização.

**Ressonância magnética nuclear de prótons (RMN- $^1\text{H}$ ).** Os componentes puros (ácido sórbico e  $\beta$ -ciclodextrina), a mistura física e o complexo de inclusão foram dissolvidos, separadamente, em solvente deuterado Dimetilsulfóxido (DMSO), e submetidos

a estudos de ressonância magnética nuclear de próton, em equipamento espectrômetro Varian modelo Oxford 300, operando em 300MHz, e à temperatura ambiente (25 °C).

O deslocamento de prótons,  $\Delta\delta$ , foi determinado utilizando a Equação (2):

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\text{complexo/mistura}} - \Delta\delta_{\text{livre}} \quad \text{Eq. (2)}$$

**Teste de estabilidade térmica.** A estabilidade térmica das amostras de AS livre e do complexo de inclusão, foi avaliada em diferentes temperaturas (40, 60, 90 e 120 °C). Quantias de 0,01g de AS e 0,1g de complexo foram colocadas em placas de Petri e levadas à estufa durante 1 hora de exposição em cada temperatura testada. Em seguida, o AS remanescente era quantificado por reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico, com posterior leitura espectrofotométrica a 530 nm. No caso da amostra contendo o complexo de inclusão, o AS era, primeiramente, extraído do complexo, seguido da quantificação.

**Produção do filme biodegradável.** O preparo do filme biodegradável foi baseado na metodologia de Cestari e colaboradores.<sup>10</sup> Foram preparadas duas formulações de filmes (Tabela 1), e as misturas foram extrusadas para produção de pellets, em extrusora piloto monorosca, BGM, modelo EL-25 (São Paulo, Brasil), com 3 zonas de aquecimento 90, 120 e 105° C, e com a velocidade da rosca a 35 rpm. Os pellets foram novamente extrusados para obtenção dos filmes por sopro (balão).

Tabela 1. Formulação dos filmes de amido contendo ácido sórbico livre (F1) e microencapsulado (F2).

Composição	F1 (%)	F2 (%)
PBAT	40	40
Glicerol	13	13
Amido de Mandioca	46	37
Ácido Sórbico	1	10*

PBAT: Poli (butileno adipato co-tireftalato); \*10%: sendo 1% referente ao ácido sórbico e 9% do carreador  $\beta$ -ciclodextrina, em relação à formulação total.

**Espessura.** As espessuras dos filmes foram obtidas manualmente, com a utilização de um micrômetro digital (Mitutoyo, resolução 0,001 mm – São Paulo/SP). Foram avaliados pontos aleatórios da área de cada amostra, e o resultado final foi a média aritmética de 3 medidas.

**Propriedades mecânicas.** As amostras foram armazenadas em um dessecador, sob 53% de umidade relativa e a 25 °C, por 72 horas. As propriedades de tração foram determinadas usando um analisador de textura Stable Micro Systems (modelo TAXT2i - Inglaterra), de acordo com American Society for Testing and Material (ASTM D - 882 - 91).<sup>11</sup> As amostras foram cortadas em tiras de 80 mm de comprimento por 15 mm de largura, e ajustadas a apertos pneumáticos do texturômetro. Foram realizadas 10 análises para cada amostra. As garras estavam espaçadas 40 mm e a velocidade de tração de 500 mm/min. As propriedades investigadas foram: resistência máxima à tração na ruptura (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de elasticidade (MPa).

**Permeabilidade ao vapor de água (PVA).** A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada pelo método gravimétrico, seguindo o protocolo da American Society for Testing and Material (ASTM E96 – 95),<sup>12</sup> com modificações. As amostras foram fixadas em cápsulas de alumínio contendo em seu interior cloreto de cálcio anidro (0% UR), e acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de nitrato de magnésio (53% UR), a uma temperatura de 25 ± 2 °C, por 72 h. Pesagens periódicas foram realizadas até que a taxa de ganho de massa fosse constante. A PVA foi calculada utilizando a expressão (3):

$$PVA = \left( \frac{(m/t)*e}{P_s*A*\Delta UR} \right) \quad \text{Eq.(3)}$$

em que, (m/t) é o coeficiente angular da reta de ganho de massa (g) versus tempo (h),  $P_s$  é a pressão de vapor da água saturada (Pa) à temperatura específica (25 °C);  $\Delta UR = UR1 - UR2$ , sendo UR1 a umidade relativa dentro do dessecador, e UR2 a umidade relativa dentro

da célula de permeação;  $e$  é a espessura do filme (m). Todos os testes foram realizados em triplicata.

**Colorimetria.** As amostras de filmes foram avaliadas quanto a cor, por meio de um colorímetro (Minolta CR 400, Japão), com D65 (luz do dia), e usando-se os padrões CIEL\*a\*b\*. Os filmes foram colocados sobre uma superfície branca, e procedeu-se às leituras, realizadas em triplicata. A diferença de cor ( $\Delta E^*$ ) foi obtida a partir da equação 4:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5} \quad \text{Eq.(4)}$$

em que,  $\Delta L^* = L^* (F1) - L^* (F2)$ ,  $\Delta a^* = a^* (F1) - a^* (F2)$ , e  $\Delta b^* = b^* (F1) - b^* (F2)$ .

