

Priscilla Prates de Almeida

**Desenvolvimento de embalagem ativa antimicrobiana  
para pães de forma**

Tese submetida como requisito final  
para a obtenção do grau de doutor em  
Engenharia de Alimentos pela  
Universidade Federal de Santa  
Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Borges  
Laurindo

Florianópolis  
2017



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Almeida, Priscilla Prates de  
Desenvolvimento de embalagem ativa  
antimicrobiana para pães de forma / Priscilla  
Prates de Almeida ; orientador, João Borges  
Laurindo - SC, 2017.  
202 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,  
2017.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Embalagem ativa  
antimicrobiana. 3. Óleo essencial microencapsulado.  
4. Filmes de amido. 5. Microfibras de celulose. I.  
Laurindo, João Borges. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos. III. Título.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde e pela oportunidade dessa conquista!  
Gratidão!;

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, pela oportunidade;

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, pela oportunidade e concessão de licença para capacitação;

Ao meu orientador e professor João Borges Laurindo, pela oportunidade, confiança, amizade e orientação;

A então pós-doc Nuria Blanco Pascual, por todo auxílio durante o tempo em que esteve desenvolvendo seu projeto na UFSC;

Aos membros da banca, pela avaliação do trabalho e contribuições;

Aos meus pais José Maria e Leida e ao meu irmão Bruno, pelo amor, apoio, confiança e incentivo. Obrigada especialmente ao meu pai, por sonhar esse sonho comigo e nunca medir esforços para me ajudar a realizá-lo! Minha eterna gratidão!

Aos meus amigos, pelo incentivo, encorajamento e reconhecimento;

Aos colegas do PROFI e ENGEBIO, pela parceria, amizade e suporte;

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para essa conquista.

Muito obrigada!



“Que os vossos esforços desafiem  
as impossibilidades; lembrai-vos de que as  
grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin



## RESUMO

O pão é um dos alimentos mais consumidos pela humanidade. A deterioração microbiana de pães acarreta perdas econômicas relevantes. As embalagens ativas possuem funções que vão além das propriedades de barreira, contenção e proteção. Elas podem substituir ou complementar os sistemas tradicionais de conservação de alimentos, caracterizados pelo uso excessivo de aditivos sintéticos. Sabendo-se que a conservação de pães é tradicionalmente realizada por aditivos sintéticos, o uso embalagens ativas aplicadas a essa categoria de alimento constitui uma possibilidade de redução e/ou inibição do crescimento microbiano, com conseqüente extensão da vida útil desse produto. O objetivo principal deste estudo foi produzir uma embalagem ativa por *tape-casting*, através da incorporação de óleos essenciais microencapsulados em matrizes poliméricas de amido-microfibras de celulose, para extensão da vida útil de pães de forma. Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e hortelã (*Mentha arvensis*) foram caracterizados quanto à composição química, citotoxicidade e atividades antimicrobiana e antioxidante. Ambos os óleos apresentaram elevada atividade antifúngica contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium commune*, expressa pelos compostos voláteis e em solução, além de potencial antioxidante elevado (superior a 70 %), nas condições do estudo. O microencapsulamento de óleo essencial em goma arábica pelo método de *spray drying* foi utilizado como alternativa de controle da elevada volatilidade e suscetibilidade à oxidação, características desse composto. O processo de microencapsulamento, nas condições do estudo, não prejudicou a atividade antimicrobiana do óleo essencial. As microfibras de celulose foram obtidas pela combinação de tratamentos ácido (hidrólise) e mecânico (ultrassom). Sua adição à suspensão filmogênica promoveu o reforço mecânico e a redução da higroscopicidade e permeabilidade à água dos filmes de amido. A adição de microcápsulas de óleo essencial às matrizes de amido-microfibras de celulose resultou na redução da resistência à tração e aumento da elasticidade dos filmes. A atividade antimicrobiana dos filmes foi comprovada por análise microbiológica e atestada pela extensão da vida útil de pães de forma em 7 dias, nas condições da análise e dimensões (do filme e dos pães) empregadas.

Palavras-chave: óleos essenciais; microcápsulas; microfibras de celulose; filmes de amido; embalagem antimicrobiana.



## ABSTRACT

Bread is one of the most consumed food by humanity. The microbial deterioration of bread is responsible for relevant economic losses. Active packaging has functions that go beyond barrier, containment and protection properties. They can replace and/or complement traditional food storage systems characterized by excessive use of synthetic additives. Since the preservation of bread is traditionally carried out by synthetic additives, the use of active packaging applied to this category of food constitutes a possibility of reduction and/or inhibition of microbial growth, with consequent extension of the useful life of this product. The main objective of this study was to produce an active packaging by tape-casting, through the incorporation of microencapsulated essential oils in polymeric films of starch-cellulose microfibrils, to extend the useful life of breads. The essential oils of oregano (*Origanum vulgare*) and mint (*Mentha arvensis*) were characterized by chemical composition, cytotoxicity and antimicrobial and antioxidant activities. Both oils presented high antifungal activity against the fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium commune*, expressed by the volatile and the solution compounds, as well as high antioxidant potential (over 70%), under the conditions of the study. The microencapsulation of essential oil in gum arabic by the spray drying method was used as an alternative to control the high volatility and susceptibility to oxidation, characteristics of this compound. The microencapsulation process, under the conditions of the study, did not impair the antimicrobial activity of the essential oil. Cellulose microfibrils were obtained by the combination of acid (hydrolysis) and mechanical treatments (ultrasound). Its addition to the filmogenic suspension promoted the mechanical reinforcement and reduction of the hygroscopicity and water permeability of the starch films. The addition of essential oil microcapsules to the starch-cellulose microfibrils films reduced the tensile strength and increased elasticity of the films. The antimicrobial activity of the films was confirmed by microbiological analysis and attested by the extension of the shelf life of breads in 7 days, under the conditions of analysis and dimensions (film and breads) employed.

Keywords: essential oils; microcapsules; microfibril cellulose; starch films; antimicrobial packaging.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Estruturas químicas e representação esquemática da (a) amilose e (b) amilopectina.....	35
<b>Figura 2.2:</b> Equipamento de <i>tape-casting</i> de processamento contínuo.....	38
<b>Figura 2.3:</b> Formas características de isotermas de sorção de umidade.....	40
<b>Figura 2.4:</b> Estrutura de uma fibra vegetal.....	42
<b>Figura 2.5:</b> Estrutura das fibras celulósicas.....	42
<b>Figura 2.6:</b> Foto ilustrativa da planta de <i>Origanum vulgare</i> .....	46
<b>Figura 2.7:</b> Estrutura do composto carvacrol.....	46
<b>Figura 2.8:</b> Foto ilustrativa da planta de <i>Mentha arvensis</i> .....	46
<b>Figura 2.9:</b> Estrutura do composto mentol.....	46
<b>Figura 2.10:</b> Estruturas de microcápsulas.....	49
<b>Figura 2.11:</b> Pão de forma contaminado por <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .....	55
<b>Figura 2.12:</b> Estrutura morfológica do fungo do <i>Aspergillus</i> .....	56
<b>Figura 2.13:</b> Foto ilustrativa do fungo <i>A. flavus</i> .....	56
<b>Figura 2.14:</b> Colônia de <i>A. flavus</i> em meio SDA (Agar Dextrose Sabouraud).....	56
<b>Figura 2.15:</b> Pão contaminado com <i>A. flavus</i> .....	56
<b>Figura 2.16:</b> Estrutura morfológica do fungo <i>Penicillium</i> .....	58
<b>Figura 2.17:</b> Foto ilustrativa do fungo <i>P. commune</i> .....	58
<b>Figura 2.18:</b> Colônia de <i>P. commune</i> em meio YGC (agar extrato levedura glicose cloranfenicol).....	58
<b>Figura 2.19:</b> Pão contaminado com <i>P. commune</i> .....	58
<b>Figura 3.1:</b> Efeito do aumento das concentrações dos óleos essenciais (OE) de orégano e hortelã e períodos de incubação (h) sobre a viabilidade das células NGM (a) e NIH3T3 (b).....	76
<b>Figura 3.2:</b> Plaqueamento por profundidade de <i>A. flavus</i> e <i>P. commune</i> .....	79
<b>Figura 3.3:</b> Inibição do crescimento (%) de <i>A. flavus</i> e <i>P. commune</i> pelos óleos essenciais (OE) de orégano (a) e hortelã (b).....	79
<b>Figura 3.4:</b> Avaliação visual da MID dos óleos essenciais de orégano e hortelã contra os fungos <i>A. flavus</i> e <i>P. commune</i> .....	82
<b>Figura 3.5:</b> Atividade antioxidante (%) dos óleos de orégano (a) e hortelã (b).....	84
<b>Figura 4.1:</b> Foto ilustrativa do <i>Mini Spray Dryer</i> Buchi B 290 (a); e esquema do princípio de funcionamento do equipamento (b).....	90

<b>Figura 4.2:</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de microcápsulas de goma arábica - óleo essencial de orégano (a, b, c, d = topografia externa; e, f = detalhes microestruturais da cápsula e cavidade central).....	96
<b>Figura 4.3:</b> Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de partículas da emulsão goma arábica - óleo essencial de orégano.....	98
<b>Figura 4.4:</b> Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de microcápsulas contendo óleo essencial de orégano.....	100
<b>Figura 4.5:</b> Inibição do crescimento (%) de <i>A. flavus</i> e <i>P. commune</i> por óleo essencial de orégano microencapsulado.....	101
<b>Figura 5.1:</b> Polpa de celulose compacta.....	108
<b>Figura 5.2:</b> Polpa de celulose moída.....	108
<b>Figura 5.3:</b> Equipamento de <i>tape-casting</i> (a) e dispositivo <i>Doctor Blade</i> (b).....	110
<b>Figura 5.4:</b> Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de fibras de celulose sem tratamento (a); tratadas por hidrólise ácida em HCl 2 M (b); e tratamento mecânico em ultrassom (c).....	116
<b>Figura 5.5:</b> Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de fibras de celulose em suspensão a 0,1 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e ultrassom (US).....	119
<b>Figura 5.6:</b> Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de fibras de celulose em suspensão a 0,2 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e ultrassom (US).....	121
<b>Figura 5.7:</b> Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de fibras de celulose em suspensão a 0,5 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e ultrassom (US).....	122
<b>Figura 5.8:</b> Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de fibras de celulose submetidas a 90 minutos de hidrólise ácida em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M e ultrassom (US).....	123
<b>Figura 5.9:</b> Efeito dos tratamentos sobre a morfologia e o tamanho das fibras de celulose: (a) fibras de celulose sem tratamento; (b) tratamento com ultrassom (US); (c) 90 minutos hidrólise ácida em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M e 30 minutos US; (d), (e) e (f) 60 minutos hidrólise ácida em HCl 2 M e 30 minutos US.....	126
<b>Figura 5.10:</b> Microscopia eletrônica de varredura: (a) fibras sem tratamento; (b) fibras submetidas à hidrólise ácida em HCl 2 M (60 minutos) e ultrassom (30 minutos).....	127
<b>Figura 5.11:</b> Microscopia eletrônica de varredura de filmes de amido sem fibras (a); e filmes de amido adicionados de microfibras de celulose (25 g/100 g de amido) (b).....	128

<b>Figura 5.12:</b> Difractogramas das fibras sem tratamento e microfibras de celulose.....	129
<b>Figura 5.13:</b> Difractogramas dos filmes de amido sem fibras e adicionados de microfibras de celulose (6 g microfibras/100 g amido).....	130
<b>Figura 5.14:</b> Espectros FTIR de fibras não tratadas e microfibras de celulose produzidas por hidrólise ácida (HCl 2 M) e ultrassom.....	133
<b>Figura 5.15:</b> Espectros FTIR de filmes de amido-glicerol e amido-glicerol-microfibras de celulose (6 g microfibras/100 g amido).....	134
<b>Figura 5.16:</b> Propriedades mecânicas de filmes de amido adicionados de microfibras de celulose.....	136
<b>Figura 5.17:</b> Isotermas de sorção de umidade - Ajuste de GAB aos dados experimentais de umidade de equilíbrio <i>versus</i> $a_w$ de filmes de amido-glicerol (F0) e filmes de amido-glicerol-microfibras de celulose (F2).....	138
<b>Figura 6.1:</b> Pães de forma embalados em contato com o filme ativo antimicrobiano (a); e na ausência do filme ativo (controle) (b).....	149
<b>Figura 6.2:</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de amido-microfibras de celulose e microcápsulas de óleo essencial de orégano (a) superfície; (b) corte transversal. Linha vermelha: distribuição das microcápsulas na matriz polimérica.....	150
<b>Figura 6.3:</b> Halo de inibição de crescimento de <i>A. flavus</i> e <i>P. commune</i> por filmes antimicrobianos.....	155
<b>Figura 6.4:</b> Efeito da adição de microcápsulas de óleo essencial de orégano nas propriedades mecânicas de filmes de amido de mandioca-microfibras de celulose.....	157
<b>Figura 6.5:</b> Isotermas de sorção de umidade - Ajuste de GAB aos dados experimentais de umidade de equilíbrio <i>versus</i> $a_w$ de filmes de amido-glicerol-microfibras de celulose (F2) e filmes ativos (F3).....	159
<b>Figura 6.6:</b> Contagem microbiana (UFC/g) em pães de forma embalados em contato e sem contato com os filmes antimicrobianos.....	162
<b>Figura 6.7:</b> Amostras de pães de forma embaladas em contato ou não com os filmes ativos e o desenvolvimento microbiano.....	163



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Estudos sobre a aplicação de filmes ativos antimicrobianos em alimentos.....	61
<b>Tabela 3.1:</b> Composição do óleo essencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), tempos de retenção (min) e concentração relativa (%).....	73
<b>Tabela 3.2:</b> Composição do óleo essencial de hortelã ( <i>Mentha arvensis</i> ), tempos de retenção (min) e concentração relativa (%).....	74
<b>Tabela 3.3:</b> Valores de IC <sub>50</sub> dos óleos essenciais de orégano e hortelã para as células NGM e NIH3T3, nos diferentes períodos de incubação (h).....	77
<b>Tabela 3.4:</b> Valores de ICs (µg/mL) dos óleos essenciais de orégano e hortelã para os microrganismos <i>A. flavus</i> e <i>P. commune</i> .....	80
<b>Tabela 3.5:</b> Valores de MID (µL/L) para os óleos essenciais (OE) de orégano e hortelã contra os fungos <i>A. flavus</i> e <i>P. commune</i> .....	82
<b>Tabela 3.6:</b> IC <sub>50</sub> (mg/mL) dos óleos essenciais (OE) de orégano e hortelã.....	85
<b>Tabela 4.1:</b> Caracterização das microcápsulas.....	94
<b>Tabela 4.2:</b> Caracterização do processo de microencapsulamento por <i>spray drying</i> .....	95
<b>Tabela 4.3:</b> MID (µL/L) do óleo essencial de orégano microencapsulado.....	103
<b>Tabela 5.1:</b> Tratamentos para a produção de microfibras de celulose.....	108
<b>Tabela 5.2:</b> Atividade de água de soluções salinas saturadas.....	113
<b>Tabela 5.3:</b> Tamanhos (µm) das fibras de celulose sem tratamento e submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M.....	117
<b>Tabela 5.4:</b> Tamanhos (µm) das fibras de celulose sem tratamento e submetidas ao tratamento mecânico em ultrassom (US).....	117
<b>Tabela 5.5:</b> Tamanhos (µm) das fibras de celulose em suspensão a 0,1 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e tratamento mecânico (US) (a).....	119
<b>Tabela 5.6:</b> Tamanhos (µm) das fibras de celulose em suspensão a 0,1 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e tratamento mecânico (US) (b).....	120
<b>Tabela 5.7:</b> Tamanhos (µm) das fibras de celulose em suspensão a 0,2 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e tratamento mecânico.....	121
<b>Tabela 5.8:</b> Tamanhos (µm) das fibras de celulose em suspensão a 0,5 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e tratamento mecânico.....	122

<b>Tabela 5.9:</b> Tamanhos ( $\mu\text{m}$ ) das fibras de celulose sem tratamento e submetidas a 90 minutos de hidrólise ácida em $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,1 M e ultrassom (US).....	123
<b>Tabela 5.10:</b> Potencial <i>zeta</i> das suspensões aquosas de microfibras de celulose.....	125
<b>Tabela 5.11:</b> Índice de cristalinidade ( $X_{\text{CR}}$ %) de fibras e microfibras de celulose.....	131
<b>Tabela 5.12:</b> Índice de cristalinidade ( $X_{\text{CR}}$ %) de filmes de amido.....	131
<b>Tabela 5.13:</b> Propriedades mecânicas de filmes de amido de mandioca-microfibras de celulose.....	135
<b>Tabela 5.14:</b> Parâmetros estimados do modelo de GAB ajustado aos dados experimentais de sorção de água dos filmes de amido-glicerol (F0) e filmes de amido-glicerol-microfibras de celulose (F2).....	139
<b>Tabela 5.15:</b> Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes de amido e microfibras de celulose.....	140
<b>Tabela 6.1:</b> MID ( $\mu\text{L/L}$ ) dos filmes antimicrobianos contra os fungos <i>A.flavus</i> e <i>P. commune</i> .....	151
<b>Tabela 6.2:</b> Diâmetro (mm) do halo de inibição do crescimento de <i>A.flavus</i> e <i>P. commune</i> .....	154
<b>Tabela 6.3:</b> Propriedades mecânicas de filmes antimicrobianos adicionados de óleo essencial de orégano microencapsulado.....	156
<b>Tabela 6.4:</b> Parâmetros estimados do modelo de GAB ajustado aos dados experimentais de sorção de água dos filmes de amido-glicerol-microfibras de celulose (F2) e filmes ativos (F3).....	160
<b>Tabela 6.5:</b> Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes a base de amido-microfibras de celulose, incorporados de ativo antimicrobiano.....	160
<b>Tabela 6.6:</b> Caracterização dos pães de forma e filmes antimicrobianos.....	165

## LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área de permeação	m <sup>2</sup>
A.O.A.C.	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>	
AA	Atividade antioxidante	%
ABIP	Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria	
Abs <sub>Am</sub>	Absorbância da amostra	
Abs <sub>Cr</sub>	Absorbância do controle	
ANOVA	Análise de variância	
a <sub>w</sub>	Atividade de água	
B <sub>1</sub>	Aflatoxina	
C	Constante de Guggenheim	
C <sub>10</sub>	Monoterpenos	
C <sub>15</sub>	Sesquiterpenos	
C <sub>5</sub>	Isopreno	
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama	
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas	
CMC	Carboximetilcelulose	
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	
CPA	Ácido ciclopiazônico	
d <sub>10</sub>	Tamanho de partícula em 10 % da curva acumulada	µm
d <sub>50</sub>	Tamanho de partícula em 50 % da curva acumulada	µm
d <sub>90</sub>	Tamanho de partícula em 90 % da curva acumulada	µm
d <sub>m</sub>	Diâmetro médio	µm
DE	Dextrose equivalente	
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco	
DMSO	Dimetilsulfóxido	
DPPH	Método/radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil	
DRX	Difração de raios-X	
EGF	Fator de crescimento epidermal	
F0	5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido	
F1	5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 20 g	

	/100 g amido	
F2	5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 25 g fibras/100 g amido	
F3	5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 25 g fibras/100 g amido + 1,5 g microcápsulas/ 100 mL suspensão	
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	
FTIR	Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier	
GA	Goma arábica	
GAB	Modelo de Guggenheim - Anderson - de Boer	
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>	
HAM	Meio nutriente	
He	Gás Hélio	
HEPES	Ácido 2- [4- (2-hidroxiethyl) piperazin-1-il]	
hid	Hidrólise	
I <sub>002</sub>	Intensidade máxima de difração em $2\theta \approx 22-23^\circ$	
I <sub>am</sub>	Intensidade mínima em $2\theta \approx 18-19^\circ$	
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória (50 % de inibição)	µg/
IC <sub>70</sub>	Concentração inibitória (70 % inibição)	µg/
IC <sub>90</sub>	Concentração inibitória (90 % inibição)	µg/
k	Constante de GAB	
L	Espessura do filme	m
M	Maltodextrina	
MEV	Microscopia eletrônica de varredura	
MIC	Concentração mínima inibitória	mg/
MID	Dose mínima inibitória	µL/
MN	Material de núcleo	
MP	Material de parede	
MTT	Método colorimétrico (sal de tetrazólio)	
NGM	Células de melanócitos humanos	
NIH3T3	Células de fibroblastos murinos	
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>	
OE	Óleo essencial	
PDA	<i>Potato Dextrose Agar/Agar Batata Dextrose</i>	

PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i> /Caldo Batata Dextrose	
PEBD	Polietileno de baixa densidade	
pH	Potencial hidrogeniônico	
PPBO	Polipropileno biorientado	
PVA	Permeabilidade ao vapor de água	g/h.
S1, S2 e	Parede secundária fibra vegetal	
SFB	Soro fetal bovino	
T	Temperatura	°C
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea	°C
UFC	Unidades formadoras de colônia	
UR	Umidade relativa	%
US	Ultrassom	
UV	Ultravioleta	
W	Taxa de permeação	g/h
X <sub>0</sub>	Teor de umidade da monocamada	g .
X <sub>CR</sub>	Índice de cristalinidade	%
X <sub>eq</sub>	Umidade de equilíbrio	g .
Y	Módulo de elasticidade ou módulo de Young	MP
ε	Elongação ou alongamento na ruptura	%
ρ <sub>s</sub>	Pressão de saturação do vapor de água	Pa
σ <sub>rup</sub>	Tensão de ruptura	MP



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Embalagens ativas antimicrobianas.....</b>	<b>33</b>
2.1.1 Filmes ativos antimicrobianos.....	34
<b>2.2 Filmes à base de amido.....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Métodos de elaboração de filmes biodegradáveis de amido.....	37
2.2.2 Propriedades de filmes de amido.....	38
2.2.2.1 Propriedades mecânicas.....	39
2.2.2.2 Propriedades de barreira à água.....	39
2.2.2.2.1 Isotermas de sorção de umidade.....	39
2.2.2.2.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	40
<b>2.3 Fibras de celulose.....</b>	<b>41</b>
<b>2.4 Óleos essenciais.....</b>	<b>44</b>
2.4.1 Óleo essencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	45
2.4.2 Óleo essencial de hortelã ( <i>Mentha arvensis</i> ).....	46
2.4.3 Mecanismo de ação antimicrobiano dos óleos essenciais.....	46
2.4.4 Potencial tóxico e alternativas de uso de óleos essenciais.....	47
<b>2.5 Incorporação de ativos antimicrobianos em filmes.....</b>	<b>47</b>
2.5.1 <i>Spray drying</i> .....	50
<b>2.6 Aplicação: filmes antimicrobianos e a conservação de pão.....</b>	<b>53</b>
2.6.1 Contaminação microbiana de pães.....	53
2.6.1.1 O gênero <i>Aspergillus</i> .....	55
2.6.1.2 O gênero <i>Penicillium</i> .....	57
2.6.2 Sistema complementar de conservação para pães.....	58
<b>2.7 Estado da arte.....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO (<i>Origanum vulgare</i>) E HORTELÃ (<i>Mentha arvensis</i>) PARA APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS</b>	
<b>3.1 Introdução.....</b>	<b>65</b>
<b>3.2 Material e Métodos.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2.1 Matéria prima.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2.2 Composição química.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2.3 Citotoxicidade.....</b>	<b>67</b>
3.2.3.1 Cultivo celular.....	68
3.2.3.2 Ensaio de Viabilidade Celular.....	68

<b>3.2.4 Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>69</b>
3.2.4.1 Preparo do Inóculo.....	69
3.2.4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (Minimal Inhibitory Concentration - MIC).....	70
3.2.4.3 Determinação da Dose Mínima Inibitória (Minimal Inhibitory Doses – MID).....	70
<b>3.2.5 Atividade antioxidante.....</b>	<b>71</b>
3.2.5.1 Método DPPH.....	71
<b>3.2.6 Análise estatística.....</b>	<b>72</b>
<b>3.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>73</b>
<b>3.3.1 Composição Química.....</b>	<b>73</b>
<b>3.3.2 Citotoxicidade.....</b>	<b>75</b>
<b>3.3.3 Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>78</b>
3.3.3.1 Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	79
3.3.3.2 Dose Mínima Inibitória (MID).....	82
<b>3.3.4 Atividade antioxidante.....</b>	<b>84</b>
3.3.4.1 Método DPPH.....	84
<b>3.4. Conclusões.....</b>	<b>86</b>

## **CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE MICROCÁPSULAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) OBTIDAS POR *SPRAY DRYING***

<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>87</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>88</b>
<b>4.2.1 Materiais.....</b>	<b>88</b>
<b>4.2.2 Produção de microcápsulas por <i>spray drying</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>4.2.3 Caracterização da emulsão e microcápsulas.....</b>	<b>90</b>
4.2.3.1 Umidade.....	90
4.2.3.2 Solubilidade.....	90
4.2.3.3 Higroscopicidade.....	91
4.2.3.4 Eficiência de encapsulamento.....	91
4.2.3.5 Rendimento de processo.....	91
4.2.3.6 Microestrutura/Morfologia.....	92
4.2.3.7 Distribuição de tamanho de partículas.....	92
4.2.3.8 Atividade antimicrobiana.....	92
<b>4.3. Resultados e discussão .....</b>	<b>93</b>
<b>4.3.1 Produção de microcápsulas por <i>spray drying</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>4.3.2 Caracterização da emulsão e microcápsulas.....</b>	<b>93</b>

4.3.2.1	Caracterização das microcápsulas e do processo de microencapsulamento.....	93
4.3.2.2	Microestrutura/Morfologia.....	96
4.3.2.3	Distribuição de tamanho de partículas.....	98
4.3.2.4	Atividade antimicrobiana.....	101
4.3.2.4.1	Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	101
4.3.2.4.2	Dose Mínima Inibitória (MID).....	102
<b>4.4.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>104</b>

## **CAPÍTULO 5 – OTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROFIBRAS DE CELULOSE PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS DE AMIDO-CELULOSE POR TAPE-CASTING**

<b>5.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>105</b>
<b>5.2</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>107</b>
5.2.1	Matéria-prima.....	107
5.2.2	Tratamentos para a produção de microfibras de celulose.....	108
5.2.3	Elaboração de suspensão filmogênica.....	109
5.2.4	Produção de filmes por <i>tape-casting</i> .....	109
5.2.5	Caracterização das microfibras de celulose e filmes de amido.....	110
5.2.5.1	Distribuição de tamanho de partícula.....	110
5.2.5.2	Potencial <i>zeta</i> ( $\zeta$ ).....	111
5.2.5.3	Microestrutura.....	111
5.2.5.4	Difração de raios X (DRX) .....	111
5.2.5.5	Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	112
5.2.5.6	Umidade.....	112
5.2.5.7	Espessura.....	112
5.2.5.8	Propriedades mecânicas.....	112
5.2.5.9	Propriedades de barreira à água.....	112
5.2.5.9.1	Isotermas de sorção de umidade.....	112
5.2.5.9.2	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	113
5.2.6	Análise estatística.....	114
<b>5.3.</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>114</b>
5.3.1	Tratamentos para a produção de microfibras de celulose.....	114
5.3.2	Elaboração de suspensão filmogênica e produção de filmes por <i>tape-casting</i> .....	114

<b>5.3.3 Caracterização das microfibras de celulose e filmes de amido.....</b>	<b>115</b>
5.3.3.1 Distribuição de tamanho de partícula.....	115
5.3.3.2 Potencial <i>zeta</i> ( $\zeta$ ).....	124
5.3.3.3 Microestrutura.....	126
5.3.3.4 Difração de raios X (DRX) .....	129
5.3.3.5 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	132
5.3.3.6 Propriedades mecânicas.....	135
5.3.3.7 Propriedades de barreira à água.....	138
5.3.3.7.1 Isotermas de sorção de umidade.....	138
5.3.3.7.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	140
<b>5.4. Conclusões.....</b>	<b>142</b>

## **CAPÍTULO 6 - PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES ATIVOS ANTIMICROBIANOS APLICADOS NA CONSERVAÇÃO DE PÃES**

<b>6.1 Introdução.....</b>	<b>143</b>
<b>6.2 Material e Métodos.....</b>	<b>145</b>
<b>6.2.1 Matéria-prima.....</b>	<b>145</b>
<b>6.2.2 Elaboração da suspensão filmogênica.....</b>	<b>145</b>
<b>6.2.3 Produção de filmes por <i>tape-casting</i>.....</b>	<b>145</b>
<b>6.2.4 Caracterização dos filmes.....</b>	<b>146</b>
6.2.4.1 Umidade.....	146
6.2.4.2 Espessura.....	146
6.2.4.3 Microestrutura.....	146
6.2.4.4 Atividade antimicrobiana.....	146
6.2.4.4.1 Método de difusão em disco (antifungigrama)	147
6.2.4.5 Propriedades mecânicas.....	147
6.2.4.6 Propriedades de barreira à água .....	147
6.2.4.6.1 Isotermas de sorção de umidade.....	147
6.2.4.6.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	147
<b>6.2.5 Aplicação – filmes antimicrobianos e a conservação de pães.....</b>	<b>148</b>
<b>6.2.6 Análise estatística.....</b>	<b>149</b>
<b>6.3. Resultados e discussão.....</b>	<b>150</b>
<b>6.3.1 Caracterização dos filmes.....</b>	<b>150</b>
6.3.1.1 Microestrutura.....	150
6.3.1.2 Atividade antimicrobiana.....	151
6.3.1.2.1 Dose mínima inibitória (MID).....	151

6.3.1.2.2 Método de difusão em disco (antifungigrama)	154
6.3.1.3 Propriedades mecânicas.....	156
6.3.1.4 Propriedades de barreira à água .....	158
6.3.1.4.1 Isotermas de sorção de umidade.....	158
6.3.1.4.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	160
<b>6.3.2 Aplicação – filmes antimicrobianos e a conservação de pães.....</b>	<b>162</b>
<b>6.4. Conclusões.....</b>	<b>167</b>
<b>7. Conclusões finais.....</b>	<b>168</b>
<b>SUGESTÕES DE TRABALHO FUTUROS.....</b>	<b>169</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>170</b>



## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

### DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGEM ATIVA ANTIMICROBIANA PARA PÃES DE FORMA

#### Por quê?

- ✓ A conservação de produtos de panificação é realizada pelo uso de aditivos sintéticos;
- ✓ Óleos essenciais são reconhecidos como antimicrobianos - faltam estudos sobre a sua atividade quando encapsulados e incorporados em filmes;
- ✓ Possibilidade de agregar valor a óleos essenciais com potencial antimicrobiano.

#### Quem já fez?

- ✓ Há muitos estudos sobre o uso de óleos essenciais como antimicrobianos, mas faltam estudos sobre o potencial citotóxico desses óleos e a atividade antimicrobiana dos compostos voláteis, para fins de aplicação em embalagem para alimentos;
- ✓ Há estudos sobre a utilização de óleos essenciais microencapsulados em diferentes áreas, mas faltam estudos sobre a atividade desses compostos em filmes antimicrobianos aplicados a produtos de panificação.

#### Hipóteses

- ✓ É possível incorporar óleos essenciais microencapsulados em filmes biodegradáveis de amido/microfibras de celulose;
- ✓ É possível estender o tempo de vida útil de pães de forma com o uso de embalagens ativas antimicrobianas.

**O que foi feito**

- ✓ Avaliação da citotoxicidade e propriedades biológicas de óleos essenciais;
- ✓ Microencapsulamento de óleo essencial e avaliação das propriedades das microcápsulas;
- ✓ Produção e caracterização de microfibras de celulose;
- ✓ Avaliação de filmes biodegradáveis de amido/microfibras de celulose produzidos por *tape-casting*;
- ✓ Produção e avaliação de embalagem antimicrobiana aplicada a pães de forma.

**Respostas**

- ✓ Microcápsulas de óleo essencial com potencial antimicrobiano;
- ✓ Filmes de amido melhorados com a adição de microfibras de celulose;
- ✓ Filme ativo antimicrobiano;
- ✓ Extensão da vida útil de pães de forma pelo uso de embalagem antimicrobiana.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a ABIP (Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria), o pão é um alimento essencial na mesa dos brasileiros. Além do valor nutritivo, algumas características importantes, como o alto teor de umidade e a atividade de água elevada, são comuns aos diferentes tipos de pães. Do ponto de vista microbiológico, essas características os tornam altamente suscetíveis à deterioração, mais frequente em pães fatiados e embalados, como os pães de forma (Legan, 1993).

O controle do desenvolvimento microbiano em pães é tradicionalmente realizado pelo uso de conservantes sintéticos, adicionados diretamente aos produtos acabados, através do tratamento das superfícies (ANVISA, 1999). O uso de conservantes naturais é uma prática que visa reduzir o teor de aditivos sintéticos e cria alternativas complementares aos métodos tradicionais de conservação de panificados (Souza, 2010).

Nos últimos anos, a utilização de antimicrobianos sintéticos está orientada para o uso combinado com substâncias de origem natural, com mecanismo de ação seletivo e atividade antimicrobiana potencial (Souza, 2010). Plantas e produtos da extração vegetal, como os óleos essenciais com propriedades antimicrobianas, representam uma fonte alternativa importante aos aditivos sintéticos (Belletti *et al.*, 2004).

A incorporação de óleos voláteis em embalagens aumenta o espectro de aplicação dessas substâncias. Utilizados em baixas concentrações em filmes, estes se tornam ativos e servem de veículo para a migração dos agentes para a superfície do produto (Coma, 2008; Han, 2000; Pérez-Pérez *et al.*, 2006; Quintavalla e Vicini, 2002).

A escassez de petróleo, associada ao crescente interesse pela redução da carga ambiental promovida pelo uso de polímeros sintéticos, estimularam a produção de filmes biodegradáveis à base de compostos provenientes de fontes renováveis, como o amido (Vicentini, 2003; Larotonda *et al.*, 2004; Yu, Dean e Li, 2006; Liu *et al.*, 2009). De uma maneira geral, filmes à base de amido apresentam propriedades mecânicas e de barreira inferiores aos materiais sintéticos clássicos. As alternativas para a melhoria dessas propriedades incluem a adição de compostos plastificantes e materiais de reforço, como fibras naturais, na matriz polimérica (Gontard, Guilbert e Cuq, 1993; Müller, Yamashita e Laurindo, 2008; Avérous, Fringant e Moro, 2001; Dufresne e Vignon,

1998; Müller, Laurindo e Yamashita, 2009; Müller, Laurindo e Yamashita, 2011).

Dada a natureza hidrofílica dos filmes de amido, o microencapsulamento prévio de ativos de natureza lipofílica constitui uma alternativa interessante de incorporação de óleos essenciais na matriz polimérica, para a produção de filmes ativos. Os filmes ativos representam uma forma importante de aplicação desses compostos e conferem a possibilidade de uma liberação gradual dos agentes com efeito antimicrobiano significativo (Suppakul, Sonneveld e Bigger, 2011; LaCoste *et al.*, 2005).

O objetivo geral deste estudo foi produzir uma embalagem ativa por *tape-casting*, através da incorporação de óleo essencial microencapsulado em filme de amido-microfibras de celulose, para extensão da vida útil de pães de forma.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Avaliar a composição química, toxicidade e propriedades biológicas dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e hortelã (*Mentha arvensis*);

- ✓ Selecionar condições de processo e material encapsulante para microencapsulamento de óleo essencial em *spray dryer*;

- ✓ Caracterizar e avaliar as propriedades antimicrobianas das microcápsulas;

- ✓ Produzir e caracterizar microfibras de celulose;

- ✓ Produzir filmes de amido-microfibras de celulose por *tape-casting* e caracterizá-los;

- ✓ Produzir e caracterizar filmes ativos antimicrobianos;

- ✓ Avaliar a extensão da vida útil de pães de forma pelo uso de filme ativo antimicrobiano.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Embalagens ativas antimicrobianas

O atual estilo de vida do consumidor requer um aumento progressivo da vida útil de alimentos, sem prejuízo ou perda das suas propriedades e com garantia de segurança e qualidade. Por esta razão, o desenvolvimento de novos sistemas de conservação de alimentos que contribuam para esse fim é cada vez mais importante. Várias técnicas são utilizadas para retardar a deterioração de alimentos, tais como atmosfera modificada, embalagem a vácuo, processos de esterilização e congelamento. No entanto, tecnologias emergentes, a exemplo das embalagens ativas, constituem uma alternativa promissora de extensão da vida útil do produto embalado. Essas embalagens aumentam a possibilidade de produção de alimentos parcial ou totalmente livres de conservantes e microbiologicamente seguros (Gutiérrez *et al.*, 2009).

As inovações tecnológicas buscam transpor o conceito tradicional de embalagem - barreira inerte que contém, mantém e conserva alimentos. Ao longo dos anos, vários estudos foram conduzidos para o desenvolvimento de embalagens ativas que, além de protegerem, interagem com o produto (César, Mori e Batalha, 2009; Appendini e Hotchkiss, 2002).

O termo embalagem ativa foi utilizado pela primeira vez por Labuza (1987) e definido como uma categoria de embalagem que exerce um papel adicional na preservação de alimentos, que não somente o de barreira inerte contra influências externas (Rooney, 2005). Segundo o projeto europeu “Actipak” FAIR (CT 98-4170), de 1999, a embalagem ativa tem o objetivo principal de prolongar a vida útil dos alimentos embalados (Vermeiren *et al.*, 1999). Esse novo conceito foi introduzido em resposta às mudanças contínuas nas demandas dos consumidores e nas tendências de mercado (Quintavalla e Vicini, 2002).

As embalagens ativas incluem os absorvedores de oxigênio e etileno; eliminadores e emissores de CO<sub>2</sub>; enzimas; controladores de umidade, sabor e odor; agentes antimicrobianos e antioxidantes, entre outros (César, Mori e Batalha, 2009). Contudo, o desafio na busca de formas inovadoras de inibição do crescimento microbiano nos alimentos, mantendo sua qualidade, frescor e segurança, apontou para o desenvolvimento de uma embalagem que incluísse materiais com propriedades antimicrobianas na sua constituição (Appendini e Hotchkiss, 2002).

Na embalagem antimicrobiana, o material de embalagem, o produto e o ambiente interagem para prolongar a fase *lag* e/ou reduzir a taxa de crescimento dos microrganismos. Essa categoria de embalagem ativa representa uma alternativa à incorporação direta de aditivos no produto e os problemas associados a essa prática (Suppakul *et al.*, 2006; Suppakul *et al.*, 2008).

As embalagens ativas antimicrobianas podem assumir diversas formas, dentre as quais se destacam os *sachets* contendo agentes antimicrobianos; os revestimentos ou adsorventes antimicrobianos aplicados nas superfícies de polímeros; a imobilização dos agentes antimicrobianos nos polímeros por meio de ligações covalentes ou iônicas; os polímeros antimicrobianos inerentes e os polímeros incorporados de agentes antimicrobianos voláteis e não-voláteis, objetos desse estudo (Appendini e Hotchkiss, 2002).

### **2.1.1 Filmes ativos antimicrobianos**

A aplicação direta de substâncias antimicrobianas na superfície de alimentos tem benefícios limitados, uma vez que os ativos podem ser neutralizados no contato e/ou difundir-se rapidamente da superfície para o interior dos alimentos. A incorporação de agentes antimicrobianos durante a preparação de alimentos pode resultar na sua interação, com consequente redução da atividade desses agentes e efeito limitado sobre a microflora presente. A utilização de filmes poliméricos incorporados de ativos, por sua vez, permite uma migração mais lenta dos agentes a partir do material de embalagem para a superfície do produto, auxiliando na manutenção das concentrações do antimicrobiano por mais tempo (Quintavalla e Vicini, 2002).

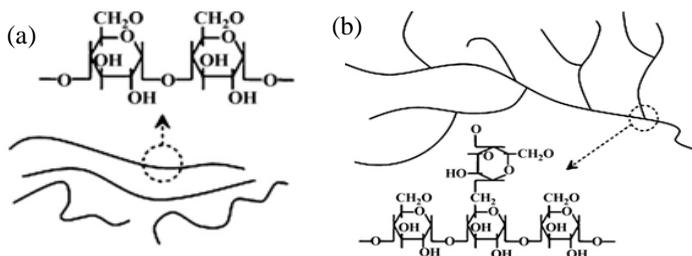
O interesse no desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis está relacionado a fatores ambientais, à necessidade de novas técnicas de armazenamento e à criação de mercados para *commodities* agrícolas subutilizadas e com boas propriedades de formação de filme (Quintavalla e Vicini, 2002). Filmes preparados a partir de polissacarídeos, proteínas e lipídios apresentam potencial para incorporação de ativos antimicrobianos. Dentre os polissacarídeos de maior disponibilidade, destaca-se o amido. Amidos de fontes variadas podem ser utilizados para preparar filmes com propriedades diferentes, para atender necessidades específicas do mercado (Avérous, Fringant e Moro, 2001; Larotonda *et al.*, 2004).