O maior valor de  $\Delta E^*$  corresponde à maior diferença entre duas cores: imperceptível ( $\Delta E^* < 1$ ), mínima ( $1 \leq \Delta E^* < 2$ ), apenas perceptível ( $2 \leq \Delta E^* < 3$ ), perceptível ( $3 \leq \Delta E^* < 5$ ), diferença forte ( $5 \leq \Delta E^* < 12$ ), cor diferente ( $\Delta E^* \geq 12$ ).<sup>13</sup>

#### **Determinação da atividade antimicrobiana do filme**

**Teste de difusão em halo.** Os testes de disco-difusão, são baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, considerando o tamanho do mesmo. A metodologia de disco-difusão foi realizada de acordo com as instruções descritas no NCCLS.<sup>14</sup> As bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua* foram submetidas à sensibilidade ao agente antimicrobiano presente nos filmes.

**Análise estatística de dados.** Os dados referentes aos filmes foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e os resultados estatisticamente diferentes foram avaliados pelo teste de Tukey, considerando um intervalo de confiança de  $P < 0,05$ . O software utilizado foi o R Studio®, versão 1.2.5019.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A quantidade de AS extraído do suposto complexo de inclusão correspondeu a cerca de 104 mg AS / g pó, num tempo de extração de 5 minutos (Figura 1). Uma redução da

quantidade de ácido sórbico em solução, durante a extração, pode ser observada após os 5 primeiros minutos do processo, em que provavelmente tem-se o início da oxidação do composto, pois o ácido sórbico possui alta instabilidade em soluções aquosas,<sup>4,15</sup> o que pode explicar a queda evidenciada na Figura 1, já que o solvente utilizado para a extração do ácido foi água destilada. Arya<sup>15</sup> reporta que a degradação oxidativa em soluções aquosas ocorrem somente em moléculas de ácido sórbico não dissociadas.

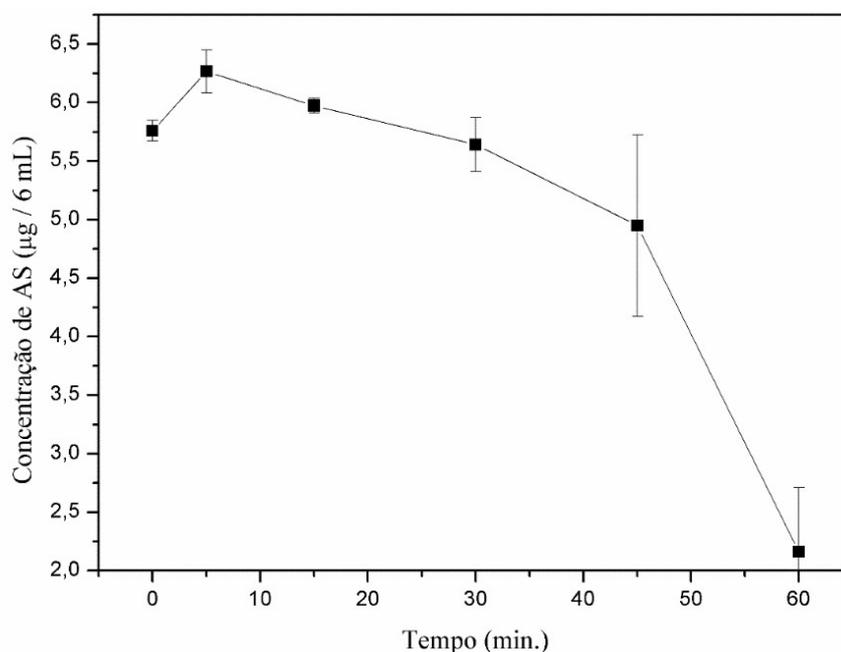


Figura 1. Curva de extração do ácido sórbico complexado.

Considerando as proporções hóspede:hospedeiro usadas no preparo do complexo de inclusão, tem-se 115,9 mg AS/g  $\beta$ -CD. Este resultado foi próximo à quantidade de compostos utilizados na complexação (0,1 g de AS/1 g de  $\beta$ -CD), como já previsto, pois o produto é composto dos componentes puros (ácido sórbico e  $\beta$ -CD), além do complexo de inclusão.

Numa tentativa de separar os componentes puros do complexo de inclusão, o produto obtido após a evaporação espontânea dos solventes, foi lavado com etanol e água destilada, seguido da secagem em temperatura ambiente, 25 °C. Após a secagem, o produto resultante

já não apresentava a característica de um pó cristalino, como um complexo de inclusão, mas o aspecto de uma mistura física. Esta hipótese foi confirmada com uma análise de RMN- $H^1$  deste pó (dados não apresentados), em que não foi observado interação entre os prótons da ciclodextrina e do ácido sórbico. Como o ácido sórbico é uma molécula alifática, de baixo peso molecular, ela tem facilidade de se deslocar da cavidade da  $\beta$ -CD, e esta lavagem do produto pode ter acarretado no seu deslocamento para fora da cavidade da ciclodextrina.

**Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).** O método espectroscópico FTIR para a investigação de compostos hóspede:hospedeiro, investiga as mudanças espectrais do grupo de átomos envolvidos nas interações.<sup>16</sup> Essas mudanças espectrais podem comprovar a complexação entre ácido sórbico e a  $\beta$ -ciclodextrina. Para Mura,<sup>17</sup> a semelhança entre o suposto complexo e a CD indicam a formação do complexo de inclusão. A Figura 2 apresenta os espectros do ácido sórbico (AS),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) suposto complexo de inclusão ( $\beta$ -CDAS) e a mistura física (MS).

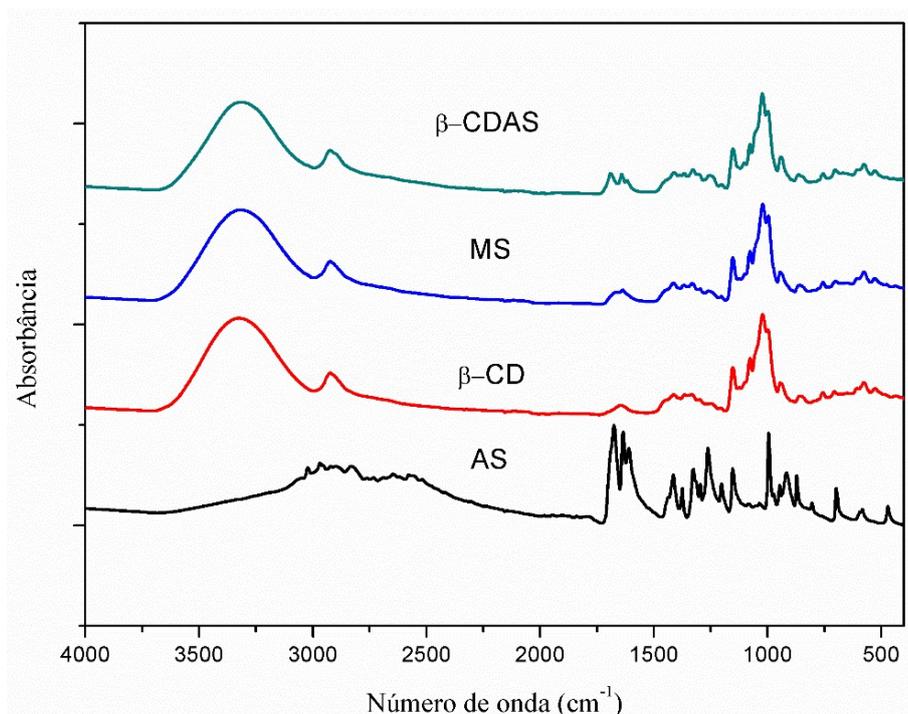


Figura 2. Espectros de FTIR dos componentes puros, complexo de inclusão e mistura física

É possível observar que na região espectral de 1750 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ , o  $\beta$ -CD possui absorções fracas, quando comparado às bandas de absorção do ácido sórbico, que apresenta bandas de absorção características nessas faixas. Desta forma, essas regiões espectrais podem ser utilizadas para detecção da interatividade hóspede:hospedeiro (Figura 3).

O comportamento espectral do  $\beta$ -CDAS pelo método de coprecipitação e a MS apresentam picos característicos do AS na região de interação hóspede:hospedeiro citada anteriormente, sendo possível observar que o método de coprecipitação apresentou bandas de absorção mais intensas e deslocamentos dos picos característicos do AS em relação a MS.

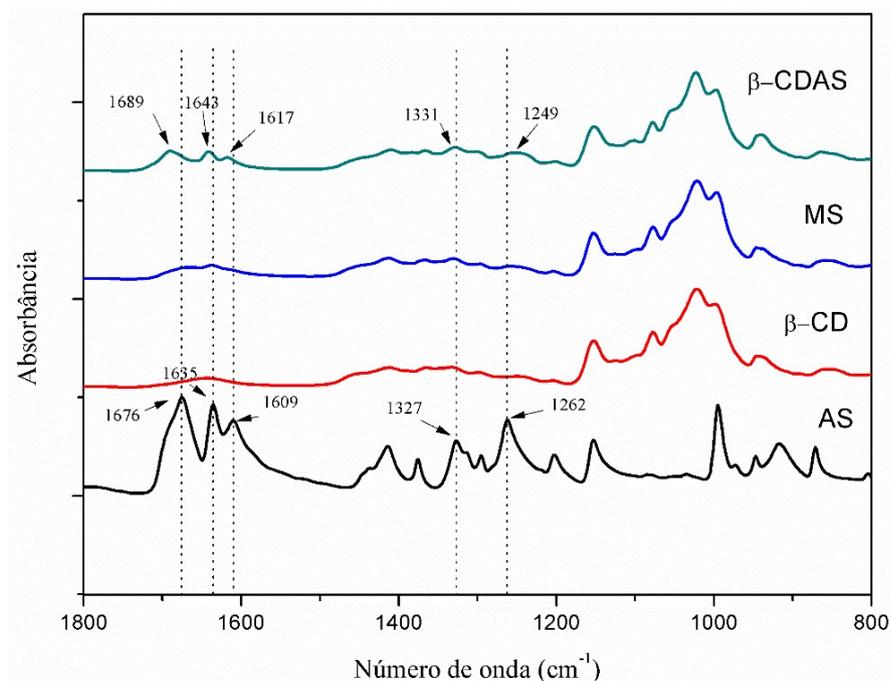


Figura 3. Espectros de FTIR dos componentes puros e do complexo de inclusão, na região espectral de 1800-800  $\text{cm}^{-1}$ .