## 2.2 Filmes à base de amido

O amido é um polissacarídeo produzido pelas plantas superiores e distribuído na natureza na forma de grânulos (Liu *et al.*, 2009). É considerado um dos materiais naturais com maiores possibilidades de aplicação, de baixo custo, alta disponibilidade e biodegradabilidade (Guilbert, Gontard e Gorris, 1996; Avérous, Fringant e Moro, 2001).

Quimicamente formado pela união de monossacarídeos D-glicose, o amido é composto por grânulos semicristalinos contendo dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero de cadeia essencialmente linear, unida por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (Tharanathan, 2002). A amilopectina é o componente ramificado do grânulo. Sua cadeia é unida por ligações glicosídicas em  $\alpha$ -1,4 e ramificada em  $\alpha$ -1,6 (Vandeputte e Delcour, 2004) (Figura 2.1). As regiões mais ordenadas (cristalinas) do grânulo estão localizadas nas ramificações das moléculas de amilopectina, enquanto as regiões amorfas são formadas por moléculas de amilose (Imberty *et al.*, 1991).

**Figura 2.1:** Estruturas químicas e representação esquemática da (a) amilose e (b) amilopectina.



(Fonte: Liu *et al.*, 2009)

A gelatinização é uma propriedade funcional do amido e a base da sua conversão em um material termoplástico. Ela pode ser definida como um processo irreversível e multifases, que envolve o aquecimento em água, inchaço granular, fusão (perda de birrefringência) e solubilização molecular (Tharanathan, 2002; Liu *et al.*, 2009). Acima da temperatura de gelatinização, as ligações de hidrogênio se rompem e as moléculas de água se unem aos grupos hidroxila das moléculas de amido, resultando na dissolução dos cristais. As moléculas de amilose e

amilopectina são lixiviadas para fora do grânulo, promovendo a destruição da ordem molecular e causando alterações irreversíveis nas suas propriedades e cristalinidade (Liu *et al.*, 2009).

A retrogradação é o termo usado para descrever as transformações que ocorrem durante o resfriamento e armazenamento das dispersões de amido gelatinizado. Após a gelatinização, as moléculas de amilose tendem a se orientar mais rapidamente do que a amilopectina, devido à sua linearidade. Elas se aproximam o suficiente para formar pontes de hidrogênio entre hidroxilas adjacentes. O resultado é o aumento da cristalinidade e a formação de partículas insolúveis (Bobbio e Bobbio, 1995; Tharanathan, 2002). Esse processo consiste na conversão do amido do estado amorfo (gelatinizado) para o estado cristalino. A expulsão de parte da água da estrutura polimérica (sinerese) é resultado do empacotamento das moléculas de amido (Keetels, Oostergetel e Vliet, 1996).

Devido às múltiplas transições de fase, a microestrutura e as propriedades mecânicas dos materiais à base de amido dependem, em grande medida, das técnicas e condições de processamento utilizadas (Liu *et al.*, 2009). Filmes biodegradáveis à base de amido apresentam boas propriedades de barreira a gases e lipídeos e boas propriedades óticas. No entanto, apresentam limitações quanto às propriedades mecânicas e de barreira à água (Gallo *et al.*, 2000; Müller, Laurindo e Yamashita, 2009a; Müller, Laurindo e Yamashita, 2009b; Müller, Laurindo e Yamashita, 2011).

Na elaboração de filmes à base de polissacarídeos complexos, como o amido, a suspensão aquosa é adicionada de um plastificante e aquecida em temperatura acima da temperatura de gelatinização (Yang, Yu e Ma, 2006; Liu *et al.*, 2009). Compostos plastificantes, como os polióis (glicerol, sorbitol), reduzem a atração entre as cadeias poliméricas adjacentes, aumentam sua mobilidade e, conseqüentemente, a flexibilidade dos filmes (Gontard, Guilbert e Cuq, 1993; Garcia, Martino e Zaritzki, 2000; Müller, Yamashita e Laurindo, 2008).

A composição, o tamanho e a forma dos plastificantes também influenciam sua habilidade em interagir com as cadeias do polímero e as moléculas de água (Thomazine, Carvalho e Sobral, 2005; Müller, Yamashita e Laurindo, 2008). A hidrofiliçidade da molécula de plastificante favorece a adsorção de moléculas de água pelo filme (Gontard, Guilbert e Cuq, 1993).

Os plastificantes também aumentam a sensibilidade dos filmes às mudanças de umidade relativa e temperatura durante o armazenamento.

As alterações nas propriedades mecânicas e de barreira provocadas pela sorção de umidade são um inconveniente associado a esse tipo de material. O aumento da mobilidade molecular das cadeias provoca mudanças na cristalinidade e na temperatura de transição vítrea do amido (diminui com o aumento do conteúdo de umidade) (Gontard, Guilbert e Cuq, 1993; Müller, Yamashita e Laurindo, 2008; Müller, Laurindo e Yamashita, 2009a).

### **2.2.1 Métodos de elaboração de filmes biodegradáveis de amido**

Na área de alimentos, existe um grande interesse no desenvolvimento de filmes biodegradáveis para uso como material de embalagem. Esse interesse é motivado pelas preocupações ambientais sobre o descarte de materiais não renováveis, aliado à necessidade de novos mercados de matérias-primas formadoras de filme (Fakhouri *et al.*, 2007). Filmes biodegradáveis produzidos a partir de biopolímeros, como o amido, apresentam características e propriedades fortemente dependentes das técnicas e condições de processamento (Gontard, Guilbert e Cuq, 1993).

As técnicas mais comuns de produção de filmes de amido incluem a extrusão, moldagem por injeção e *casting*. Técnicas como a moldagem por compressão e a injeção podem levar à degradação da estrutura molecular. A extrusão é frequentemente combinada com outras técnicas, como a injeção, em condições de alta pressão e cisalhamento, que causam ruptura das ligações moleculares, perda de cristalinidade e alterações estruturais do amido (Liu *et al.*, 2009).

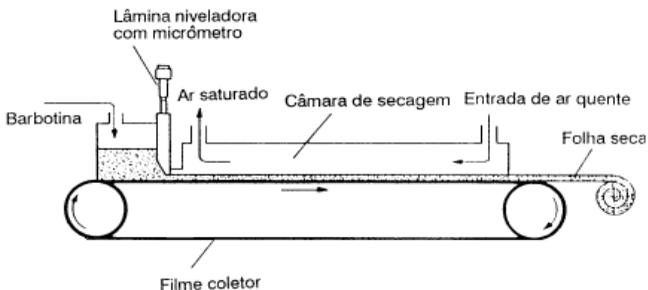
A produção de filmes de amido por *casting* inclui a solubilização da macromolécula em um solvente, gelatinização do amido, moldagem por espalhamento da suspensão em um suporte e secagem sob condições controladas (Vicentini, 2003). Esta técnica apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de longos tempos de secagem, além de não permitir a produção de filmes em grande escala (Müller, Laurindo e Yamashita, 2011; Moraes *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2015).

O *tape-casting*, ou colagem de folhas, é uma derivação da técnica de *casting*, utilizada para aumento de escala (*scale up*). Desenvolvida nos anos 40, foi originalmente utilizada para a fabricação de placas finas de materiais piezoelétricos e capacitores. A partir da década de 70, o processo de *tape-casting* passou a ser utilizado para a produção de peças cerâmicas planas e finas (Hotza, 1997). Atualmente, esse processo vem

sendo estudado e aplicado à produção de filmes biodegradáveis. Scheibe, Moraes e Laurindo (2014) estudaram a utilização do *tape-casting* para a produção de sacolas biodegradáveis à base de filmes de amido e fibras; Moraes *et al.* (2013) utilizaram o *tape-casting* para estudo de *scale up* de filmes de amido de mandioca; e Moraes *et al.* (2015) estudaram a secagem condutiva de filmes de amido-fibras de celulose preparados por *tape-casting*.

A colagem de folhas é realizada através do movimento relativo entre uma lâmina niveladora (*doctor blade*) e um suporte. O processo é descontínuo, quando a lâmina se move sobre uma superfície fixa; ou contínuo, se a superfície se move sob uma lâmina fixa (Figura 2.2). A secagem do filme é realizada sobre o suporte por convecção, radiação infravermelha, condução ou uma combinação destes métodos (Hotza, 1997; Moraes *et al.*, 2013; Scheibe, Moraes e Laurindo, 2014; Moraes *et al.*, 2015).

**Figura 2.2:** Equipamento de *tape-casting* de processamento contínuo.



(Fonte: Hotza, 1997)

### 2.2.2 Propriedades de filmes de amido

As propriedades dos filmes de amido, entre elas as características mecânicas, de barreira à água e gases e óticas, são avaliadas por métodos clássicos, aplicados aos materiais sintéticos e adaptados às características dos biopolímeros (Krochta e Mulder-Johnston, 1997). Os métodos para determinação das propriedades mecânicas e de barreira à água dos materiais amiláceos, apresentados a seguir, são importantes

para a compreensão do comportamento e estabilidade dos materiais à base de amido aplicados na confecção de embalagens de alimentos.

### **2.2.2.1 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas de filmes dependem do tipo de material utilizado na sua produção e, especialmente, da coesão estrutural resultante das ligações intermoleculares (Guilbert, Gontard e Gorris, 1996). Algumas propriedades mecânicas de filmes podem ser avaliadas por ensaios de tração. Esses ensaios envolvem a separação, a uma velocidade constante, de duas garras que prendem as extremidades de um corpo-de-prova e o registro da força ou resistência que o material oferece à deformação durante o ensaio (Sarantópoulos *et al.*, 2002).

As propriedades mecânicas avaliadas pelo teste de tração envolvem a determinação da tensão de ruptura ( $\sigma_{rup}$ ), que se refere à tensão máxima suportada pelo filme, nas condições do ensaio; alongação ou alongamento na ruptura ( $\epsilon$ ), que diz respeito à deformação (alongamento) sofrida pelo material antes do rompimento; e módulo de elasticidade ou módulo de Young (Y), que representa a rigidez do material. O módulo de Young é obtido pelo coeficiente angular da porção linear da curva de tensão-deformação (McHugh e Krochta, 1994).

### **2.2.2.2 Propriedades de barreira à água**

Os filmes devem constituir uma barreira que impeça ou dificulte o contato entre o ambiente externo e o produto em seu interior (Sarantópoulos *et al.*, 2002). Em filmes hidrofílicos, as propriedades de barreira à água são influenciadas pelas características intrínsecas do material, pelo teor de plastificante utilizado e pelas condições de umidade relativa e temperatura às quais os filmes são expostos (Müller, Yamashita e Laurindo, 2008).

#### **2.2.2.2.1 Isotermas de sorção de umidade**

O conteúdo de umidade dos biopolímeros afeta as propriedades de barreira à água de maneira significativa. Devido à natureza hidrofílica, filmes à base de amido tendem a absorver grandes quantidades de água a uma umidade relativa (UR) elevada (Cho e Rhee, 2002). As isotermas de sorção relacionam a atividade de água e a

umidade de equilíbrio a uma dada temperatura. Sua avaliação é um meio de caracterizar a higroscopicidade de diferentes materiais e determinar sua estabilidade e as possíveis alterações de qualidade durante o armazenamento de produtos embalados (Srinivasa, Ramesh e Tharanathan, 2007).

As isotermas de sorção são divididas em três regiões distintas. A primeira região, em atividade de água entre 0 e 0,35, corresponde à adsorção de um filme de água monomolecular. A segunda região, em valores de atividade de água entre 0,35 a 0,60, representa a adsorção de camadas adicionais de água acima da monocamada. A terceira região, em atividade de água maior do que 0,60, representa a água condensada nos poros do material, responsável pela dissolução de materiais solúveis (Labuza, 1968).

Brunauer, Emmett e Teller (1938) classificaram as isotermas de sorção de umidade segundo a variação da umidade de equilíbrio com a atividade de água dos produtos. Suas formas características estão apresentadas na Figura 2.3. As isotermas do tipo III são características de materiais amiláceos hidrofílicos.

**Figura 2.3:** Formas características de isotermas de sorção de umidade.



Fonte: Adaptado de Brunauer, Emmett e Teller (1938).

#### 2.2.2.2.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes representa a capacidade de controle do transporte de vapor de água entre um sistema e o ambiente externo. Ela pode ser útil na compreensão das interações entre os componentes do polímero e os possíveis mecanismos de transferência de massa (Kester e Fennema, 1986).

O conhecimento dessa propriedade é imprescindível para se definir as possíveis aplicações dos filmes em embalagens. Quando comparados com outros materiais, os filmes à base de amido apresentam alta permeabilidade ao vapor de água (Müller, Yamashita e Laurindo, 2008; Müller, Laurindo e Yamashita, 2011).

## 2.3 Fibras de celulose

Quando partículas rígidas são adicionadas às matrizes filmogênicas, tem-se o que se chama de compósitos. Os compósitos podem produzir uma série de efeitos desejáveis, como o aumento da rigidez e a melhora da resistência à deformação e à fratura dos filmes (Ahmed e Jones, 1990).

As fibras vegetais vêm sendo extensivamente aplicadas na produção de biocompósitos. Comparados aos agentes inorgânicos, fibras lignocelulósicas oferecem vantagens como natureza renovável, variedade e disponibilidade, baixo custo, baixa densidade, flexibilidade, natureza não abrasiva, entre outras (Dufresne, Dupeyre e Vignon, 2000; Dias *et al.*, 2011).

A incorporação de fibras naturais às matrizes filmogênicas é uma alternativa de superação das fragilidades dos materiais à base de amido. Além das limitações mecânicas, filmes de amido são muito sensíveis à umidade. Quando adicionadas às suspensões filmogênicas, as fibras contribuem para o reforço mecânico e a redução da permeabilidade ao vapor de água desses materiais (Müller, Laurindo e Yamashita, 2009b; Dias *et al.*, 2011; Moraes, Reszka e Laurindo, 2014).

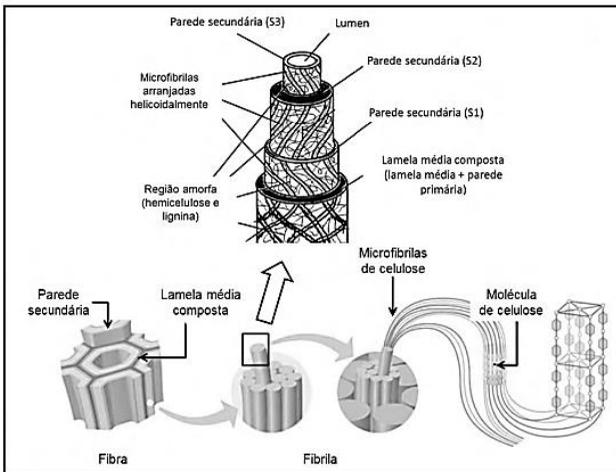
A compatibilidade entre a matriz polimérica de amido e as fibras vegetais é resultado de interações intermoleculares entre os componentes. Segundo Wollerdorfer e Bader (1998), essa compatibilidade se deve à aderência da interface fibra-matriz, dada a semelhança química entre os termoplásticos e as fibras vegetais. O resultado dessa interação é a melhoria das performances das matrizes (Curvelo, Carvalho e Agnelli, 2001; Wollerdorfer e Bader, 1998; Dufresne e Vignon, 1998; Lu, Weng e Cao, 2006).

A organização de uma fibra vegetal está representada na Figura 2.4. As fibras lignocelulósicas apresentam-se em uma estrutura de camadas complexas, separadas por uma parede primária e uma parede secundária. A parede primária é depositada durante o crescimento das células e circunda a parede secundária. A parede secundária é constituída por três camadas (S1, S2 e S3). A camada intermediária (S2) determina as propriedades mecânicas da fibra e consiste em uma série de microfibrilas, formadas por longas cadeias de celulose organizadas (Silva *et al.*, 2009).

Fibras lignocelulósicas são constituídas de celulose, hemicelulose e lignina, principalmente (Silva *et al.*, 2009). Durante a biossíntese, as cadeias de fibrilas primárias se agregam e originam microfibrilas

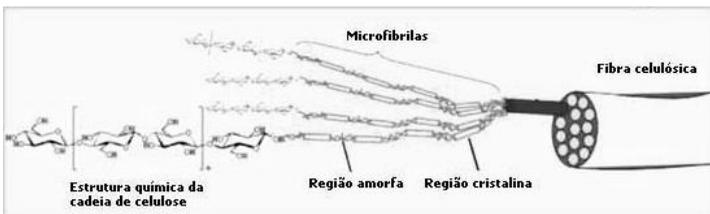
extensas, filamentosas, com feixes de moléculas altamente cristalinos, estabilizados por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares (Andresen e Stenius, 2007). As microfibrilas são compostas de regiões cristalinas (ordenadas) e amorfas (desordenadas) (Figura 2.5) (Tischer *et al.*, 2010). O ângulo de orientação das microfibrilas determina a dureza das fibras. A alta rigidez axial das fibras de celulose é uma propriedade desejável para o reforço de compósitos (Eichhorn *et al.*, 2010).

**Figura 2.4:** Estrutura de uma fibra vegetal



(Fonte: Thomas *et al.*, 2011)

**Figura 2.5:** Estrutura das fibras celulósicas



(Fonte: Lavoine *et al.*, 2012).

A celulose é o polímero mais abundante no mundo. Do ponto de vista químico, é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glicose em arranjo linear, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1,4)

(Andresen e Stenius, 2007; Silva *et al.*, 2009). Esta unidade repetitiva, conhecida como celobiose, contém seis grupos hidroxila, que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Devido a essas ligações, há uma forte tendência da celulose de formar cristais. O grau de cristalinidade e a dimensão dos cristais variam com a origem da celulose (Tischer *et al.*, 2010).

A capacidade das fibras naturais de contribuir para a melhoria das propriedades mecânicas de biocompósitos depende do tipo de celulose. As variações na conformação ou no empacotamento das cadeias celulósicas dentro dos cristais dão origem aos polimorfos cristalinos, designados como  $I_{\alpha}$ ,  $I_{\beta}$ , II, III<sub>I</sub>, III<sub>II</sub>, IV<sub>I</sub> e IV<sub>II</sub>. Cada uma destas formas cristalinas apresenta características físicas e químicas próprias, como solubilidade, densidade, ponto de fusão, forma, propriedades óticas e elétricas. Na natureza, as celulosas  $I_{\alpha}$  e  $I_{\beta}$ , chamadas de celulose nativa, são as mais abundantes. A celulose  $I_{\beta}$  é a forma cristalina majoritária em plantas superiores. O tipo I é o principal responsável pelo potencial de reforço mecânico da celulose (Morán *et al.*, 2008).

A melhoria das propriedades de filmes pela adição de fibras também depende do grau de incorporação desse material na matriz. A obtenção de compósitos homogêneos é o principal desafio no processo de preparação. Para isso, os cristais de celulose têm de ser isolados, de forma a evitar problemas de dispersão (Bondeson, Mathew e Oksman, 2006). Uma boa dispersão está relacionada à técnica de processamento do filme, à natureza físico-química da matriz e à interação matriz-fibra (Avérous, Fringant e Moro, 2001; Dufresne, Dupeyre e Vignon, 2000).

Os processos de fracionamento das fibras para a obtenção de nano ou microcelulose se dividem em métodos mecânicos, químicos, enzimáticos ou métodos combinados. Os métodos mecânicos incluem a moagem, a homogeneização a alta pressão e o ultrassom de alta intensidade; os métodos químicos englobam as hidrólises ácidas e básicas; e os métodos biológicos, as hidrólises enzimáticas (Chen *et al.*, 2011).

A hidrólise é basicamente responsável pela destruição das regiões amorfas ao redor e entre as microfibrilas de celulose. Os segmentos cristalinos continuam intactos, pois a cinética da hidrólise da região amorfa é mais rápida do que a da região cristalina, em virtude da maior permeabilidade da região amorfa (Samir, Alloin e Dufresne, 2005).

O tratamento mecânico por ultrassom é considerado um método emergente de obtenção de micro/nanofibras de celulose. A energia do ultrassom é transferida para as cadeias de celulose por meio de um

processo chamado cavitação, que inclui a formação, o crescimento e o colapso violento de cavidades na água. A energia fornecida pela cavitação é de 10-100 kJ/mol, aproximadamente. O impacto do ultrassom pode desintegrar, gradualmente, as fibras de celulose (Tischer *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2011).

O alto consumo energético necessário para promover a desintegração de fibras de celulose deu origem a um tratamento que combina a hidrólise e o tratamento mecânico para a produção de micro/nano fibras de celulose (Tischer *et al.*, 2010). O tratamento químico-mecânico promove o aumento da área superficial da celulose. As pequenas dimensões das fibrilas aumentam a superfície de contato entre os polímeros e a celulose e o resultado é uma excelente adesão das microfibrilas às matrizes poliméricas (Wang e Sain, 2007).