O espectro do AS (Figura 4) apresenta picos os comprimentos de onda 1262  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ), 1327  $\text{cm}^{-1}$  (C-O), 1676  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), e na faixa de 1609 – 1635  $\text{cm}^{-1}$ , referente as duas duplas ligações (C=C). O complexo de inclusão ( $\beta$ -CDAS) apresenta um deslocamento destes picos do AS, porém, numa menor intensidade. Já o espectro da simples mistura física (MS) não apresentou picos nos comprimentos de onda citados.

Os deslocamentos observados (Figura 3) sugerem a formação de um complexo de inclusão real, evidenciando a interação, com a presença de ácido sórbico no complexo de inclusão representado pelos picos característicos do mesmo no espectro  $\beta$ -CDAS.

**Ressonância Magnética Nuclear.** Os prótons H3 e H5 são localizados no interior da cavidade da  $\beta$ -CD, enquanto os prótons H2, H4 e H6 são localizados no exterior da molécula (Figura 4). Segundo Zhang *et al.*<sup>8</sup> o deslocamento dos prótons observado no espectro RMN- $H^1$  é evidência de formação de complexos de inclusão em solução aquosa, demonstrando a interação existente entre as moléculas hóspede e hospedeira.

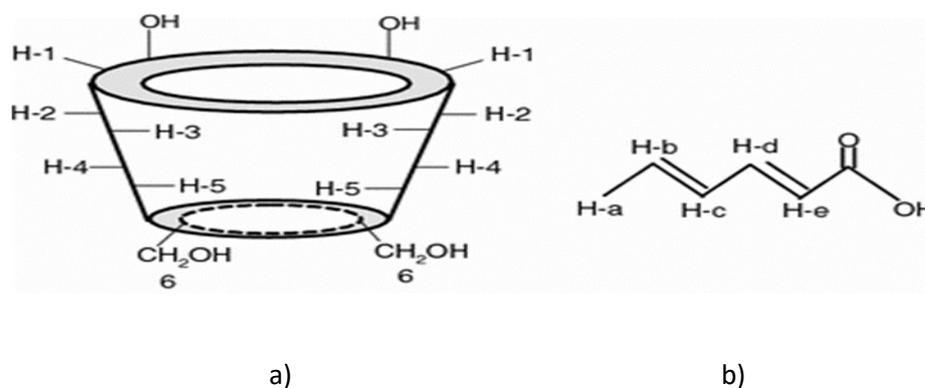


Figura 4. Estrutura química e identificação dos prótons (a)  $\beta$ -CD e (b) AS.<sup>7</sup>

É possível observar na Tabela 2 que os prótons da  $\beta$ -ciclodextrina, na forma complexada, apresentam um deslocamento químico. Os prótons de hidrogênio posicionados na superfície interior da cavidade hidrofóbica da molécula de  $\beta$ -ciclodextrina, H3 e H5, sofrem um deslocamento de  $\Delta\delta = 0,011$  ppm e  $\Delta\delta = 0,012$  ppm, respectivamente. Tal resultado sugere a presença do ácido sórbico na cavidade apolar da molécula hospedeira ciclodextrina. No entanto, nota-se que também há ácido sórbico na superfície externa da  $\beta$ -ciclodextrina, como pode ser visualizado no deslocamento dos prótons H1, H4 e H6. Como já explicitado anteriormente, o pó obtido do método de coprecipitação contém complexo de inclusão e ácido sórbico e  $\beta$ -CD na forma livre. Tal comportamento não foi observado por Zhang e colaboradores<sup>8</sup> ao encapsularem ácido sórbico em  $\beta$ -ciclodextrina. Os baixos desvios verificados por Zhang *et al.*<sup>8</sup> podem ter sofrido influência da metodologia

utilizada na preparação do complexo, onde foi realizada uma lavagem dos cristais do complexo, o que pode ter ocasionado o deslocamento do AS para fora da cavidade da CD.

Quanto à mistura física é importante observar que a análise RMN- $H^1$  não apresentou desvios de prótons no interior da ciclodextrina H3 e H5 ( $\Delta\delta = 0$  ppm), indicando que a simples mistura não resulta na inclusão do ácido sórbico na cavidade da molécula hospedeira. O deslocamento dos prótons H2, H4 e H6 sugere a interação entre o ácido sórbico e o exterior da  $\beta$ -ciclodextrina.

Tabela 2. Dados do deslocamento químico dos prótons (ppm).

	$\beta$ -ciclodextrina/ppm						Ácido sórbico/ppm				
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	Ha	Hb	Hc	Hd	He
$\delta_{\text{livre}}$	4,813	3,349	3,648	3,305	3,541	3,603	1,805	6,233	6,216	7,145	5,757
$\delta_{\beta\text{-CDAS}}$	4,823	3,356	3,659	3,294	3,553	3,613	1,805	6,231	6,211	7,135	5,771
$\Delta\delta$	0,01	0,007	0,011	-0,011	0,012	0,01	0	-0,002	-0,005	-0,01	0,014
$\delta_{\text{MS}}$	4,813	3,343	3,648	3,304	3,541	3,608	1,795	6,222	6,204	7,128	5,761
$\Delta\delta$	0	-0,006	0	-0,001	0	0,005	-0,01	-0,011	-0,012	-0,017	0,004

Os prótons do ácido sórbico também apresentaram deslocamento químico, quando este foi complexado com ciclodextrina, sendo mais pronunciado para os prótons Hd e He, reforçando a hipótese de encapsulação do ácido sórbico na cavidade da ciclodextrina.

**Estabilidade térmica.** A condição de alta temperatura torna o ácido sórbico visivelmente instável, degradando-se ao longo do tempo por sublimação (Figura 5); e isto é um ponto negativo quando o mesmo é incorporado em filmes elaborados por extrusão. Alguns exemplos são os trabalhos de Rodriguez-Martinez *et al.*<sup>4</sup> e Souza *et al.*<sup>18</sup> que verificaram a degradação térmica do AS em suas pesquisas. Contudo, quando encapsulado

em  $\beta$ -ciclodextrina, o ácido sórbico manteve-se estável, quando exposto por uma hora em diferentes temperaturas (Figura 5).

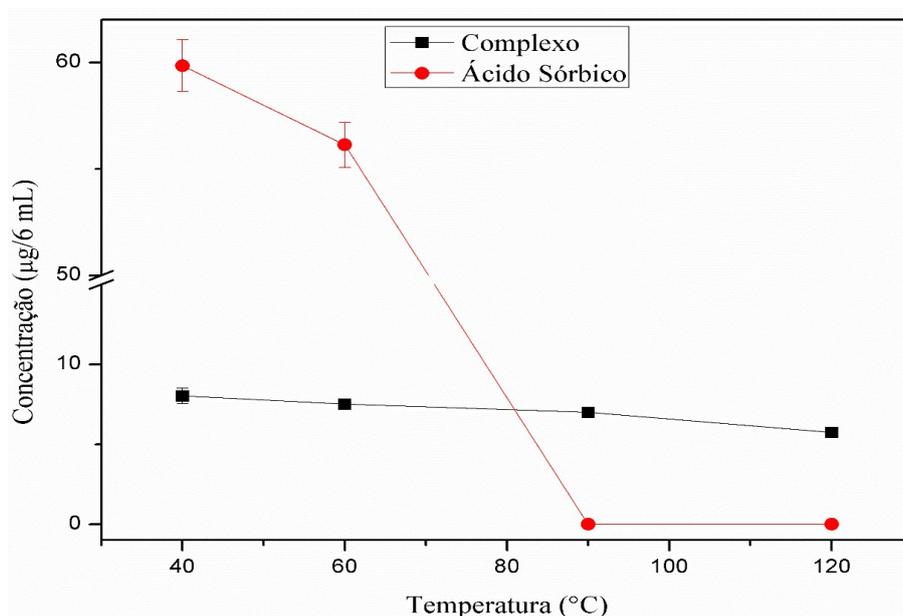


Figura 5. Estabilidade térmica do ácido sórbico livre e microencapsulado.

A estabilidade do complexo de inclusão pode ser atribuída às propriedades da  $\beta$  - ciclodextrina que segundo Fenyvesi e Zsente<sup>5</sup> e Venturini e outros<sup>19</sup>, possui a capacidade de proteger o material encapsulado da decomposição pelo uso do calor, sublimação e volatilidade. Com base neste resultado foi possível propor a quantidade de ácido sórbico complexado em ciclodextrina, que foi de, aproximadamente, 72% (m/m).

O resultado obtido demonstra a capacidade do complexo de inclusão em suportar as altas temperaturas utilizadas durante o processamento do filme em que o mesmo será aplicado, visto que, segundo Dominguez e colaboradores<sup>20</sup> o desenvolvimento de filmes ativos, com utilização de energia mecânica e térmica pode ocasionar na perda de compostos incorporados.

Como exposto, a utilização do método de extrusão para a fabricação de filmes biodegradáveis ativos com AS é mais proveitosa, uma vez que no método de casting, amplamente usado em pesquisas, faz-se uso de soluções aquosas, o que pode resultar no deslocamento do AS da cavidade da CD.

### Caracterização dos filmes biodegradáveis ativos

**Espessura (E) e permeabilidade ao vapor de água (PVA).** As espessuras dos filmes diferiram significativamente, sendo que a formulação elaborada com o complexo de inclusão apresentou uma maior espessura (Tabela 3). A presença da  $\beta$ -CD na formulação F2 pode ter influenciado no resultado, atribuindo assim uma maior espessura. Este resultado é superior ao registrado por Higuera *et al.*<sup>21</sup>, quando elaborou filmes com complexos de inclusão, pelo método de *casting*, e por Chen *et al.*<sup>22</sup>, que utilizaram o método de extrusão, na elaboração de filmes contendo complexos de inclusão de  $\beta$ -CD.