Os tratamentos aplicados às fibras de celulose para a produção de micro/nanofibras têm o propósito geral de aplicação na produção de compósitos. Combinadas a uma matriz polimérica adequada, micro e/ou nanofibras de celulose apresentam um potencial considerável de reforço. Essas misturas são preparadas na tentativa de conciliar as distintas propriedades existentes em diferentes componentes puros e/ou, ainda, aprimorar as características de cada componente em decorrência de interações favoráveis no material compósito (Wang e Sain, 2007; Silva *et al.*, 2008b).

## 2.4 Óleos essenciais

Óleos essenciais, também chamados óleos voláteis ou etéreos, são compostos líquidos aromáticos, obtidos de diferentes partes de plantas (Burt, 2004). Aproximadamente 3.000 tipos são conhecidos, 300 deles considerados comercialmente importantes. A aplicação desses óleos engloba as indústrias farmacêuticas, de alimentos, cosméticos, perfumes, agrônômica e sanitária (Bakkali *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais são misturas complexas, caracterizadas por dois ou três compostos majoritários, em concentrações relativamente elevadas (20-70%) (Bakkali *et al.*, 2008). Sua composição está fortemente relacionada à origem da matéria-prima, ao estágio de desenvolvimento e à parte da planta utilizada na extração, às condições de cultivo e ao processo de extração do óleo (Kalemba e Kunicka, 2003; Simões e Spitzer, 2003). Embora varie consoante às espécies de plantas, no geral os óleos essenciais contêm 85-95 % de compostos voláteis e até 15 % de não voláteis (Bakkali *et al.*, 2008). As propriedades destes

óleos são determinadas pela estrutura química e a concentração de seus componentes (Fisher e Philips, 2008).

Os compostos voláteis são uma mistura de terpenos, terpenoides, constituintes aromáticos e alifáticos, caracterizados pela baixa massa molar (Bakkali *et al.*, 2008). Os terpenos são resultantes da combinação de várias unidades de cinco carbonos (C<sub>5</sub>), chamadas isoprenos, dentre os quais se destacam os monoterpênicos (C<sub>10</sub>) e os sesquiterpenos (C<sub>15</sub>). Os terpenoides são terpenos que contêm moléculas de oxigênio na sua composição, em razão de modificações bioquímicas enzimáticas. Eles se dividem em alcoóis, ésteres, aldeídos, cetonas, éters, fenóis etc. Suas estruturas químicas estão estreitamente relacionadas com as dos terpenos e suas propriedades podem ser atribuídas, na maioria, aos seus grupos funcionais (Hyldgaard, Mygind e Meyer, 2012).

Os óleos essenciais podem se apresentar puros ou misturados, retificados (submetidos à destilação fracionada), desterpenados (retirada da quase totalidade dos terpenos) ou concentrados. Podem ser obtidos por prensagem, fermentação, *enfleurage* (extração com gordura animal ou vegetal) ou extração com solventes orgânicos. O método de destilação a vapor é o mais comumente utilizado para a produção comercial. A extração a alta pressão (extração supercrítica) produz um material de alta qualidade, porém de alto custo (Burt, 2004).

#### 2.4.1 Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

O orégano (*Origanum* ssp) é uma erva originária da Ásia e Europa mediterrânea. Diferentes espécies do gênero são utilizadas como insumos nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, como erva culinária, flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e perfumaria (Sivropoulou *et al.*, 1996).

A espécie *Origanum vulgare* (Figura 2.6) é reconhecida por suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, diurética, antisséptica, digestiva, entre outras (Milos, Mastelic e Lerkivic, 2000). É composta de substâncias como o carvacrol e timol, hidrocarbonetos monoterpênicos, como o limoneno, terpineno e cariofileno e álcoois monoterpênicos, como o 4-terpineol, de comprovada atividade antimicrobiana (Sahin *et al.*, 2004), especialmente em alimentos (Aligians *et al.*, 2001).

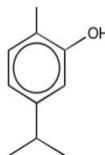
O carvacrol (2-metil-5- (1-metiletil) fenol) (Figura 2.7) é um monoterpenoide fenólico, com propriedades biostáticas e biocidas contra muitas bactérias, leveduras e fungos (Burt, 2004).

**Figura 2.6:** Foto ilustrativa da planta de *Origanum vulgare*.



(Fonte: <http://www.brest.sk/>) (Fonte: <http://www.uniduesseldorf.de>)

**Figura 2.7:** Estrutura do composto carvacrol.



### 2.4.2 Óleo essencial de hortelã (*Mentha arvensis*)

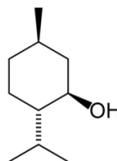
A *Mentha arvensis* (Figura 2.8) é uma planta pertencente à família *Labiatae*, conhecida como hortelã pimenta, hortelã japonesa, menta e pimenta japonesa (Freitas, Martins e Vieira, 2004). Suas aplicações industriais incluem produtos de higiene bucal, flavorizantes de alimentos e bebidas, perfumaria e produtos farmacêuticos (Kumar *et al.*, 2002).

O óleo essencial de *Mentha arvensis* é rico em mentol (1R, 2S, 5R-2-isopropil-5-metilcicloexanol) (Figura 2.9), um álcool terpênico monocíclico com propriedades antibacteriana, antiviral e antifúngica (Singh *et al.*, 2011).

**Figura 2.8:** Foto ilustrativa da planta de *Mentha arvensis*.



**Figura 2.9:** Estrutura do composto mentol.



(Fonte: <http://www.onlyfoods.net/>) (Fonte: <http://qnint.sbg.org.br/>)

### 2.4.3 Mecanismo de ação antimicrobiano dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada à estrutura química dos seus componentes, concentração e interação entre eles (Avila-Sosa *et al.*, 2012). Os mecanismos de ação antimicrobianos atuam em conjunto sobre a estrutura da parede celular e

membrana citoplasmática microbiana, causando danos funcionais e estruturais importantes (Kalembe e Kunicka, 2003; Holley e Patel, 2005). Entre esses danos estão a ruptura da parede celular, a desintegração das membranas citoplasmática e mitocondrial, alterações na permeabilidade da membrana, perda de citoplasma e morte celular (Burt, 2004; Fisher e Philips, 2008).

#### **2.4.4 Potencial tóxico e alternativas de uso de óleos essenciais**

Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*), os óleos essenciais são substâncias naturais geralmente reconhecidas como seguras (GRAS – *Generally Recognized as Safe*) (López *et al.*, 2007). No entanto, produtos da extração vegetal apresentam certo grau de toxicidade, geralmente mais elevado do que o da planta de origem. O uso seguro desses produtos deve estar suportado por estudos toxicológicos (Simões e Spitzer, 2003; Veiga Jr, Pinto e Maciel, 2005).

Alguns autores relacionam o grau de toxicidade de extratos vegetais à dose e frequência de administração. Em alguns casos, mesmo baixas dosagens acarretam intoxicações, devido à sensibilidade individual. Esses compostos podem provocar alergias e problemas mais graves, principalmente quando administrados via oral (De Vincenzi *et al.*, 2004; Veiga Jr, Pinto e Maciel, 2005).

Quando aplicados diretamente sobre o alimento, por imersão ou pulverização, os compostos ativos presentes em óleos essenciais são rapidamente perdidos, devido à volatilidade relativa dos componentes. Os filmes ativos, elaborados pela incorporação dos antimicrobianos em matrizes poliméricas, agem como carreadores dessas substâncias à superfície dos alimentos, assegurando a presença e atividade do conservante por um período maior (Avila-Sosa *et al.*, 2012). A produção dos filmes ativos e a volatilidade relativa dos compostos levam à perda de alguns componentes. Essas perdas podem implicar em redução das atividades desses óleos, porém constituem uma alternativa de uso de compostos tidos como tóxicos numa possível condição de menor e/ou ausência de toxicidade, que deve ser atestada por estudos toxicológicos.

#### **2.5 Incorporação de ativos antimicrobianos em filmes poliméricos**

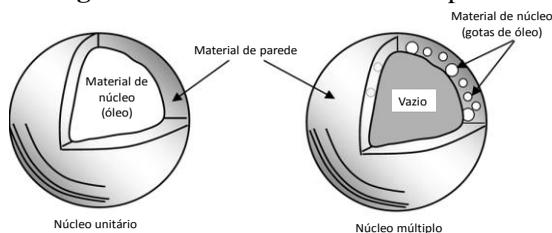
Com o objetivo de retardar e/ou inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis sobre os diferentes gêneros alimentícios, substâncias antimicrobianas são incorporadas ou revestidas sobre

materiais de embalagem de alimentos para a produção das embalagens ativas (Labuza e Breene, 1989). Na forma de filmes antimicrobianos, as embalagens ativas se comportam como veículos emissores, capazes de transferir os agentes antimicrobianos para o produto embalado ou para o espaço livre da embalagem (*headspace*) (Vermeiren *et al.*, 1999). O mecanismo de ação dos filmes ativos é baseado na liberação gradual dos agentes antimicrobianos durante o armazenamento dos alimentos (Corradini *et al.*, 2013).

A incorporação de ativos na matriz polimérica pode ser feita diretamente; por imobilização; ou por recobrimento e adsorção (Appendini e Hotchkiss, 2002; Pérez-Pérez *et al.*, 2006). Dada a natureza hidrofílica dos filmes de amido, a incorporação de ativos lipofílicos na matriz filmogênica pode ser facilitada pelo microencapsulamento prévio dos compostos antimicrobianos.

O encapsulamento é definido como uma tecnologia de empacotamento de substâncias. Na sua forma mais simples, uma microcápsula é uma pequena esfera, composta do material encapsulado, denominado de recheio ou núcleo; e do material encapsulante, chamado de cobertura ou parede. Nesse processo, os ingredientes ativos (materiais de núcleo) são embalados no interior de um material secundário (parede). De acordo com o seu tamanho, as cápsulas são classificadas em: macro ( $>5000 \mu\text{m}$ ), micro ( $0,2 - 5000 \mu\text{m}$ ) e nanocápsulas ( $<0,2 \mu\text{m}$ ) (Azeredo, 2005).

As estruturas das microcápsulas se dividem em duas principais, uma estrutura de núcleo único (*single core*) e outra de múltiplos núcleos (*multiple core*), conforme apresentado na Figura 2.10. A primeira é normalmente produzida por meio de coacervação complexa, secagem em leite fluidizado e co-extrusão. Caracteriza-se pela concentração do núcleo na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede (Ré, 1998). As cápsulas de núcleos múltiplos são produzidas por *spray drying*, principalmente, e caracterizam-se pela dispersão do material de núcleo por todo o material de parede e a ocupação da área central por um espaço vazio, resultante da expansão das partículas durante a fase final de secagem (Sheu e Rosenberg, 1998; Ré, 1998).

**Figura 2.10:** Estruturas de microcápsulas

(Fonte: Tonon, Brabet e Hubinger, 2009).

O passo inicial no encapsulamento de um ativo é a seleção de um material de parede adequado. A escolha deve ser feita dentre uma variedade de polímeros naturais e sintéticos, de acordo com o material ativo a ser recoberto e com as características finais desejadas para as microcápsulas. O microencapsulamento de óleos, em particular, requer um material da parede com propriedades emulsionantes, capaz de formar filme, de alta solubilidade, baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos, baixa higroscopicidade, com boas propriedades de secagem, capaz de liberar o material de núcleo quando reconstituído num produto acabado, de baixo custo, estável e capaz de conferir boa proteção ao encapsulado (Ré, 1998). Segundo alguns autores, materiais de parede para a microencapsulação de óleos essenciais devem ser compostos de grupos hidrófilos e hidrófobos, a fim de permitir a sua emulsificação e estabilização na matriz (Sarkar *et al.*, 2013).

O microencapsulamento oferece vários benefícios aos materiais encapsulados, dentre eles: i) redução das interações do núcleo com fatores ambientais (temperatura, umidade, radiação UV); ii) separação de componentes reativos ou incompatíveis; iii) redução da evaporação e taxa de transferência do material do núcleo para o ambiente exterior; iv) melhora da solubilidade; v) controle da liberação do material do núcleo, sob condições específicas (Azeredo, 2005). Para óleos essenciais e aromas, o microencapsulamento é utilizado por um número de outras razões, como a liberação gradual de compostos voláteis, a prevenção de degradação química ou interações incompatíveis, possibilidade de incorporação em sistemas secos e modulação da liberação de aromas e perda de voláteis (Ré, 1998).

A escolha do método de encapsulamento depende de fatores como: i) tamanho de partículas requerido; ii) propriedades físicas e

químicas do núcleo e da parede; iii) aplicação do produto final; iv) mecanismos de liberação; e v) escala e custo de produção. Os métodos de encapsulamento se dividem em métodos físicos (*spray drying*, *spray chilling*, *spray cooling*, co-cristalização, liofilização e emulsão dupla), métodos químicos (inclusão molecular e polimerização interfacial) e métodos físico-químicos (coacervação, evaporação emulsão-solvente). Um dos processos mais comumente utilizados para o encapsulamento de compostos voláteis é o método de *spray drying* (Ré, 1998).

### 2.5.1 *Spray Drying*

O método de *spray drying* é uma tecnologia de microencapsulamento líder nas indústrias de alimentos, devido ao baixo custo e disponibilidade de equipamentos. É um dos métodos conhecidos mais antigos, utilizado na década de 1930 para encapsular compostos flavorizantes (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A preparação da dispersão ou emulsão de alimentação é o primeiro passo no processo de encapsulamento por *spray drying*. O processo consiste na atomização de uma dispersão/emulsão para formação de pequenas gotículas. Um fluxo de ar quente em co-corrente ou contra corrente promove a evaporação da água dessas partículas e o empacotamento do material de núcleo (Desai e Park, 2005; Reineccius, 2004). O sucesso do processo está na alta retenção do material de núcleo (Ré, 1998).

A grande área superficial das partículas atomizadas garante uma exposição ao ar quente por um curto período de tempo (alguns segundos), reduzindo a ocorrência de alterações indesejáveis em compostos termossensíveis (Gharsallaoui *et al.*, 2007). A rápida evaporação da água mantém a temperatura do núcleo inferior a 100 °C, apesar das temperaturas elevadas utilizadas no processo (Rosenberg, Kopelman e Talmon, 1990).

Por meio da redução da atividade de água, a secagem por pulverização assegura a estabilidade microbiológica dos produtos, reduzindo o risco de degradação química e/ou biológica e os custos de armazenamento e transporte (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Esses fatores tornam o processo de *spray drying* uma opção interessante para o microencapsulamento de óleos essenciais.

O sucesso do processo de microencapsulação por *spray drying* e a garantia de retenção de compostos ativos com atividades biológicas importantes estão relacionados à, pelo menos, quatro critérios: i) as

condições de secagem; ii) as especificações da emulsão; iii) as propriedades dos materiais de parede; e iv) as propriedades dos materiais de núcleo (Rosenberg, Kopelman e Talmon, 1990; Jafari *et al.*, 2008). As condições de processo e as características da emulsão relativas às temperaturas de processamento, teor de sólidos, viscosidade e tamanho de partícula provaram ter influência na retenção dos compostos. No entanto, as naturezas dos materiais de núcleo e de parede são os fatores determinantes mais importantes do processo (Goubet, Le Quere e Voilley, 1998).

O estado físico do encapsulante (material de parede) e as suas características físico-químicas, como massa molar, conformação molecular e funcionalidade química estão associadas à retenção dos voláteis (Bertolini, Siani e Grosso, 2001). Essas características influenciam as propriedades da emulsão antes da secagem, a retenção e a difusão dos compostos voláteis durante o processo e a vida útil do material encapsulado após a secagem (Jafari *et al.*, 2008).

Revestimentos de maior massa molar apresentam maior capacidade de retenção, devido à redução da difusividade dos voláteis na matriz durante a secagem e à formação de uma crosta seca na superfície da partícula. A conformação molecular determina a quantidade e a natureza das interações moleculares que, por sua vez, determinam uma maior ou menor capacidade de retenção, de acordo com a natureza dos grupos químicos presentes (Goubet, Le Quere e Voilley, 1998).

A natureza do material de parede também influencia a retenção de voláteis. A goma acácia, também conhecida como goma arábica, é um exsudado obtido naturalmente ou pela incisão dos troncos e ramos de *Acacia senegal*. A goma arábica é o ingrediente mais popular e comum no microencapsulamento de óleos essenciais por *spray drying* devido, principalmente, à sua elevada solubilidade em água, baixa viscosidade em soluções concentradas (em relação a outras gomas), boa capacidade de emulsificação e formação de filme e excelente capacidade de retenção de voláteis durante o processo de secagem (Rosenberg, Kopelman e Talmon, 1990; McNamee, O’Riordan e O’Sullivan, 1998; Bertolini, Siani e Grosso, 2001; Goubet, Le Quere e Voilley, 1998; Sarkar *et al.*, 2013).

Amidos hidrolisados, como a maltodextrina, também são extensivamente utilizados no encapsulamento por *spray drying*, devido à alta solubilidade em água, baixa viscosidade e boas propriedades de secagem. No entanto, maltodextrinas não possuem boa capacidade de

retenção de voláteis durante o processo de secagem devido, provavelmente, à pequena habilidade de formar filme (Reineccius e Risch, 1986).

As características do material de núcleo, como massa molar, volatilidade relativa e polaridade dos compostos também afetam a retenção de voláteis durante o processo de secagem (Ré, 1998). Compostos de baixa massa molar têm maior capacidade de se difundir através da matriz durante a secagem. O aumento da massa molar dos compostos voláteis implica no aumento do tamanho da molécula e na redução da taxa de difusão. Como consequência, a migração do composto para a superfície da matriz é retardada, particularmente nos estágios iniciais da secagem (Rosenberg, Kopelman e Talmon, 1990, Goubet, Le Quere e Voilley, 1998). À medida que a superfície das partículas se torna (semi) impermeável, a difusão também é reduzida e efetivamente para em condições de baixo teor de umidade. Essas condições favorecem a retenção de moléculas voláteis de maior massa molar (Jafari *et al.*, 2008).

No geral, quanto maior a volatilidade relativa, menor a retenção dos compostos. No início do processo de atomização, a retenção é função da volatilidade relativa dos compostos, principalmente. De acordo com a teoria da difusão seletiva de Thijssen e Rulkens (1968), a retenção de voláteis em microcápsulas produzidas por *spray drying* é determinada pelo efeito limitante da difusão da fase líquida para a superfície da gotícula. Enquanto a concentração de água na superfície da gotícula decresce, o coeficiente de difusão dos componentes voláteis decresce numa taxa superior ao da água. Isso significa que a água continua a difundir a uma taxa significativa, enquanto os voláteis difundem a uma taxa desprezível. A superfície da gotícula então alcança determinado conteúdo de umidade e torna-se impermeável para a maior parte dos voláteis, além de pouco permeável às moléculas de água (Rosenberg, Kopelman e Talmon, 1990; Reineccius, 2004). Após a formação da parede/revestimento da cápsula, outros fatores tornam-se preponderantes no controle do fenômeno da difusão através da parede. A partir daí, a volatilidade relativa desempenha um papel secundário na retenção de voláteis (Thijssen e Rulkens, 1968).

Quanto maior a polaridade dos compostos, menor a retenção. Uma polaridade maior implica em maior solubilidade do composto encapsulado no meio aquoso. O resultado é uma maior capacidade de difusão através da matriz durante o processo de secagem, comparado aos compostos apolares (Ré, 1998; Rosenberg, Kopelman e Talmon,

1990). Segundo Goubet, Le Quere e Voilley (1998), a retenção de compostos segundo os grupos funcionais obedece a seguinte ordem, no geral: ácidos < ésteres = cetonas < alcoóis. Bertolini, Siani e Grosso (2001), em seu trabalho sobre o microencapsulamento de monoterpenos em goma arábica por *spray drying*, demonstraram que a maior polaridade das funções químicas aldeído e álcool, em comparação aos hidrocarbonetos, determinaram uma menor retenção dos compostos durante o processo.

Segundo Hecht e King (2000), a perda de voláteis ocorre em três momentos do processo de secagem: (1) durante a atomização; (2) após a formação das cápsulas, quando a superfície ainda não formou uma membrana seletiva estável; e (3) quando a água excede o seu ponto de ebulição e bolhas formadas no interior da gotícula irrompem para fora da superfície e levam junto os voláteis. As perdas durante esta terceira fase são maiores. As alterações morfológicas durante o período de expansão das cápsulas podem expor superfícies e líquidos do interior da cápsula, com conseqüente perda de voláteis, anteriormente aprisionados pela difusão seletiva (Ré, 1998).