Tabela 3. Caracterização dos filmes.

Amostra	F1 (AS)	F2 ( $\beta$ -CDAS)
<b>E (<math>\mu</math>m)</b>	224,00 <sup>b</sup> $\pm$ 43,27	498,00 <sup>a</sup> $\pm$ 80,59
<b>PVAX10<sup>-10</sup> (g/m.Pa.s)</b>	3,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,00	3,39 <sup>a</sup> $\pm$ 0,00
<b>TM (MPa)</b>	5,90 <sup>a</sup> $\pm$ 2,38	5,26 <sup>b</sup> $\pm$ 3,23
<b>AR (%)</b>	0,0084 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0016	0,0187 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0030
<b>ME (MPa)</b>	33,23 <sup>a</sup> $\pm$ 28,63	30,91 <sup>b</sup> $\pm$ 11,30

<sup>a</sup>Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias (teste Tukey).

TM: Tensão máxima na ruptura; AR: Alongamento na ruptura; ME: Módulo de elasticidade.

Quanto ao resultado da permeabilidade ao vapor de água (PVA), as amostras não apresentaram diferença significativa (Tabela 3), demonstrando que as espessuras das formulações e tampouco a presença da ciclodextrina não interferiram neste parâmetro. Flores *et al.*<sup>23</sup> e Flores e outros<sup>24</sup> elaboraram filmes de amido extrusado com adição de sorbato de potássio, e obtiveram resultados na faixa de 3,7 a 6,7x10<sup>-10</sup>g/m.Pa.s e 6,1x10<sup>-10</sup>g/m.Pa.s respectivamente, uma maior permeabilidade ao vapor de água se comparado aos resultados obtidos no presente estudo.

A menor taxa de permeabilidade ao vapor de água pode ser atribuída a hidrofobicidade do ácido sórbico em relação aos seus sais, que o torna capaz de diminuir a

capacidade de permeabilidade de filmes de amido. O fato da ciclodextrina não alterar significativamente a PVA, é um resultado promissor, pois por ser um derivado do amido, esta molécula também apresenta caráter hidrofílico na parte externa, o que poderia aumentar a permeabilidade do filme. Além disso, deve-se considerar que na elaboração das formulações, optou-se por reduzir a quantidade de amido em F2, devido a adição do complexo de inclusão, e esta atitude foi acertada, pois se o teor de PBAT tivesse sido alterado, provavelmente a permeabilidade de F2 seria maior.<sup>25</sup>

A presença da ciclodextrina diminuiu a rigidez do filme biodegradável, e esta alteração causou uma redução significativa de, aproximadamente, 11% na resistência máxima na ruptura, 7% no módulo de elasticidade e um aumento de 120% na alongação na ruptura de F2, em relação a F1. Resultados semelhantes foram observado por Higuera *et al.*<sup>21</sup>, ao analisar filmes com ciclodextrina em sua matriz.

De acordo com Fideles *et al.*<sup>26</sup> a presença de moléculas pequenas como ácido sórbico ou sorbatos, podem agir como plastificantes, tornando os filmes com menor resistência, ou seja, causando uma redução na TM e no ME, e conseqüente aumento no AR. Contudo, este resultado não foi observado no presente estudo, podendo ser devido ao fato de que na formulação F1 o AS não estava protegido pela ciclodextrina, resultando na sua sublimação durante a extrusão, e alterando as características dos filmes.

**Cor.** A diferença de cor, ( $\Delta E^*$ ), obtida entre a amostra controle (filme com ácido sórbico não encapsulado) e o filme (com microcápsulas de ácido sórbico) foi de  $\Delta E^* = 8,063$ , de acordo com Cechini *et al.*<sup>12</sup> este resultado classifica-se como uma forte diferença ( $5 \leq \Delta E^* < 12$ ).

A presença do material encapsulante ( $\beta$ -ciclodextrina) no filme adicionado de ácido sórbico microencapsulado F2, pode ter influenciado na cor do mesmo, devido à exposição a altas temperaturas no processo de extrusão utilizado no preparo dos filmes, ocasionando a

diferença de cor observada entre os filmes. Shin e colaboradores<sup>27</sup> observaram que ciclodextrinas incompatíveis podem se degradar em temperatura de extrusão, produzindo pequenos aspectos de queimado.

**Atividade antimicrobiana - teste de halo.** Os filmes contendo AS livre (F1) e AS microencapsulado (F2) não apresentaram halo de inibição para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, 0 mm, onde foi observado crescimento de microrganismos por toda a extensão da placa. Estudos já realizados com filmes ativos, sugeriram uma maior concentração de sorbato, superior a 3% Sousa et al.<sup>19</sup>, 3% Hu et al.<sup>28</sup> para que o halo de inibição de microrganismos seja observado.

Desta forma, tal fato pode ter ocorrido devido à baixa concentração de AS utilizado na formulação dos filmes, 1% de AS em F1 e F2.