Uma encapsulação bem sucedida de aromas e óleos essenciais deve resultar num pó com um teor de óleo superficial mínimo, associado à retenção máxima do material do núcleo, particularmente voláteis, no interior das partículas (Jafari *et al.*, 2008). Óleos essenciais contêm muitos componentes de volatilidades diferentes, de forma que a perda de certos compostos aromáticos de baixo ponto de ebulição é inevitável. Ainda assim, os constituintes relativamente mais voláteis são quase que completamente retidos quando as condições de secagem são ideais (Reineccius, 2004).

## **2.6 Aplicação: filmes antimicrobianos e a conservação de pães**

### **2.6.1 Contaminação microbiana de pães**

O pão é um dos produtos mais consumidos pela humanidade, especialmente pelas populações ocidentais. No Brasil, dezenas de milhões de pessoas consomem, todos os dias, toneladas de produtos de panificação. E apesar de essencialmente presente na mesa dos brasileiros, o pão é um produto altamente perecível, facilmente contaminado por microrganismos deteriorantes e produtores de toxinas prejudiciais à saúde humana (Freire, 2011).

Regiões de clima tropical e temperado, com grande variação de temperatura e umidade, comuns no Brasil, favorecem o desenvolvimento microbiano, especialmente em alimentos com alta atividade de água, como o pão. Associado a isso, condições ideais de nutrição, pH, temperatura e umidade elevadas no ambiente de armazenamento, corte em fatias, embalagem a quente e má higiene dos manipuladores levam à contaminação e deterioração de produtos panificados (Silva *et al.*, 2008a; Freire, 2011). Todavia, a atividade de água e a temperatura são os principais determinantes no crescimento e produção de micotoxinas por fungos (Garcia *et al.*, 2011).

A contaminação fúngica de pães ocorre preferencialmente após o processamento, através da deposição de esporos provenientes do ar, manipuladores, superfície de equipamentos de fatiamento, resfriamento e embalagem (Cornea *et al.*, 2011). O nível de esporos de fungos no ar nas indústrias de panificação pode variar entre 100 e 2500 esporos/m<sup>3</sup> (Cauvain e Young, 2007).

O efeito da deterioração de pães por fungos se manifesta pelo aparecimento do micélio na superfície do produto, por vezes antes do final da sua vida útil, ocasionando rejeição pelo consumidor (Baert *et al.*, 2007). Além da aparência indesejável, os fungos são responsáveis por alterações nas características sensoriais dos produtos, como sabor e odor (Berenguer *et al.*, 1991, Hill *et al.*, 1995, Nielsen e Rios, 2000), devido à produção de exoenzimas, como lipases, proteases e carboidrases (Filtenborg *et al.*, 1996).

Apesar de algumas variações, no geral a deterioração de produtos de panificação está associada a fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Chrysonilia*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*. Espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* ocorrem com maior frequência (Figura 2.11). (Pitt e Hocking, 2009).

Embora constituam um grupo diversificado de organismos de grande significância para a biotecnologia industrial, a deterioração de alimentos e a produção de toxinas por fungos resultam em perdas econômicas relevantes em todo o mundo. Essas perdas representam 10 % da produção anual e acarretam prejuízos da ordem de R\$ 3 bilhões ao ano. Em países da Europa, essas perdas não ultrapassam 5 % (Silva *et al.*, 2008a; Freire, 2011).

**Figura 2.11:** Pão de forma contaminado por *Aspergillus* e *Penicillium*.



(Fonte: Freire, 2011)

### 2.6.1.1 O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é um dos mais antigos conhecidos. Seu nome deriva do latim *aspergillum* e inclui, aproximadamente, 180 espécies. Ao longo do tempo, esse gênero tem sido um dos mais estudados e está entre os de maior importância para o ecossistema e a economia. Isso se deve ao seu grande potencial biotecnológico na produção de enzimas, ácidos orgânicos e metabólitos secundários de importância biotecnológica (Pitt e Hocking, 1999; Bennett, 2010).

O gênero *Aspergillus* é caracterizado, em termos gerais, pela formação de conidióforos com estipes largas e um vértice denominado vesícula (Figura 2.12). No geral, as estipes não são septadas e formam, junto com a vesícula, uma única e grande estrutura. As vesículas suportam estruturas denominadas fiálides, de onde emergem conídios ou esporos, de paredes finas e lisas ou finamente rugosas e forma esférica (Pitt e Hocking, 1999).

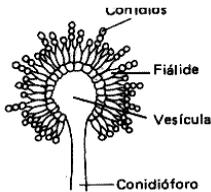
Algumas espécies desse gênero são contaminantes de alimentos e causadoras de infecções humanas, além de produtoras de toxinas ameaçadoras da saúde humana e animal (Bennett, 2010). Há poucos tipos de alimentos, *commodities* e matérias-primas a partir das quais espécies de *Aspergillus* não podem ser isoladas de forma consistente (Pitt e Hocking, 1999).

A espécie *Aspergillus flavus* tornou-se o fungo mais amplamente presente em alimentos, refletindo sua importância econômica. Além de castanhas e sementes oleaginosas, carnes e queijos, peixes, frutas frescas e vegetais, diversos cereais e produtos de cereais também são uma fonte comum de *A. flavus*, dentre elas o trigo, a farinha e o farelo de trigo e os produtos a base de farinha, incluindo pães e massas (Pitt e Hocking, 1999).

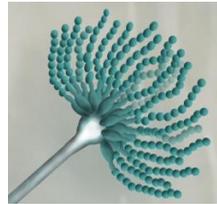
A espécie *A. flavus* (Figura 2.13) se desenvolve em temperaturas mínimas entre 10 e 12 °C e máximas entre 43 e 48 °C, com temperatura ótima de crescimento próxima a 33 °C. Suas colônias são planas, com aspecto aveludado em áreas marginais e flocoso no centro; micélio branco; conídios espalhados uniformemente sobre toda a colônia, com cores variando de verde acinzentado a amarelo oliva (Figura 2.14) (Pitt e Hocking, 1999).

Além de contaminante de grãos e alimentos como pães e batatas (Figura 2.15), o *A. flavus* é o principal produtor de aflatoxina B<sub>1</sub>, a micotoxina mais importante na área de alimentos no mundo. Além da aflatoxina B<sub>1</sub>, carcinogênica e altamente tóxica, algumas cepas de *A. flavus* também produzem a micotoxina ácido ciclopiazônico (CPA) (Espinel-Ingroff *et al.*, 2005, Bennett, 2010).

**Figura 2.12:** Estrutura morfológica do fungo *Aspergillus*.

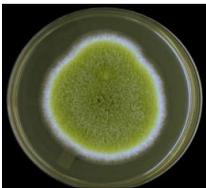


**Figura 2.13:** Foto ilustrativa do fungo *A. flavus*.



(Fonte: <http://www.bemposta.net>) (Fonte: ICB/UFMG - Net Micro)

**Figura 2.14:** Colônia de *A. flavus* em meio SDA (Agar Dextrose Sabouraud).



(Fonte: [www.thunderhouse-4yuri.blogspot.com.br](http://www.thunderhouse-4yuri.blogspot.com.br))

**Figura 2.15:** Pão de forma contaminado com *A. flavus*.



(Fonte: <http://www.tehнологijah-rane.com>)

### 2.6.1.2 O gênero *Penicillium*

Comparado ao gênero *Aspergillus*, o gênero *Penicillium* é mais diverso, em termos de números de espécies e variedade de *habitats*. A maioria das espécies de *Penicillium* é considerada onipresente e saprófita oportunista. São capazes de crescer em quase todos os ambientes e numa vasta gama de condições físico-químicas, como  $a_w$ , temperatura e pH (Pitt e Hocking, 1999).

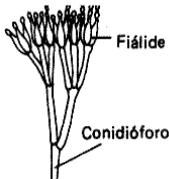
Sua estrutura reprodutiva característica é um conidióforo, também chamado *penicillus* (Figura 2.16). Daí deriva o nome do gênero, do latim *penicillus*, ou pincel, em referência aos conidióforos ramificados, ausentes no gênero *Aspergillus* (Carlile, Watkinson e Gooday, 2001).

O gênero *Penicillium* tem grande importância na contaminação de alimentos. Produtos com alta  $a_w$ , como pães e bolos, são facilmente e rapidamente deteriorados por microrganismos do gênero *Penicillium* (Pitt e Hocking, 1999). As espécies mais comuns em pães de trigo são o *Penicillium commune* (Figura 2.19), *Penicillium solitum* e *Penicillium corylophilum* (Nielsen e Rios, 2000). Pães de centeio também são suscetíveis à deterioração por espécies de *Penicillium*, particularmente *Penicillium roqueforti*, *P. commune* e espécies afins. Conservantes como o sorbato e o propionato são adicionados a estes produtos com o objetivo de estender a sua vida útil, mas o pH em torno de 6,0 faz com que os conservantes sejam largamente ineficazes (Pitt e Hocking, 1999).

A espécie *P. commune* (Figura 2.17) é considerada ancestral do *Penicillium camembertii*, razão pela qual seu *habitat* primário em alimentos é o queijo, do qual é a principal causa de deterioração. Além disso, é uma espécie produtora da micotoxina ácido ciclopiazônico (CPA) (Pitt, Cruickshank e Leistners, 1986).

O *P. commune* cresce em temperaturas de refrigeração, mas sua temperatura ótima de crescimento é em torno de 25 °C e no máximo em torno de 35 °C. Esse microrganismo é capaz de se desenvolver em  $a_w < 0,85$  e suas colônias são caracterizadas por sulcos na direção radial e aspecto aveludado; micélio branco; produção moderada de conídios, de cor variando do turquesa acinzentado a verde; conidióforo único ou em fascículos; conídios esféricos, de paredes lisas, distribuídos em cadeias desordenadas (Figura 2.18) (Pitt e Hocking, 1999; Taniwaki e Silva, 2001).

**Figura 2.16:** Estrutura morfológica do fungo *Penicillium*.



(Fonte: [viseufunghi.blogspot.com.br](http://viseufunghi.blogspot.com.br))

**Figura 2.17:** Foto ilustrativa do fungo *P. commune*.



(Fonte: <http://biostrov.ru>)

**Figura 2.18:** Colônia de *P. commune* em meio YGC (agar extrato levedura glicose cloranfenicol).



(Fonte: <http://www.livne.co.il>)

**Figura 2.19:** Pão contaminado com *P. commune*.



(Fonte: <https://www.infograph.venngage.com>)

## 2.6.2 Sistema complementar de conservação para pães

O sistema tradicional de conservação de pães faz uso de conservantes sintéticos, como os sorbatos e propionatos. No entanto, a tecnologia utilizada pela indústria para aumentar a vida útil de alimentos tem gerado questionamentos quanto à segurança do emprego de aditivos. Sob o ponto de vista tecnológico, é inegável a importância dessas substâncias na produção em larga escala. No entanto, a ingestão diária de aditivos sintéticos pode acarretar riscos toxicológicos e efeitos deletérios importantes. Diversos estudos apontam reações adversas aos aditivos, agudas ou crônicas, tais como as reações tóxicas desencadeantes de alergias, alterações no comportamento (transtorno do

déficit de atenção e hiperatividade) e, a longo prazo, carcinogenicidade (Polônio e Peres, 2009).

Segundo a ANVISA (1997), o uso dos aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, dependendo da necessidade tecnológica, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado, para que a ingestão do aditivo por um indivíduo qualquer não supere os valores de ingestão diária aceitável (IDA) estabelecidos. Dessa forma, o interesse pela preservação natural de alimentos é estimulado pelas exigências dos consumidores para a remoção parcial ou completa dos conservantes sintéticos normalmente adicionados aos alimentos. Essa prática tem impulsionado a criação de políticas 'verdes' pelas indústrias de alimentos (Zavala *et al.*, 2008).

Produtos da extração vegetal, como óleos essenciais, com propriedades naturais antifúngicas, representam uma fonte alternativa aos aditivos sintéticos (Belletti *et al.*, 2004). Associados aos polímeros, para a produção embalagens ativas, essas alternativas têm se transformado em uma necessidade, resultante das novas tendências de consumo (Fisher e Philips, 2008). Filmes ativos antimicrobianos constituem um sistema complementar de conservação de pães, produzidos com o objetivo de reduzir o uso de aditivos sintéticos nesses produtos e, ao mesmo tempo, contribuir para a extensão da vida útil dessa categoria de alimento.

O projeto de uma embalagem antimicrobiana para pães deve levar em consideração a liberação gradual de compostos ativos e as cinéticas de crescimento microbiano. Quando a taxa de transferência de um agente antimicrobiano para a superfície do alimento é maior do que a necessária, o antimicrobiano é diluído a uma concentração menor do que a concentração crítica efetiva ou concentração mínima inibitória (MIC) (Han, 2005). Por outro lado, quando o agente antimicrobiano é microencapsulado previamente à incorporação ao polímero, a liberação gradual dos compostos ativos amplia a ação da embalagem ativa durante a vida útil do produto, ampliando também o espectro de aplicação dessa tecnologia (Gouin, 2004).

O microencapsulamento de agentes voláteis, como óleos essenciais, é uma alternativa de controle da volatilidade dos compostos. A taxa de liberação do ativo a partir da embalagem é altamente dependente da volatilidade dos compostos e da interação química entre o agente volátil e o material de embalagem (Han, 2005). Alguns pesquisadores afirmam que é necessário um contato intenso do filme antimicrobiano com a superfície do alimento para facilitar a migração do

ativo. No entanto, em se tratando de agentes antimicrobianos voláteis, isto não é necessário (Han, 2005). O tipo e a geometria da cápsula e a natureza do material encapsulante determinam os mecanismos de liberação do núcleo, seja pelo efeito de dissolução, por difusão, degradação ou fratura das partículas (Ré, 1998).

Normalmente, os mecanismos de liberação associados às microcápsulas produzidas por *spray drying* são o de dissolução e difusão. A liberação por dissolução é baseada na solubilização da parede da cápsula. A taxa de liberação pode ser controlada pela regulação da solubilidade do material de parede, pH ou alteração da força iônica do meio. A liberação por difusão depende das possíveis interações entre o núcleo e o material de parede e a taxa na qual o material de núcleo é capaz de migrar para fora da cápsula. As características da parede das microcápsulas, como estrutura química, espessura, porosidade e integridade da superfície são fatores determinantes na taxa de difusão do núcleo (Ré, 1998).

Uma vez liberados, a taxa de absorção dos voláteis pela superfície do alimento depende da sua composição e da maneira como os ingredientes estabelecem interações químicas com os agentes gasosos. Além disso, as condições de armazenamento (tempo-temperatura-umidade relativa) também afetam os perfis de distribuição de agentes antimicrobianos, do crescimento microbiano e a cinética das reações químicas (Han, 2005).

A utilização de filmes antimicrobianos incorporados com agentes naturais (óleos essenciais) na forma microencapsulada é uma alternativa complementar importante de conservação de alimentos de alta  $a_w$ , como os pães. Dessa forma, é possível manter a concentração mínima inibitória de ativos antimicrobianos por mais tempo e estender a vida útil desses alimentos, conhecidamente muito perecíveis.

## 2.7 Estado da arte

A revisão bibliográfica apresentada nesta tese destaca a produção de filmes ativos antimicrobianos para aplicação como sistema complementar de conservação de pães de forma. Os filmes ativos foram produzidos à base de amido de mandioca e microfibras de celulose, incorporados de microcápsulas contendo um óleo essencial com propriedades biológicas importantes. A proposta visou a criação de possibilidades de redução e/ou eliminação do uso de aditivos sintéticos na produção e conservação de pães.

O estado da arte foi redigido levando-se em consideração os estudos sobre a produção e aplicação de filmes ativos antimicrobianos na conservação de alimentos. A Tabela 2.1 apresenta estudos sobre filmes elaborados com diferentes compostos-base, incorporados de óleos essenciais com propriedades antimicrobianas e aplicados a diferentes categorias de alimentos. NÃO foram considerados:

- ✓ Estudos que utilizaram outro tipo de antimicrobiano, que não óleos essenciais;
- ✓ Estudos que utilizaram óleos essenciais no seu estado puro, adicionado diretamente ao alimento, e não incorporado em um filme;
- ✓ Estudos que não avaliaram a aplicação do filme ativo antimicrobiano na conservação de alimentos.

**Tabela 2.1:** Estudos sobre a aplicação de filmes ativos antimicrobianos em alimentos.

Filme	Óleo essencial	Aplicação	Resultados mais relevantes	Referências
Celulose	Orégano	Pizza pronta refrigerada	Efeito inibitório <i>in vitro</i> de <i>Penicillium</i> spp. e <i>S.aureus</i> .	Botre <i>et al.</i> , 2010.
Caseinato de cálcio, isolado proteico de soro e CMC	Orégano	Carne bovina	Efeito inibitório contra <i>E. coli</i> O157:H7 e <i>Pseudomonas</i> spp.	Oussallah <i>et al.</i> , 2004.
Gelatina e quitosana	Cravo	Peixe	Redução do crescimento de bactérias gram-negativas (enterobactérias);	Gómez-Estaca <i>et al.</i> , 2010.

Polietileno de baixa densidade (LDPE)	Manjerição	Queijo <i>cheddar</i>	Efeito inibidor do crescimento microbiano no queijo naturalmente contaminado e nas amostras inoculadas.	Suppakul <i>et al.</i> , 2008.
Celulose	Alecrim	Peito de frango	Controle do crescimento microbiano com filmes com 50% (v/p) de óleo essencial.	Melo, 2010.
Quitosana	Orégano	Carne processada ( <i>Bologna</i> )	Diminui�o da contagem de <i>L. monocytogenes</i> e <i>E. coli</i> .	Zivanovic, Chi e Draughon, 2005.
Quitosana	Tomilho	Produtos cárneos prontos para consumo	Redu�o da popula�o de levedura; Bactérias aeróbias mesofilicas, ácido-l�ticas e enterobactérias não foram afetadas.	Quesada <i>et al.</i> , 2016.
�cido poliláctico/ Celulose	Orégano	Mix de vegetais	Inibi�o quase total de bactérias.	Salmieri <i>et al.</i> , 2014.

Proteína de soro de leite	Orégano	Carne bovina	Redução da taxa máxima de crescimento específico ( $\mu_{max}$ ) da flora total e <i>Pseudomonas</i> . Inibição completa do crescimento de bactérias ácido-lácticas.	Zinoviadou, Koutsoumanis e Biliaderis, 2009.
Isolado proteico de soro + alginato	Gengibre	Queijo <i>Kashar</i>	Redução dos níveis de <i>Escherichia coli</i> O157: H7 e <i>Staphylococcus aureus</i> .	Kavas, Kavas e Saygili, 2015.

Botre *et al.* (2010) utilizaram um filme de base celulósica incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta refrigerada. O óleo foi incorporado ao filme nas concentrações de 25 e 50 % p/p, muito superiores às concentrações propostas para o presente estudo. Zivanovic, Chi e Draughon (2005) adicionaram óleo de orégano em filmes de quitosana em concentrações de 1 % e 2 % (mais próximas às propostas para este estudo), suficientes para reduzir o número de *L. monocytogenes* e *E. coli*. Zinoviadou, Koutsoumanis e Biliaderis (2009) elaboraram filmes antimicrobianos incorporando diferentes concentrações de óleo de orégano (0,5 %, 1,0 % e 1,5 % p/p) em películas de proteína de soro de leite isolada. A taxa de crescimento específico máximo ( $\mu_{max}$ ) da flora total e pseudomonas foi significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ) e o crescimento de bactérias lácticas foi completamente inibido com o uso de filmes antimicrobianos na concentração de 1,5 % (p/p) de óleo. Estes resultados demonstram a eficácia do óleo de orégano na conservação de alimentos de diferentes categorias.

No presente estudo, o óleo essencial foi utilizado na forma microencapsulada. A produção de micropartículas contendo um composto ativo com propriedades biológicas potenciais é um tema que tem despertado o interesse das indústrias de alimentos, farmacêutica,

cosmética, dentre outras. A possibilidade de incorporação desses compostos microencapsulados em polímeros amplia o espectro de aplicação de substâncias com sensibilidade térmica e/ou de baixa estabilidade, como os óleos essenciais. Essa prática também cria possibilidades de complemento e/ou substituição futura de sistemas de conservação de alimentos que ainda fazem uso de aditivos exclusivamente sintéticos.

Gómez-Estaca *et al.* (2010) elaboraram uma película de quitosana adicionada de óleo essencial de cravo e aplicada na conservação de peixes. O crescimento de bactérias gram-negativas foi drasticamente reduzido, enquanto as bactérias ácido-lácticas permaneceram praticamente constantes durante grande parte do armazenamento. Quesada *et al.* (2016) elaboraram um filme ativo à base de quitosana e óleo essencial de tomilho (0 %, 0,5 %, 1 % e 2 %). Os filmes reduziram a população de leveduras, enquanto as bactérias mesófilas aeróbias, bactérias lácticas e enterobactérias não foram afetadas pela presença do óleo essencial nos filmes. Segundo os autores, estudos adicionais a fim de melhorar as propriedades antimicrobianas da película devem ser realizados.