## CONCLUSÃO

- Foi possível obter microcápsulas por meio da inclusão molecular do ácido sórbico em  $\beta$ -ciclodextrina;
- A extração do AS do complexo de inclusão se deu de forma rápida;
- A microencapsulação atribuiu uma maior estabilidade térmica ao AS;
- Os espectros de FTIR demonstraram que ocorreu interação entre o “hóspede” e o “hospedeiro” no suposto complexo formado;
- Com a técnica RMN- $^1\text{H}$  foi possível observar a interação hóspede:hospedeiro e os deslocamentos químicos que demonstram a complexação;
- As espessuras das formulações e a presença da ciclodextrina não interferiram na PVA;

- A formulação F2, dos filmes, possui uma maior capacidade de esticar antes de romper, possuindo uma menor rigidez, sendo estas boas características para embalagens;
- A concentração de ácido sórbico incorporada ao filme ativo não foi suficiente para impedir o crescimento de microrganismos.

## REFERÊNCIAS

1. Lopes, I.C.; Santos, P. V. F.; Diclesy, V. C.; Araújo, M. U. Oliveira-Brett, A. M. Sorbic acid and its degradation products: electrochemical characterization. *Analytical Letters*. 2012, 45, 408-417.
2. Stopforth, J. D.; Sofos, J. N.; Busta, F. F.; **Antimicrobials in food**. Chapters 3(3rd ed.). Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2005.
3. Efsa Ans Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), 2015. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. *EFSA Journal*. 2015, 13, 28.
4. Yarramraju, S.; Akurathi, V.; Wolfs, K.; Schepdael, A. V.; Hoogmartens, J.; Adams, E. Investigation of sorbic acid volatile degradation products in pharmaceutical formulations using static headspace gas chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, 44, 456-463.
5. Rodríguez-Martínez, A. V.; Sendón, R.; Abad, M. J.; González-Rodríguez, M. V.; Barros-Velázquez, J.; Aubourg, S. P.; Paseiro-Losada, P.; Rodríguez-Bernaldo De Quirós, A.; Migration kinetics of sorbic acid from polylactic acid and seaweed based films into food simulants. *LWT- Food Science and Technology*. 2016, 65, 630-636.
6. Fenyvesi, É.; Szenté, L. Cyclodextrin-enabled polymer composites for packaging. *Molecules*. 2018, 23.
7. Mura, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, 101, 238-250.
8. Zhang, Y.; Liu, Y.; Liu, W.; Gan, Y.; Zhou, C. Characterization of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin with sorbic acid in the solid state and in aqueous solution. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2010, 67.
9. Ial - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 6. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008, 1020.

10. Cestari, L. A.; Gaiotto, R. C.; Antigo, J. L.; Scapim, M. R. S.; Madrona, G. S.; Yamashita, F.; Pozza, M. S. S.; Prado, I. N. Effect of active packaging on low-sodium restructured chicken staks. *Journal of Food Science and Technology*. 2015, 52, 3376-3382.
11. Astm - American Society For Testing And Materials. **Test methods for tensile properties of thin plastic sheeting - D-882-91**. Annual book of ASTM. Philadelphia: ASTM, 1996.
12. Astm - American Society For Testing And Materials. **Standard test methods for water vapor transmission of material – E-96-95**, Philadelphia: ASTM, 1995.
13. Cecchini, M.; Contini, M.; Massantini, R.; Monarca, D.; Moschetti, R. Effects of controlled atmospheres and low temperature on storability of chestnuts manually and mechanically harvested. *Postharvest Biology and Technology*. 2011, 61, 131-136.
14. National Committee For Clinical Laboratory Standards (Nccls). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved standards M7-A5. Wayne, PA, 2000.
15. Arya, S. S. Stability of Sorbic Acid in Aqueous Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1980, 28, 6.
16. Ficarra, R.; Tommasini, S.; Raneri, D.; Calabró, M. L.; Di Bella, M. R.; Rustichelli, C.; Gamberini, M. C.; Ficarra, P. Study of flavonoids/beta-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, 29, 1005-1014.
17. Mura, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complex in the solid state: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, 113, 226-238.
18. Sousa, G. M.; Yamashita, F.; Júnior, M. S. S. Application of biodegradable films made from rice flour, poly(butylene adipate-co-terphthalate), glycerol and potassium sorbate in the preservation of fresh food pastas. *LWT-Food Science and Technology*. 2016, 65, 39-45.
19. Venturini, C. G.; Nicolini, J.; Machado, C.; Machado, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova*. 2008, 31, 360-368.
20. Domínguez, R.; Barba, F. J.; Gómez, B.; Putnik, P.; Kovacevic, D. B.; Pateiro, M.; Santos, E. M.; Lorenzo, J. M. Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: a reviw. *Food Research International*. 2018, 113, 93-101.
21. Higuera, L.; López-Carballo, G.; Cerisuelo, J. P.; Gavara, R.; Hernández-Muñoz, P. Preparation and characterization of chitosan/HP- $\beta$ -cyclodextrins composites with high sorption capacity for carvacrol. *Carbohydrate Polymers*. 2013, 97, 262-268.

22. Chen, H.; Li, L.; Ma, Y.; McDonald, T. P.; Wang, Y. Development of active packaging film containing bioactive components encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin and its application. *Food Hydrocolloids*. 2019, 90, 360-366.
23. Flores, S. K.; Costa, D.; Yamashita, F.; Gerschenson, L. N.; Grossmann, M. V. Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. *Materials Science and Engineering C*. 2010, 30, 196-202.
24. Flores, S.; Famá, L.; Rojas, A. M.; Goyanes, S.; Gerschenson, L. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*. 2007, 40, 257-265.
25. Maestrello, C.; Tonon, L.C.; Madrona, G.; Scapim, M.; Bergamasco, R. Production and Characterization of Biodegradable Films Incorporated with Clove Essential Oil/ $\beta$ -cyclodextrin Microcapsules. *Chemical Engineering Transactions*. 2017, 57, 393-1398.
26. Fidelis, J. C. F.; Marchi, L. B.; Marques, D. R.; Scapim, M. R. S.; Madrona, G. S.; Monteiro, C. C. F.; Yamashita, F.; Monteiro, A. R. G. Development of biodegradable films of cassava starch and poly (butylene adipate co-terephthalate): effects of oregano essential oil and potassium sorbate in films characterization. *Chemical Engineering Transactions*. 2017, 57.
27. Shin, J.; Kathuria, A.; Lee, Y. S. Effect of hydrophilic and hydrophobic cyclodextrins on the release of encapsulated allyl isothiocyanate (AITC) and their potential application for plastic film extrusion. *Journal of Applied Polymer Science*. 2019, 136, 48137.
28. Hu, S.; Yu, J.; Wang, Z.; Li, L.; Du, Y.; Wang, L.; Liu, Y. Effects of sorbic acid-chitosan microcapsules as antimicrobial agent on the properties of ethylene vinyl alcohol copolymer film for food packaging. *Journal of Food Science*. 2017, 82.

## CAPITULO iv

### ANEXO i

Curva de calibração do ácido sórbico:

Foi realizada com base na metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (2008), utilizando soluções padrões de ácido sórbico, com concentrações de 2 µg/mL e 5 µg/mL. Porções de 0,5; 1; 1,5 e 2 foram retiradas da solução padrão de 2 µg/mL e junto as porções de amostra foi adicionado 1,5; 1; 0,5 e 0 mL de água destilada. Da solução padrão de concentração 5 µg/mL foi retirado porções de 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2 mL da para 6 tubos de ensaio e foi adicionado 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0 mL de água respectivamente. Aos tubos contendo água e amostra, foram adicionados 2 mL de solução sulfúrica de dicromato de potássio, após os tubos fechados foram colocados em banho maria (Solab, SL-152/10) a uma temperatura de 95 °C por 5 minutos. Em seguida, 2 mL de solução de ácido tiobarbitúrico foi adicionado aos tubos e novamente foram levados ao banho maria durante 10 minutos. Ao fim, os tubos foram deixados esfriar e a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 530 nm em espectrofotômetro (Femto, 700 plus, São Paulo). Após leitura, a concentração de ácido sórbico foi determinada por meio da equação da reta obtida através da curva de calibração do AS.

$$y = a + bx$$

Onde y corresponde aos valores de absorbância obtidos durante a extração, “a” é o intercepto em y, “b” é a inclinação da reta e “x” é a concentração de AS a ser determinada (µg/6mL).

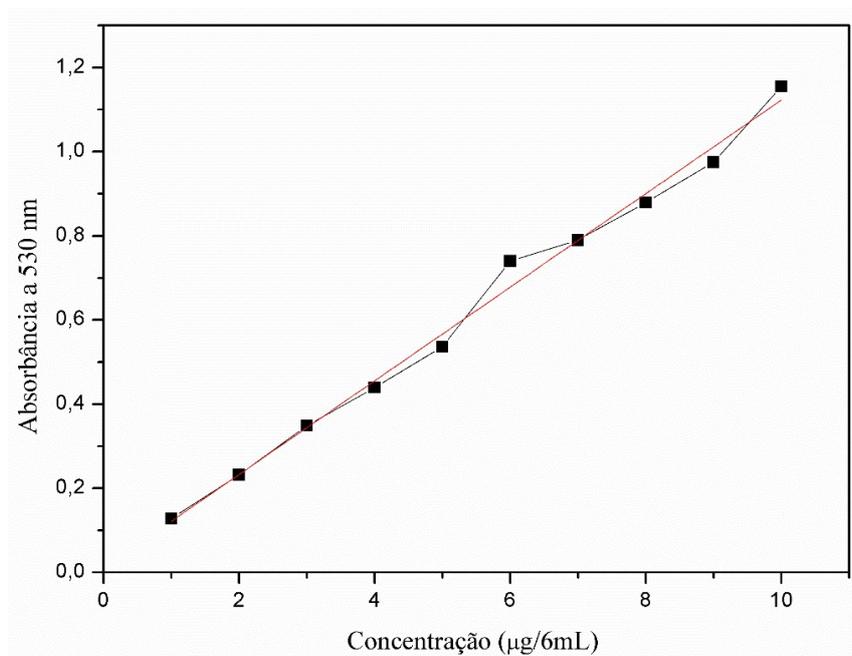


Figura 5. Curva de calibração do ácido sórbico.

Equação	$y = a + b \cdot x$		
R-quadrado	0,99129		
		Valor	Erro padrão
a	Intercepto	0,0106	0,02155
b	Inclinação	0,11122	0,00347