A Tabela 2.1 demonstra que a aplicação de filmes ativos antimicrobianos na conservação de alimentos se concentra, essencialmente, entre os derivados cárneos e lácteos. O pão é, atualmente, um alimento muito consumido e de valor agregado significativo, apesar da vida útil reduzida. A elaboração de filmes antimicrobianos incorporados com óleo essencial microencapsulado representa uma oportunidade importante de desenvolvimento de um sistema de complemento e/ou substituição dos sistemas atuais de conservação de pães, justificando o objetivo geral desse estudo.

## CAPÍTULO 3

### **AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) E HORTELÃ (*Mentha arvensis*) PARA APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**

#### **3.1 Introdução**

Do ponto de vista tecnológico, os aditivos sintéticos comumente utilizados na conservação de alimentos são elementos importantes na produção em larga escala. No entanto, a ingestão diária desses compostos pode acarretar riscos toxicológicos importantes (Polônio e Peres, 2009). Daí o interesse pela preservação natural de alimentos, estimulado por consumidores que buscam a remoção parcial ou completa de conservantes sintéticos utilizados nesses processos (Zavala *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais representam uma fonte alternativa aos aditivos sintéticos (Belletti *et al.*, 2004). Óleos essenciais são compostos naturais voláteis, resultantes do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Extraídos de matrizes vegetais, esses compostos são considerados potenciais inibidores do desenvolvimento de agentes contaminantes e patogênicos em alimentos. Muitos estudos comprovam que óleos essenciais, extratos, oleorresinas e seus principais componentes apresentam elevada atividade antimicrobiana (Burt, 2004; Cavaleiro *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008). Os níveis de ação antimicrobiana variam conforme a espécie vegetal, as condições de cultivo e a forma de extração do óleo (Knaak e Fiuza, 2010).

Dentre as várias plantas aromáticas com reconhecidas atividades antimicrobianas, destacam-se as da família *Lamiaceae*, como o orégano (*Origanum vulgare*) e a hortelã (*Mentha arvensis*). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano é devida à grande quantidade de compostos fenólicos presentes na sua composição, especialmente monoterpenos e sesquiterpenos (Cleff *et al.*, 2010; Lambert, Skandamis e Coote, 2001). O óleo essencial de hortelã apresenta atividades antimicrobiana e antioxidante potenciais, normalmente atribuídas aos componentes químicos mentol, mentona, cânfora e linalol, dentre outros (Pandey, Rai e Acharya, 2003).

Apesar do aumento no consumo de produtos naturais, com base no argumento de que plantas e seus derivados são totalmente seguros, o uso destes produtos deve estar assegurado por estudos toxicológicos. No geral, óleos essenciais são bastante concentrados e podem apresentar certa toxicidade, por vezes mais elevada do que a da planta de origem (Simões e Spitzer, 2003; Veiga Jr., Pinto e Maciel, 2005).

O aumento do consumismo 'verde' promoveu a renovação do interesse científico nessas substâncias e estimulou o seu uso em processos de conservação (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Zavala *et al.*, 2008). A busca por antimicrobianos naturais, especialmente antifúngicos, é resultado do reconhecimento da importância das infecções fúngicas, das dificuldades no seu tratamento, do desenvolvimento da resistência aos antifúngicos, das interações significativas e da biodisponibilidade insuficiente dos antifúngicos convencionais (Cavaleiro *et al.*, 2006).

Algumas espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são consideradas agentes contaminantes ou patogênicos comuns em alimentos. Na indústria, algumas espécies de *Aspergillus* são utilizadas na produção de enzimas e ácidos orgânicos e na fermentação de alimentos. No entanto, são frequentemente associadas à contaminação de alimentos e produção de metabólitos secundários toxigênicos (Scheidegger e Payne, 2003). A espécie *Aspergillus flavus* produz uma micotoxina carcinogênica e altamente tóxica, a aflatoxina B1 (Espinell-Ingroff *et al.*, 2005). Algumas espécies do gênero *Penicillium* podem ser utilizadas no controle biológico e micoparasitismo, no desenvolvimento de novas drogas para a indústria farmacêutica e como fontes de enzimas de interesse industrial. No entanto, esses microrganismos estão entre as principais causas de deterioração de alimentos. Além disso, algumas espécies deste gênero também produzem micotoxinas, como a espécie *Penicillium commune*, produtora do ácido ciclopiazônico (CPA) (Pitt, Cruickshank e Leistners, 1986).

Diante do exposto, os objetivos deste capítulo foram a caracterização química e a avaliação da citotoxicidade, potencial antioxidante e propriedades antifúngicas dos óleos essenciais de orégano e hortelã contra os fungos *A. flavus* e *P. commune*, para fins de aplicação como conservantes de alimentos.

## 3.2. Materiais e Métodos

### 3.2.1 Matéria-prima:

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e hortelã (*Mentha arvensis*) foram adquiridos da empresa Ferquima – SP. Segundo as informações do laudo, o óleo de orégano é originário da República da Moldávia, país da Europa Oriental, enquanto o óleo de hortelã provém da China. Ambos foram extraídos pelo processo de destilação a vapor das folhas das plantas.

### 3.2.2 Composição química:

A composição química dos óleos essenciais foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC). As análises foram realizadas no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB), na Universidade Regional de Blumenau (FURB) (SC).

A análise de CG-EM foi realizada em cromatógrafo GC-MS (QP2010 Plus Shimadzu), equipado com uma coluna capilar RTx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás Hélio (He) foi utilizado como gás de arraste, sob fluxo constante de 1 mL/min. A coluna foi aquecida a 60 °C por 5 min, elevada a 240 °C a uma taxa de aquecimento de 3 °C/min e mantida nessa temperatura por 5 min. As amostras foram diluídas em éter etílico e injetadas (1 µL) a 250 °C. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação do espectro de massa com o banco de dados da Espectroteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*) (2008).

A análise de CG-DIC foi realizada em cromatógrafo GC-FID 2010 Shimadzu, equipado com uma coluna capilar OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), nas mesmas condições da análise de CG-EM. A composição dos óleos foi determinada pelo método de normalização de áreas.

### 3.2.3 Citotoxicidade

A citotoxicidade dos óleos essenciais de orégano e hortelã foi avaliada mediante ensaios de viabilidade de células não tumorais humanas (células epiteliais - melanócitos NGM) e murinas (células do

tecido conjuntivo - fibroblastos NIH3T3). As células foram selecionadas conforme a disponibilidade do banco de células e os objetivos do estudo. A utilização de células epiteliais e do tecido conjuntivo teve como objetivo a avaliação da toxicidade dos óleos quando administrados por via tópica ou oral, respectivamente. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### **3.2.3.1 Cultivo celular**

Células não tumorais de fibroblasto murino (NIH3T3) foram cultivadas em garrafas (frascos de Roux) contendo Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (pH 7,4), acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10 % (v/v), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de HEPES (ácido 2- [4- (2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanossulfônico).

As células de melanócito humano (NGM) foram cultivadas em meio DMEM/Nutriente HAM F12 (1:1), suplementada com SFB 20 % (v/v), 1,4 µM de hidrocortisona, 1 nM de Triiodotreonina, 10 µg/mL de insulina, 10 µg/mL de transferrina, 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de HEPES.

As garrafas foram incubadas em estufa umidificada (Shel Lab SL CO<sub>2</sub> - USA) a 37 °C e 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Os estoques celulares foram mantidos em DMEM com 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO), a -180 °C, aproximadamente, em reservatório de nitrogênio líquido.

### **3.2.3.2 Ensaios de viabilidade celular**

A citotoxicidade dos óleos de orégano e hortelã foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), um sal de tetrazólio reduzido por células metabolicamente ativas (Mosmann, 1983). O MTT é reduzido pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial à sua forma insolúvel (formazan) após exposição a um composto e dá informações acerca da toxicidade desse composto (Eisenbrand *et al.*, 2002).

Células NGM e NIH3T3 pré-cultivadas foram transferidas para microplacas de 96 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço), juntamente com as

amostras dos óleos, previamente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). As concentrações testadas variaram de 0,1 a 200 µg/mL. As microplacas foram incubadas em estufa umidificada (Shel Lab SL CO<sub>2</sub> - USA), a 37 °C, por 24, 48 e 72 horas. Ao final dos períodos de incubação, o sobrenadante foi removido e substituído pela solução de MTT (5 mg/mL). As placas foram novamente incubadas a 37 °C por 2 horas. O sobrenadante foi substituído por DMSO para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância das amostras foi medida em Leitor de Microplacas (Biotek EL 800 - USA), em comprimento de onda de 540 nm. A concentração do composto que causa 50 % de morte celular (IC<sub>50</sub>) foi calculada com auxílio do programa *GraphPad Prism 5* (La Jolla, CA, EUA).

### 3.2.4 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos de orégano e hortelã foi determinada mediante análises da concentração mínima inibitória (MIC) e dose mínima inibitória (MID), representadas, respectivamente, pelos componentes em solução e pelos componentes voláteis dos óleos.

#### 3.2.4.1 Preparo do Inóculo

Culturas puras e ativas de *A. flavus* (CCT 7540) e *P. commune* (CCT 7683) foram adquiridas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (Campinas - SP). Os microrganismos foram selecionados com base na literatura e segundo os objetivos do presente estudo. A repicagem das cepas foi realizada em tubos de ensaio contendo meio de cultura Agar Batata Dextrose (*Potato Dextrose Agar - PDA*) (Difco<sup>TM</sup> - USA) sólido inclinado. Os tubos inoculados foram incubados em estufa de cultivo a 30 °C por 5 dias.

Para o preparo do inóculo padrão, os tubos foram adicionados de água destilada estéril e agitados. A medida da absorbância da suspensão foi realizada em espectrofotômetro (Bel Photonics SP 1105 – SP), a 530 nm, e ajustada para valores de referência, segundo a Norma M38-A (NCCLS, 2002). O tamanho do inóculo padrão (UFC/mL) foi medido em câmara de Neubauer e confirmado por plaqueamento por profundidade. A suspensão ajustada foi adicionada de 10 % de glicerol (crioprotetor), porcionada, congelada e armazenada em Ultrafreezer (Nuair – Glacier -86 °C Ultralow Temperature Freezer - USA), a - 80 °C, até o uso.

A viabilidade do inóculo criopreservado foi avaliada a cada repetição do experimento, por meio de análise de contagem microbiana. Para isso, o inóculo padrão foi diluído em água peptonada estéril 0,1 %. O plaqueamento em profundidade foi realizado utilizando-se meio de cultura PDA estéril, acrescido de 0,1 % de solução corante Rosa de Bengala 5 % (p/v). As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C em Câmara Incubadora BOD (TE 391-1 Tecnal - SP) por 96 horas, seguidas da contagem do número de colônias (UFC/mL).

#### **3.2.4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (Minimal Inhibitory Concentration - MIC)**

A concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais de orégano e hortelã foi determinada pelos componentes em solução, através do método de microdiluição em caldo, baseado na Norma M38-A (NCCLS, 2002), com modificações. Às microplacas de 96 poços foram adicionados 200 µL de Caldo Batata Dextrose (*Potato Dextrose Broth* - PDB) (Difco™ - USA), 2 µL de amostra (diluições dos óleos em DMSO) e 5 µL de inóculo de *A. flavus* ou *P. commune* ( $10^4$  UFC/poço, aproximadamente). As concentrações testadas variaram de 0,1 µg/mL a 4,0 mg/mL para o óleo de orégano e 0,1 µg/mL a 8,0 mg/mL para o óleo de hortelã.

As microplacas contendo o branco (caldo), o controle de DMSO, os controles positivos e negativos e as amostras foram incubadas a 28 °C em câmara incubadora BOD (TE-371 Tecnal - SP), por 24 horas. A leitura da absorbância foi realizada em Leitor de Placas (Biotek EL 800 - USA), em comprimento de onda de 660 nm.

A MIC foi considerada a menor concentração capaz de inibir 100 % do crescimento dos microrganismos. A concentração mínima capaz de inibir 50 % (IC<sub>50</sub>), 70 % (IC<sub>70</sub>) e 90 % (IC<sub>90</sub>) do crescimento foi determinada com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5* (La Jolla, CA, EUA).

#### **3.2.4.3 Determinação da Dose Mínima Inibitória (Minimal Inhibitory Dose - MID)**

O poder de inibição do crescimento microbiano pelos componentes voláteis dos óleos essenciais é expresso pela dose mínima inibitória (MID) (Inouye, Takiwaza e Yamaguchi, 2001). A MID dos óleos essenciais de orégano e hortelã foi determinada pelo teste de

volatilização em disco (López *et al.*, 2005). A MID foi considerada a concentração em  $\mu\text{L}$  óleo/L *headspace* capaz de inibir visível e completamente o crescimento dos microrganismos. O volume do *headspace* foi calculado levando-se em consideração as dimensões da placa e o volume/altura do agar adicionado à placa.

As amostras foram preparadas pela diluição dos óleos essenciais em acetato de etila. O meio de cultivo PDA estéril foi acrescido de 0,1 % de solução corante Rosa de Bengala 5 % (p/v) e adicionado às placas de Petri (90 mm) estéreis. Após a solidificação do meio, a superfície do ágar foi inoculada com 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de *A. flavus* e *P. commune* ( $10^6$  UFC/mL, aproximadamente), espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Discos de papel de filtro (Macherey Nagel MN-619de - USA) de 90 mm de diâmetro foram impregnados com 650  $\mu\text{L}$  das amostras e afixados nas tampas das placas de Petri inoculadas. As placas foram seladas com filme de vedação (Parafilm M - WI, USA) e incubadas em câmara incubadora BOD (TE 391-1 Tecnal - SP) a 30 °C, por 96 horas.

Além da determinação da MID, foram avaliados os efeitos temporário/prolongado e fungistático/fungicida dos compostos voláteis dos óleos. Para avaliação do efeito temporário/prolongado, as placas foram mantidas com a atmosfera inalterada durante a incubação. Para avaliação do efeito fungicida/fungistático, a atmosfera das placas foi alterada por meio da retirada dos papéis de filtro. Em caso de crescimento de microrganismos após a remoção dos filtros, o efeito é considerado estático. A ausência de crescimento microbiano (a inibição permanece constante no tempo) indica efeito fungicida. As placas foram avaliadas a cada 7 dias, durante o período máximo de 21 dias.

### **3.2.5 Atividade antioxidante**

A medida da atividade antioxidante de óleos essenciais é uma expressão de uma das propriedades mais importantes desses compostos multipropriedades. A atividade antioxidante dos óleos de orégano e hortelã foi determinada com o objetivo de uma melhor e mais completa caracterização desses compostos.

#### **3.2.5.1 Método DPPH**

A ação antioxidante de uma substância pode ser determinada pela sua capacidade de captar o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-

picrilhidrazil). Na presença de um composto antioxidante, esse radical é reduzido ao seu derivado hidrazina. A atividade antioxidante dos óleos essenciais de orégano e hortelã foi avaliada pelo método de DPPH, baseado na metodologia de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). O método tradicional foi adaptado para microplacas de 96 poços.

Os óleos de orégano e hortelã foram diluídos em etanol, em concentrações variando de 0,05 a 10 mg/mL para o óleo de orégano e 5 a 500 mg/mL para o óleo de hortelã. A solução de DPPH foi preparada pela dissolução do composto 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Sigma-Aldrich – USA) em etanol, na concentração de 85 µg/mL. Aos poços das microplacas foram adicionados 165 µL de amostra e 45 µL de solução de DPPH, além do branco e controle. As microplacas foram mantidas em temperatura ambiente e na ausência de luz durante toda a reação. As leituras das absorbâncias foram realizadas em Multileitora (Infinite M200 TECAN - Suíça), a 517 nm, após 30, 180 e 360 minutos de reação.

A atividade antioxidante dos compostos (% AA) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AA} = \frac{\text{Abs}_{\text{Cr}} - \text{Abs}_{\text{Am}}}{\text{Abs}_{\text{Cr}}} \times 100 \quad \text{Equação. 3.1}$$

na qual  $\text{Abs}_{\text{Am}}$  é a absorbância da amostra e  $\text{Abs}_{\text{Cr}}$  é a absorbância do controle.

Os valores de  $\text{IC}_{50}$ , definido como a quantidade de óleo essencial necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH a 50 %, foram calculados com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5* (La Jolla, CA, EUA).

### 3.2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey de comparação de médias, com nível de confiança de 95 %, em *software Estatística 8* (Statsoft, Inc., USA).

### 3.3. Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Composição química:

Os resultados de composição química dos óleos essenciais de orégano e hortelã, determinada pelas análises de CG-EM e CG-DIC, estão apresentados nas Tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente.

**Tabela 3.1:** Composição do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), tempos de retenção (min) e concentração relativa (%).

Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração relativa (%) CG-EM	Concentração relativa (%) CG-DIC
$\alpha$ -tujeno	6,67	0,40	0,19
$\alpha$ -pineno	6,93	0,69	0,33
canfeno	7,49	0,33	0,17
$\beta$ -pineno	8,62	1,73	1,00
mirreno	9,25	0,70	0,42
$\alpha$ -felandreno	9,81	0,38	0,14
$\alpha$ -terpineno	10,36	1,28	0,47
o-cimeno	10,73	5,55	3,82
limoneno	10,91	1,75	0,78
1,8 cineol	11,01	1,84	0,85
$\gamma$ -terpineno	12,33	5,25	3,60
linalol	14,31	3,21	1,93
cânfora	16,34	1,53	0,38
borneol	17,40	2,13	0,88
4-terpineol	17,96	1,68	0,67
$\alpha$ -terpineol	18,63	0,51	0,15
timol	23,50	5,66	2,32
carvacrol	24,22	53,76	76,10
$\beta$ -cariofileno	28,83	6,32	3,83
$\beta$ -bisaboleno	32,53	0,24	0,10
óxido de cariofileno	35,43	0,85	0,35

**Tabela 3.2:** Composição do óleo essencial de hortelã (*Mentha arvensis*), tempos de retenção (min) e concentração relativa (%).

Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração relativa (%) CG-EM	Concentração relativa (%) CG-DIC
$\alpha$ -pineno	6,93	2,67	1,85
sabineno	8,49	0,73	0,36
$\beta$ -pineno	8,62	2,38	1,63
3-octanol	9,47	0,82	0,44
limoneno	10,93	4,98	4,25
isopulegol	16,48	3,46	5,33
mentona	16,98	18,18	18,56
isomentona	17,45	15,47	16,25
mentol	18,09	35,15	44,65
isomentol	18,36	2,03	0,53
$\alpha$ -terpineol	18,67	0,97	0,06
pulegona	20,89	2,46	1,54
acetato de mentila	23,43	5,59	3,44
$\alpha$ -ylangeno	26,75	0,58	0,19
$\alpha$ -copaeno	27,03	1,24	0,10

As análises de CG-DIC e CG-EM do óleo de orégano (Tabela 3.1) permitiram a identificação e quantificação de mais de 20 compostos, totalizando 98,5 % e 94,9 %, respectivamente. Apesar das diferenças nas concentrações relativas, ambas as análises detectaram o carvacrol como composto majoritário. O carvacrol é um monoterpene fenólico, com estrutura caracterizada por um grupo hidroxila ligado a um anel fenólico. A estrutura química dos componentes individuais dos óleos essenciais afeta o seu modo de ação (Dorman e Deans, 2000). A atividade antimicrobiana do óleo de orégano está relacionada ao modo de ação do carvacrol, principalmente, que provoca efeitos prejudiciais à membrana celular microbiana, como alterações na sua permeabilidade (Lambert, Skandamis e Coote, 2001).

As análises de CG-DIC e CG-EM do óleo essencial de hortelã (Tabela 3.2) permitiram a identificação e quantificação de 15

compostos, totalizando 99,2 % e 96,7 %, respectivamente. O composto majoritário, mentol, é um álcool terpênico cíclico de alta volatilidade, parcialmente solúvel em água (Soottitawat *et al.*, 2005). Amplamente utilizado em indústrias alimentícias e farmacêuticas, o mentol é considerado o principal composto antifúngico das espécies de hortelã (Pandey, Rai e Acharya, 2003). A mentona existe na forma dos isômeros mentona e isomentona, o segundo e terceiro compostos majoritários, respectivamente. A mentona é um composto monoterpênico cetônico. O óleo essencial de *Mentha arvensis*, reconhecido pelas propriedades antibacteriana, antiviral e antifúngica, tem suas atividades associadas aos compostos majoritários mentol, mentona e isomentona, principalmente (Singh, Shushni e Belkheir, 2011).

No geral, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (Bakkali *et al.*, 2008). No entanto, pesquisas têm sugerido que componentes minoritários também podem exercer papel importante nessas atividades. Assim, os efeitos antagônicos ou sinérgicos também devem ser considerados (Lambert Skandamis e Coote, 2001).

### 3.3.2 Citotoxicidade

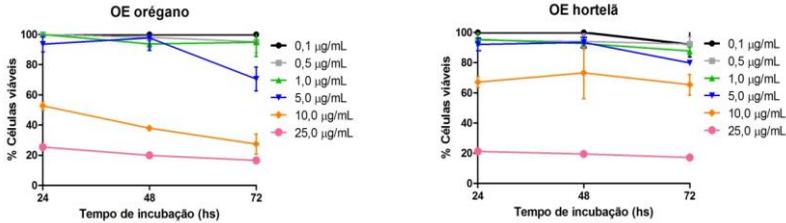
A Figura 3.1 apresenta os gráficos de viabilidade das células NGM e NIH3T3, submetidas ao tratamento com os óleos de orégano e hortelã.

As concentrações avaliadas variaram de 0,1 a 200  $\mu\text{g/mL}$ . Em concentrações acima de 25  $\mu\text{g/mL}$ , no entanto, a taxa de sobrevivência das células NGM foi  $\leq 20\%$ , para ambos os óleos. Para as células NIH3T3, esse índice foi  $< 10\%$ , para ambos os óleos. A análise estatística dos resultados mostrou que o aumento das concentrações das amostras acima de 25  $\mu\text{g/mL}$  não resultou em diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade celular (dados não mostrados).

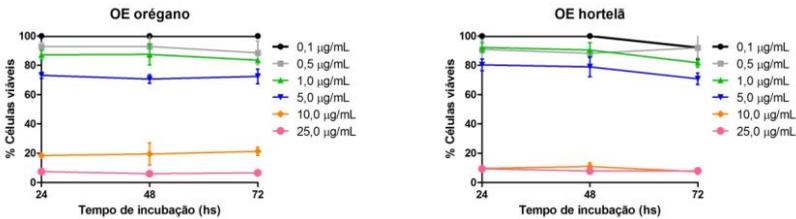
As células humanas (NGM) apresentaram menor resistência aos efeitos do óleo de orégano, em comparação ao óleo de hortelã, em amostras pouco concentradas (10  $\mu\text{g/mL}$ ). As células murinas (NIH3T3), por sua vez, apresentaram menor resistência aos efeitos do óleo de hortelã nessas condições, comparado ao óleo de orégano, nos diferentes períodos de incubação. Os resultados de citotoxicidade estão intimamente relacionados ao método de análise, composição do óleo e qualidade das células selecionadas para o estudo.

**Figura 3.1:** Efeito do aumento das concentrações dos óleos essenciais (OE) de orégano e hortelã e períodos de incubação (h) sobre a viabilidade das células NGM (a) e NIH3T3 (b).

(a) NGM



(b) NIH3T3



Esse fato pode ser demonstrado pelo estudo de Vimalanathan e Hudson (2012), que avaliaram a citotoxicidade do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) em células humanas do pulmão. A viabilidade celular (%) resultante foi maior do que a encontrada no presente estudo, que utilizou um óleo da mesma espécie, porém em células humanas do epitélio (NGM). Hussain *et al* (2010a) e Yamaguchi *et al* (2013) avaliaram, respectivamente, o efeito dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e *Endlicheria citriodora* em células murinas NIH3T3. Os resultados demonstraram menor potencial tóxico para esses óleos, comparado aos óleos utilizados no presente estudo.

Grande parte dos estudos sobre citotoxicidade de óleos essenciais são desenvolvidos com células tumorais, devido à sua propriedade antitumoral. Os resultados dos trabalhos dos autores Grbović *et al.* (2013), Hussain *et al.* (2010b) e Weecharangsan *et al.* (2014), sobre a citotoxicidade dos óleos de orégano e hortelã em células tumorais

humanas, provaram que essas células são mais resistentes aos tratamentos do que células não tumorais.

Segundo esses autores, a atividade citotóxica do óleo de orégano deve-se à elevada concentração de fenóis presentes no óleo, especialmente o carvacrol. Em seu estudo, Vimalanathan e Hudson (2012) encontraram uma alta atividade antiviral para o carvacrol, mas também alta citotoxicidade. Os autores afirmam que óleos essenciais de orégano com menores citotoxicidades apresentam componentes com propriedades de proteção, capazes de neutralizar o efeito tóxico substancial do carvacrol. No óleo de hortelã, o principal composto responsável pela citotoxicidade é o mentol.

A Tabela 3.3 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> dos óleos de orégano e hortelã.

**Tabela 3.3:** Valores de IC<sub>50</sub> dos óleos essenciais de orégano e hortelã para as células NGM e NIH3T3, nos diferentes períodos de incubação (h).

Óleo essencial	Tempo incubação (h)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
		NGM	NIH3T3
orégano	24	16,3 ± 4,2 <sup>a</sup>	7,6 ± 1,7 <sup>a</sup>
	48	16,2 ± 1,8 <sup>a</sup>	9,1 ± 3,8 <sup>a</sup>
	72	17,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	10,4 ± 2,9 <sup>a</sup>
hortelã	24	21,6 ± 4,8 <sup>a</sup>	9,8 ± 3,1 <sup>a</sup>
	48	22,2 ± 3,9 <sup>a</sup>	7,5 ± 2,4 <sup>a</sup>
	72	21,2 ± 6,7 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,6 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

A análise estatística dos resultados demonstrou que o aumento do tempo de incubação não resultou em diferença significativa (p<0,05) nos valores de IC<sub>50</sub>.

Segundo Gad-Shayne (2009), as substâncias são classificadas em mais ou menos tóxicas conforme os valores de IC<sub>50</sub>:

- ✓ IC<sub>50</sub> < 10 µg/mL: substância potencialmente muito tóxica;
- ✓ IC<sub>50</sub> entre 10 e 100 µg/mL: substância potencialmente tóxica;
- ✓ IC<sub>50</sub> entre 100 e 1000 µg/mL: substância potencialmente prejudicial;
- ✓ IC<sub>50</sub> > 1000 µg/mL: substância potencialmente não tóxica.

De acordo com essa classificação, os óleos de orégano e hortelã podem ser considerados compostos potencialmente tóxicos para as células humanas (NGM) e potencialmente muito tóxicos para as células murinas (NIH3T3), nas condições do ensaio.

Alguns autores afirmam que o grau de toxicidade de um extrato depende de vários fatores, dentre eles a dose utilizada e a frequência de administração. O fator dose-dependente dos óleos, associado à sensibilidade dos indivíduos aos diferentes componentes, tornam difícil a definição de um limite de segurança para a utilização desses compostos. Devido a estes e outros fatores, a utilização de produtos derivados de plantas requer estudos prévios relativos a vários aspectos, como o seu efeito tóxico sobre organismos animais (Cleff *et al.*, 2008).

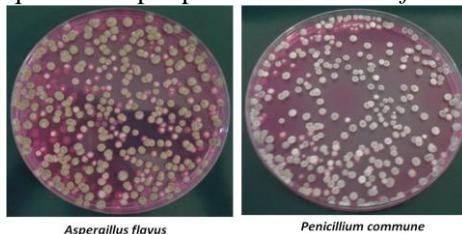
Cleff *et al.* (2008) desenvolveram um estudo *in vivo* da citotoxicidade do óleo essencial de *Origanum vulgare* em ratas Wistar adultas, que consumiram 3 % (v/v) desse óleo via oral e intra-vaginal, pelo período de 30 dias. Os resultados mostraram ausência de efeitos tóxicos durante o período de observação. Nenhum dos animais apresentou alterações clínicas, comportamentais ou morte. A ausência de efeitos colaterais pelo uso do *Origanum vulgare* também foi demonstrada em outros estudos com animais domésticos. A adição de 1000 ppm do óleo essencial na dieta de suínos não resultou em quaisquer alterações negativas, ao contrário, foram observados efeitos positivos na saúde e produção desses animais (Allan & Bilkey, 2005). Segundo os autores, isso se deve, provavelmente, às ações antioxidante, antibacteriana e antiinflamatória do óleo essencial de orégano, dada a presença de fenóis, como o carvacrol e o timol.

A avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos óleos de orégano e hortelã teve como objetivo estabelecer uma referência para o uso desses compostos, cuja finalidade principal é a sua aplicação como agentes antimicrobianos em processos de conservação de alimentos. A grande maioria dos estudos ainda se concentra nas áreas farmacêutica e médica. O objetivo desses estudos é avaliar a capacidade antitumoral de óleos essenciais. Ainda há pouca pesquisa publicada sobre a citotoxicidade de óleos essenciais para fins de aplicação como agentes antimicrobianos comerciais (Laird e Phillips, 2011).

### 3.3.3 Atividade antimicrobiana

A Figura 3.2 apresenta o resultado do plaqueamento dos inóculos de *A. flavus* e *P. commune* criopreservados.

**Figura 3.2:** Plaqueamento por profundidade de *A. flavus* e *P. commune*.



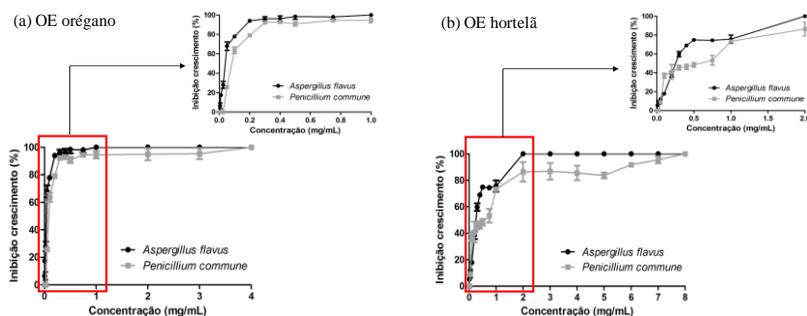
(Fonte: elaborada pelo autor)

Os inóculos foram preparados e avaliados quanto à viabilidade conforme descrito no item 3.2.4.1. O resultado do plaqueamento demonstra que não houve comprometimento da viabilidade fúngica após o congelamento do inóculo.

### 3.3.3.1 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A Figura 3.3 apresenta os resultados de MIC dos óleos de orégano e hortelã. Os gráficos representam o efeito do aumento das concentrações dos óleos essenciais na inibição do crescimento fúngico.

**Figura 3.3:** Inibição do crescimento (%) de *A.flavus* e *P.commune* pelos óleos essenciais (OE) de orégano (a) e hortelã (b).



Considerando a MIC como a menor concentração capaz de inibir 100 % do crescimento microbiano, pode-se afirmar que os valores de MIC do óleo de orégano foram de 1,0 mg/mL para o *A. flavus* e 4,0 mg/mL para o *P. commune*. Para o óleo de hortelã, os valores de

MIC foram de 2,0 mg/mL para o *A. flavus* e 8,0 mg/mL para o *P. commune*. Estes resultados demonstram que, para ambos os óleos, o *P. commune* apresentou-se mais resistente aos efeitos dos óleos do que o *A. flavus*. Esse fato pode ser observado nos gráficos que apresentam, no detalhe, as curvas de inibição do crescimento microbiano.

Os resultados demonstram que, na concentração de 1,0 mg/mL de óleo de orégano, tem-se 100 % da inibição do crescimento do *A. flavus* e 94,5 % de inibição do crescimento do *P. commune*. Na concentração de 2,0 mg/mL de óleo de hortelã, tem-se 100 % da inibição do crescimento do *A. flavus* e 86,4 % de inibição do crescimento do *P. commune*. Os resultados também contribuem para reafirmar o maior poder de inibição do crescimento fúngico do óleo de orégano, comparado ao óleo de hortelã. Numerosos estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana do orégano, seus extratos e óleos essenciais, considerado um potente inibidor do crescimento de fungos e da biossíntese de micotoxinas (Kocic-Tanackov *et al.*, 2012).

A Tabela 3.4 apresenta os valores de IC<sub>50</sub>, IC<sub>70</sub> e IC<sub>90</sub> dos óleos de orégano e hortelã.

**Tabela 3.4:** Valores de ICs (µg/mL) dos óleos essenciais de orégano e hortelã para os microrganismos *A. flavus* e *P. commune*.

<b>OE orégano</b>			
IC (µg/mL)	IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>	IC <sub>90</sub>
<i>A. flavus</i>	35,7 ± 3,8 <sup>a</sup>	77,5 ± 2,6 <sup>a</sup>	235,7 ± 1,9 <sup>a</sup>
<i>P. commune</i>	81,6 ± 2,7 <sup>b</sup>	175,8 ± 2,1 <sup>b</sup>	523,0 ± 2,0 <sup>b</sup>
<b>OE hortelã</b>			
IC (µg/mL)	IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>	IC <sub>90</sub>
<i>A. flavus</i>	261,2 ± 2,8 <sup>a</sup>	535,8 ± 1,2 <sup>a</sup>	1305,3 ± 0,5 <sup>a</sup>
<i>P. commune</i>	399,9 ± 2,7 <sup>b</sup>	972,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	4776,9 ± 3,1 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

Os resultados apresentados na Tabela 3.4 corroboram com os resultados apresentados na Figura 3.3. Estes resultados comprovam a maior resistência do *P. commune* aos efeitos dos óleos de orégano e hortelã, comparado ao *A. flavus*. Os resultados também confirmam o maior poder de inibição do crescimento fúngico do óleo de orégano, comparado ao óleo de hortelã.

Os métodos de diluição utilizados para a determinação da MIC são de uso frequente, mas a expressão dos resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais não segue um padrão (Ostrosky *et al.*, 2008). Esses resultados são influenciados pela composição do meio de cultura, pH, tamanho do inóculo, tempo e temperatura de incubação (Barchiesi *et al.*, 1993), além do método de análise, microrganismos e amostras selecionadas. Em se tratando de óleos essenciais, propriedades físicas e químicas, como solubilidade e volatilidade, têm um efeito considerável sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* desses compostos (Dorman e Deans, 2000; Inouye, Takiwaza e Yamaguchi, 2001).

O modo de ação dos compostos inibidores é representado pelas alterações morfológicas e funcionais provocadas nas células tratadas (De Billerberk *et al.*, 2001; Rasooli e Abyaneh, 2004). O caráter anfifílico de alguns compostos presentes nos óleos essenciais permite que as moléculas migrem pelo meio extracelular aquoso e danifiquem as membranas lipídicas microbianas, cujas funções de barreira são comprometidas (Turina *et al.*, 2006). Os compostos lipofílicos, que possuem uma elevada afinidade com a membrana celular, se acumulam nesse local e afetam as propriedades das membranas e o seu funcionamento (Weber e de Bont, 1996).

A membrana dos esporos fúngicos é protegida por uma parede, formada por várias camadas, que lhes permitem resistir às condições adversas. Essa parede consiste em uma associação de polissacarídeos e quitina-glucanas, além de açúcares simples (galactose, manose), celulose, proteínas e lipídeos. No entanto, alguns compostos presentes nos óleos essenciais atuam antes mesmo da germinação dos esporos e promovem o desenvolvimento anormal dos tubos germinativos e/ou seu rompimento (Dantigny e Nanguy, 2009).

Souza *et al.* (2010) avaliaram as alterações morfológicas causadas pelo óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) em *A. flavus*. O exame microscópico do micélio controle mostrou uma estrutura celular regular, com citoplasma homogêneo e conídios claramente visíveis. O micélio cultivado em meio adicionado do óleo essencial apresentou alterações morfológicas, com diminuição do teor de citoplasma, perda de pigmentação, desenvolvimento distorcido de hifas, brotamentos apicais e ausência de conídios.

O carvacrol, componente majoritário do óleo essencial de orégano, aumenta a fluidez da membrana, causa o vazamento de substâncias e provoca o colapso dessa membrana (Ultee, Kets e Smid, 1999). O mentol, composto majoritário de alguns dos óleos essenciais

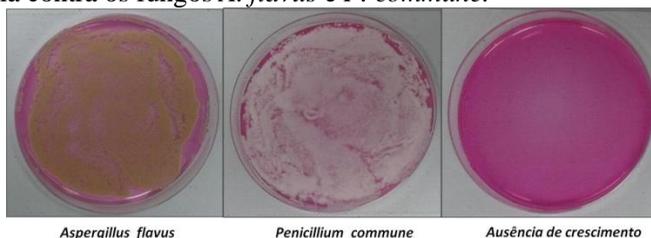
do gênero *Mentha*, é capaz de reduzir a eficiência da célula e impedir o surgimento de linhagens resistentes aos óleos essenciais (Schelz, Molnar e Hohmann, 2006).

### 3.3.3.2 Dose Mínima Inibitória (MID)

A MID dos óleos essenciais de orégano e hortelã foi considerada aquela capaz de inibir completamente o crescimento dos fungos *A. flavus* e *P. commune*, após 96 horas de incubação.

A Figura 3.4 apresenta o resultado do plaqueamento para determinação da MID (presença e/ou ausência de crescimento fúngico) e a Tabela 3.5 apresenta os valores de MID para os óleos de orégano e hortelã.

**Figura 3.4:** Avaliação visual da MID dos óleos de essenciais de orégano e hortelã contra os fungos *A. flavus* e *P. commune*.



(Fonte: elaborada pelo autor)

**Tabela 3.5:** Valores de MID ( $\mu\text{L/L}$ ) para os óleos essenciais (OE) de orégano e hortelã contra os fungos *A. flavus* e *P. commune*.

Microrganismo	MID ( $\mu\text{L/L}$ )	
	OE orégano	OE hortelã
<i>A. flavus</i>	107,3	1418,0
<i>P. commune</i>	53,7	1134,4

Os resultados de MID demonstram que, nas condições da análise, o *A. flavus* apresentou-se mais resistente ao efeito dos compostos voláteis dos óleos de orégano e hortelã do que o *P. commune*, ao contrário do ocorrido com a MIC. No entanto, os resultados reforçam o efeito inibidor do crescimento microbiano do óleo de orégano, superior ao óleo de hortelã, como ocorrido na análise de MIC. Os resultados de

MID demonstram que os compostos voláteis dos óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana significativa, quando comparados aos compostos em solução.

Kloucek *et al* (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana dos compostos voláteis dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Mentha spicata* contra os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium digitatum*. Os resultados mostraram que o óleo de orégano também apresentou maior potencial de inibição do crescimento fúngico do que o óleo de hortelã. No entanto, o *Penicillium* apresentou-se mais resistente ao tratamento com os voláteis do que o *Aspergillus*, ao contrário do ocorrido no presente estudo.

O modo de ação dos compostos voláteis dos óleos essenciais é representado pelos efeitos deletérios provocados aos fungos. De acordo com Dao e Dantigny (2011), fungos podem crescer numa grande variedade de substratos e numa ampla faixa de pH,  $a_w$  e temperatura. No entanto, em um de seus estudos, Inouye *et al.* (1998) demonstraram que a formação de esporos de quatro espécies de fungos filamentosos, incluindo os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, foi suprimida por alguns óleos essenciais. Segundo os autores, a supressão da formação de esporos pode estar estreitamente relacionada à inibição da respiração do fungo, promovida pela pressão de vapor dos compostos voláteis dos óleos essenciais. E embora as hifas estivessem bem desenvolvidas, há uma segmentação das estruturas expostas, na tentativa de permanecerem estáveis. Esta é, provavelmente, a estratégia de sobrevivência do fungo ao estresse provocado pela exposição aos vapores do óleo essencial (Inouye, 2003).

Os resultados da análise dos efeitos temporário/prolongado e fungicida/fungistático dos óleos provaram que o óleo de orégano tem efeito prolongado nessa concentração (MID), para ambos os microrganismos. O óleo de hortelã, por sua vez, apresentou efeito temporário para ambos os microrganismos, quando utilizado nessa concentração. Ambos os óleos resultaram em efeito estático, para ambos os microrganismos, ou seja, os compostos voláteis dos óleos não apresentaram ação fungicida nas condições da análise (concentração de óleo e tamanho de inóculo).

Inouye (2003) provou que o tratamento com voláteis de óleos essenciais é mais eficaz quando estes são utilizados em altas concentrações e por um curto espaço de tempo. A atividade antimicrobiana é determinada, principalmente, pela concentração máxima de vapor na fase inicial da incubação. Outros estudos provaram

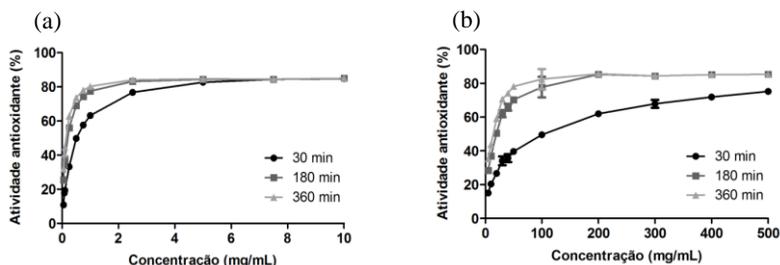
que o tratamento prolongado com óleo essencial ou seus constituintes pode induzir tolerância fenotípica (Inouye, Takiwaza e Yamaguchi, 2001).

### 3.3.4 Atividade antioxidante

#### 3.3.4.1 Método DPPH

A Figura 3.5 apresenta os resultados da análise de atividade antioxidante dos óleos de orégano e hortelã, avaliada pelo método de DPPH. A Tabela 3.6 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> dos óleos de orégano e hortelã.

**Figura 3.5:** Atividade antioxidante (%) dos óleos de orégano (a) e hortelã (b).



De acordo com Hassimotto, Genovese e Lajolo (2005), valores superiores a 70 % indicam uma boa ação antioxidante. Os resultados demonstram que as concentrações mínimas de óleo de orégano e tempos de reação que resultaram em atividade antioxidante maior do que 70 % foram de 2,5 mg/mL em 30 min; 0,75 mg/mL em 180 min e 0,5 mg/mL em 360 min. Para o óleo de hortelã, as concentrações mínimas e tempos de reação que resultaram em atividade antioxidante superior a 70 % foram de 400 mg/mL em 30 min, 50 mg/mL em 180 min e 30 mg/mL em 360 min. Estes resultados provam que o tempo de reação interfere na capacidade antioxidante dos óleos, uma vez que o aumento do tempo de reação implicou em menores concentrações de óleo capazes de exercer a mesma atividade antioxidante.

**Tabela 3.6:** IC<sub>50</sub> (mg/mL) dos óleos essenciais (OE) de orégano e hortelã.

Tempo reação (min)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	
	OE orégano	OE hortelã
30	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	88,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
180	0,2 ± 0,0 <sup>b</sup>	17,6 ± 0,1 <sup>b</sup>
360	0,1 ± 0,0 <sup>c</sup>	11,1 ± 0,0 <sup>c</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

Os resultados dos gráficos e tabela sugerem que o óleo de orégano tem maior capacidade antioxidante do que o óleo de hortelã. A análise estatística mostrou que o aumento do tempo de reação resultou em diferença significativa (p<0,05) nos valores das concentrações das amostras capazes de reduzir 50 % do DPPH. Isso prova, uma vez mais, que o tempo de reação influencia a capacidade antioxidante dos compostos.

Henn *et al* (2010) avaliaram a capacidade antioxidante do óleo essencial de *Origanum vulgare* pelo método de DPPH e encontraram um valor de IC<sub>50</sub> superior ao valor encontrado no presente estudo, após 30 minutos de reação. Isso prova que, além do tempo de reação, a origem da planta, o método de extração e a composição do óleo essencial interferem nos resultados das atividades biológicas desses óleos.

Segundo Kaurinovic *et al.* (2011), a atividade antioxidante de óleo essenciais depende não somente da quantidade, mas também da qualidade dos compostos presentes nos extratos. O carvacrol e o mentol, comumente encontrados em óleos essenciais de orégano e hortelã, respectivamente, possuem grupos hidroxila (OH) ligados ao anel aromático. Essa estrutura permite a interação dos compostos com os sítios ativos das enzimas microbianas. Possivelmente, os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana sejam os mesmos relacionados à atividade antioxidante (Velluti *et al.*, 2003).

Os flavonoides constituem uma classe de compostos polifenólicos existentes em plantas superiores, com ação anticarcinogênica, antiinflamatória, antibacteriana, antiviral, dentre outras. No entanto, há um particular interesse na atividade antioxidante dos flavonoides, devido à sua capacidade de reduzir radicais livres (Rice-Evans, Miller, Paganga, 1996). Os óleos essenciais apresentam

uma grande complexidade química, devido à presença de compostos com grupos funcionais, polaridade e comportamento químico diferentes. Dessa forma, os resultados de um ou dois ensaios refletem apenas uma pequena parte da sua capacidade antioxidante (Sacchetti *et al.*, 2005).

### 3.4. Conclusões parciais

- ✓ Os óleos essenciais de orégano e hortelã apresentaram potencial citotóxico em células não tumorais de melanócitos humanos (NGM) e fibroblastos murinos (NIH3T3) em concentrações  $\geq 25 \mu\text{g/mL}$  (taxas de sobrevivência celular  $\leq 20 \%$ ). O óleo de orégano apresentou-se potencialmente mais tóxico do que o óleo de hortelã, nas condições do estudo (método de análise, células e amostras selecionadas);
- ✓ Os componentes voláteis e em solução do óleo essencial de orégano apresentaram maior poder antifúngico do que os componentes em solução do óleo de hortelã, nas condições das análises, como demonstram os valores de MID e MIC;
- ✓ Os compostos voláteis dos óleos de orégano e hortelã apresentaram atividade antimicrobiana muito mais intensa do que os compostos em solução. Embora com modos de ação diferentes, a expressão dessa propriedade pelos compostos voláteis aumenta as possibilidades de aplicação dos óleos essenciais;
- ✓ O óleo de orégano apresentou maior potencial antioxidante do que o óleo de hortelã, nas condições do estudo. O tempo de reação influenciou os resultados de atividade antioxidante dos compostos;
- ✓ As atividades citotóxica, antimicrobiana e antioxidante dos óleos de orégano e hortelã foram atribuídas principalmente aos seus compostos majoritários, carvacrol e mentol, respectivamente. A qualidade e as concentrações relativas desses compostos são os responsáveis pelas diferenças nos resultados das diferentes atividades dos óleos essenciais;

## CAPÍTULO 4

### **CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE MICROCÁPSULAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) OBTIDAS POR *SPRAY DRYING***

#### **4.1. Introdução**

Reconhece-se o crescente número de consumidores que esperam da indústria a adoção de uma política de uso decrescente de aditivos químicos na conservação de alimentos. Mesmo fazendo uso massivo desses compostos, as perdas da indústria devido à deterioração microbiana são da ordem de bilhões de reais ao ano (Freire, 2011). As alternativas de redução das perdas de alimentos por deterioração microbiana envolvem o uso de embalagens ativas. Matrizes poliméricas incorporadas de ativos antimicrobianos estão incluídas nessa categoria e despontam como uma das alternativas mais promissoras às embalagens tradicionais (Coma, 2008).

Os óleos essenciais são compostos reconhecidos pela inibição do crescimento microbiano (Burt, 2004; López *et al.*, 2005) e pela possibilidade de incorporação em polímeros para a produção de embalagens antimicrobianas (Suppakul, Sonneveld e Bigger, 2011). No entanto, esses compostos são caracterizados pela instabilidade e alta suscetibilidade à oxidação, volatilização ou reação com outros componentes da formulação. O processo de microencapsulamento oferece uma alternativa de manutenção e garantia da estabilidade de substâncias lábeis, como vitaminas, óleos essenciais e corantes (Leimann *et al.*, 2009; Madene *et al.*, 2006).

O microencapsulamento pode ser definido como uma técnica de embalagem ou revestimento capaz de inibir a volatilização e proteger compostos contra a oxidação e a degradação química (Rosenberg, Kopelman e Talmon, 1990; McNamee, O’Riordan e O’Sullivan, 1998; Jafari *et al.*, 2008). O método de microencapsulamento mais comumente utilizado pelas indústrias de alimentos é o *spray drying*. Esse processo é caracterizado pela conversão de um material em estado fluido para uma forma particulada seca, a partir da pulverização desse material em um meio de secagem a alta temperatura (Tan, Chan e Heng, 2005). Nesse processo, as partículas atomizadas secam rapidamente e retêm os constituintes voláteis no interior das microcápsulas (Jafari *et al.*, 2008).

Incorporados aos polímeros, óleos essenciais microencapsulados dão origem aos filmes antimicrobianos, uma categoria de embalagem ativa que atua como veículo para a liberação gradual dos compostos, contrária à aplicação direta de conservantes na superfície de alimentos (Appendini e Hotchkiss, 2002; Suppakul *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2008). Dessa maneira, é possível manter a concentração mínima inibitória dos ativos antimicrobianos por períodos de tempo mais longos e garantir uma atividade antimicrobiana eficaz (Gennadios, Hanna e Kurth, 1997; LaCoste *et al.*, 2005). A atividade antimicrobiana de compostos ativos microencapsulados depende da capacidade das microcápsulas de reter e, posteriormente, liberar gradualmente os compostos voláteis responsáveis por essa atividade.

Diante do exposto, os objetivos principais deste estudo foram a caracterização e a avaliação das propriedades antimicrobianas de microcápsulas de óleo essencial de orégano produzidas em *spray dryer*, para aplicação no desenvolvimento de embalagens antimicrobianas. A decisão pela utilização do óleo na forma microencapsulada foi resultado de testes preliminares de produção de filmes ativos utilizando o óleo no estado puro. Os filmes resultantes apresentaram uma camada de óleo superficial, indicando separação de fases da emulsão (suspensão gelatinizada e emulsionada), e odor pronunciado de óleo de orégano, sugerindo grande perda de componentes voláteis.

## **4.2 Materiais e Métodos**

### **4.2.1 Materiais**

Os materiais utilizados na elaboração da emulsão foram goma arábica em pó (General Iron Fittings – SP), maltodextrina (10 DE, Loremalt 2002, Lorenz – PR), emulsificante Tween 80 (Synth – SP) e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) (Ferquima – SP). A seleção do óleo de orégano para continuidade do estudo, em detrimento do óleo de hortelã, foi realizada com base nos resultados do Capítulo 3.

### **4.2.2 Produção de microcápsulas por *spray drying***

Anteriormente à produção de microcápsulas em *spray dryer*, foram realizados testes preliminares de formulação da emulsão e condições de processo. Para os testes de formulação, foram selecionados dois materiais encapsulantes, utilizados puros ou combinados, e um

composto emulsificante. Os materiais encapsulantes foram testados quanto à sua capacidade de emulsificação e produção de emulsão estável. A estabilidade da emulsão foi avaliada pelo teste da proveta (análise de separação de fases) e por análise de tamanho de partícula.

Os materiais de parede selecionados, goma arábica (GA) e a maltodextrina (M), foram avaliadas quando utilizados puros ou combinados (75GA:25M, 50GA:50M e 75M:25GA). As concentrações de matéria seca testadas foram de 10, 20 e 30 g/100 mL de água e as concentrações de óleo de orégano testadas foram de 10, 15, 20 e 25 mL/100 g de matéria seca. As concentrações de emulsificante Tween 80 testadas variaram entre 0,0 a 1,0 mL/100 mL de emulsão, conforme a formulação.

A pré-emulsão foi elaborada mediante a mistura de uma solução aquosa do material de parede, pré-hidratado em água destilada por 12 horas, à temperatura ambiente, com óleo de orégano. A mistura OE:MP foi emulsionada em equipamento de Ultrassom (Sonics VC505 - Sonics and Materials, Inc. – USA) (500 W, 20 Hz, 35 % de amplitude), em tempos variando conforme o volume de emulsão (15 min/200 mL).

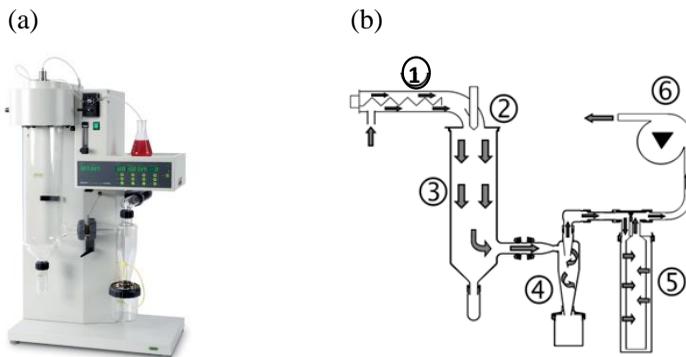
As condições de processo foram avaliadas variando-se a temperatura de entrada do ar de secagem (170 e 180 °C) e a vazão de alimentação (1,2 e 2,4 mL/min). As condições foram selecionadas com base nos resultados de rendimento de processo (%) e conforme os resultados da avaliação visual do fenômeno de adesão de material às paredes do equipamento (melhor condição = menor quantidade de material aderido).

A emulsão foi submetida ao microencapsulamento em *Mini Spray Dryer* (Buchi *Mini Spray Dryer* - B 290 - SP - Brasil) (2900 W, 50-60 Hz, diâmetro do bocal (*nozzle*) = 0,7 mm) (Figura 4.1), nas condições resultantes dos testes preliminares. As microcápsulas coletadas foram armazenadas em embalagem de vidro, sob refrigeração e ao abrigo da luz.

O princípio de funcionamento do equipamento (Figura 4.1) é baseado nos seguintes passos:

- ✓ Passo 1: aquecimento do ar de entrada;
- ✓ Passo 2: formação das gotículas em bico duplo fluido;
- ✓ Passo 3: câmara de secagem - troca de calor entre o ar de secagem e a amostra;
- ✓ Passo 4: coleta de partículas por ciclone;
- ✓ Passo 5: filtro externo – coleta de partículas finas;
- ✓ Passo 6: gás de secagem – aspirador.

**Figura 4.1:** Foto ilustrativa do *Mini Spray Dryer* Buchi B 290 (a) e esquema do princípio de funcionamento do equipamento (b).



## 4.2.3 Caracterização da emulsão e microcápsulas

### 4.2.3.1 Umidade

A umidade das microcápsulas foi determinada em Analisador de Umidade Smart Turbo (CEM Corporation – USA), segundo o método oficial da A.O.A.C. (*Association of Official Agricultural Chemists*) (1995).

### 4.2.3.2 Solubilidade

A solubilidade das microcápsulas foi determinada com base no método proposto por Cano-Chauca *et al.* (2005), com modificações. 1 g de amostra foi adicionado a 25 mL de água destilada em tubos Falcon e agitado por 5 minutos em homogeneizador de tubos. A suspensão foi centrifugada (Centrífuga Microprocessada Quimis – SP - Brasil) a 2600 rpm, por 10 minutos. 20 mL do sobrenadante foram transferidos para placas de Petri, levadas à estufa a 105 °C por 5 horas. A solubilidade foi expressa em g sobrenadante/ 100 g amostra inicial.

#### 4.2.3.3 Higroscopicidade

A higroscopicidade das microcápsulas foi determinada com base no método proposto por Cai e Corke (2000). Inicialmente, 2 g de amostra foram pesados em placas de Petri e acondicionados em ambiente contendo solução saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (UR = 81 %). Após 7 dias, as placas foram novamente pesadas para determinação da higroscopicidade, expressa em g de água/100 g de amostra.

#### 4.2.3.4 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi determinada conforme metodologia proposta por Tan, Chan e Heng (2005), com modificações. Inicialmente, determinou-se o teor de óleo superficial das microcápsulas, pela adição de 2 g de amostra em tubos Falcon e suspensão em 20 mL de éter etílico. A mistura foi agitada em homogeneizador de tubos e filtrada em papel de filtro (Macherey Nagel MN-619de - USA) de peso conhecido. O resíduo foi lavado 3 vezes com 20 mL de éter etílico. O papel contendo o resíduo foi seco em estufa a 60 °C até peso constante. O teor de óleo superficial foi calculado por diferença de massa (g) antes e após a extração com hexano.

Para a determinação do teor total de óleo (óleo superficial + óleo encapsulado) das microcápsulas, 5 g de amostra foram adicionados em cartucho de papel de peso conhecido. O material foi submetido à extração Soxhlet com 180 mL de éter etílico durante 8 horas. O cartucho contendo o resíduo foi seco em estufa até peso constante. O teor de óleo total foi calculado por diferença de massa (g) antes e após a extração e secagem.

O teor de óleo encapsulado foi calculado pela diferença entre o teor de óleo total e o teor de óleo superficial. A eficiência de encapsulamento (%) foi calculada pela razão entre a massa de óleo encapsulado (g) e a massa total de óleo (g).

#### 4.2.3.5 Rendimento de processo

O rendimento (%) do processo de microencapsulamento foi calculado pela relação entre a massa (g) de microcápsulas coletada e a matéria seca (g) de alimentação. O produto aderido às paredes da câmara de secagem não foi considerado para o cálculo.

#### 4.2.3.6 Microestrutura/Morfologia

A microestrutura e a morfologia das microcápsulas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em microscópio JEOL JSM 6390LV.

#### 4.2.3.7 Distribuição de tamanho de partículas

A distribuição de tamanho de partículas da emulsão e das microcápsulas foi avaliada por difração a laser, em equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), acoplado a uma unidade de dispersão Hydro SM (Malvern Instruments, Reino Unido). Os tamanhos característicos determinados  $d_m$ ,  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  ( $\mu\text{m}$ ) correspondem, respectivamente, aos tamanhos de partícula médio e situados em 10, 50 e 90 % da curva de distribuição acumulada. As medidas foram realizadas em duplicata, com média de 10 leituras por amostra e os resultados apresentados como valores médios.

#### 4.2.3.8 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das microcápsulas foi avaliada pelos métodos de microdiluição em caldo (para determinação da concentração mínima inibitória - MIC) e volatilização em disco (para determinação da dose mínima inibitória - MID), conforme disposto no Capítulo 3, itens 2.4.2 e 2.4.3, respectivamente. A MIC foi considerada a menor concentração de óleo essencial de orégano microencapsulado ( $\text{mg/mL}$ ) capaz de inibir 100 % do crescimento dos microrganismos *A. flavus* e *P. commune*. As concentrações testadas variaram de 2,5 a 5,0  $\text{mg/mL}$ . A MID foi considerada a concentração em  $\mu\text{L/L headspace}$  capaz de inibir visível e completamente o crescimento dos microrganismos.

Para avaliação da atividade antimicrobiana de microcápsulas, alguns autores procedem à extração do óleo microencapsulado por hidrodestilação. No presente estudo, a atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se as microcápsulas inteiras (material de parede + material de núcleo).

## 4.3 Resultados e discussão

### 4.3.1 Produção de microcápsulas por *spray drying*

Os resultados dos testes preliminares de emulsão, segundo a capacidade de emulsificação do material encapsulante e a estabilidade da emulsão, apontaram a seguinte formulação: solução aquosa de goma arábica (GA) na concentração de 30 g/100 mL de água e óleo de orégano na concentração de 25 mL/100 g de matéria seca (OE:GA = 1:4). As formulações contendo material de parede composto por maltodextrina ou pela mistura de goma arábica e maltodextrina, nas diferentes proporções, resultaram em emulsões de caráter instável, com separação de fases e diâmetro médio de partícula maior do que a formulação contendo apenas goma arábica. Além disso, nesta formulação não houve necessidade de adição do emulsificante Tween 80, ao contrário das demais, devido às propriedades emulsificantes da goma arábica, resultantes da presença de uma pequena quantidade de proteínas na sua constituição.

De acordo com Jafari *et al.* (2008), a formulação da emulsão de alimentação do *spray dryer* tem um papel importante na retenção dos compostos voláteis e no teor de óleo superficial das microcápsulas. Segundo Mongenot, Charrier e Chalier (2000), o uso do ultrassom no preparo aumenta a qualidade da emulsão, resultando em maior retenção e menor difusão dos compostos voláteis durante a secagem, comparado ao método de ultra-turrax.

As condições de processo do microencapsulamento em *spray dryer*, selecionadas com base nos resultados dos testes preliminares sobre rendimento de processo (%), foram: temperatura de entrada de 180 °C e vazão de alimentação de 1,2 mL/min.

### 4.3.2 Caracterização da emulsão e microcápsulas

#### 4.3.2.1 Caracterização das microcápsulas e do processo de microencapsulamento:

A Tabela 4.1 apresenta os resultados de caracterização das microcápsulas de óleo de orégano, produzidas (formulação e condições de processo) conforme disposto no item 4.3.1, quanto aos parâmetros de umidade, solubilidade e higroscopicidade.

**Tabela 4.1:** Caracterização das microcápsulas.

Parâmetros	(g/100 g)
Umidade	2,3 ± 0,2
Solubilidade	51,3 ± 3,7
Higroscopicidade	35,5 ± 0,3

O valor de umidade das microcápsulas de óleo essencial de orégano resultou intermediário aos obtidos em estudos sobre atomização de óleos essenciais (1,7 a 4,2 g/100 g) (Adamiec e Kalemba, 2006). Em seu trabalho sobre microencapsulamento de óleo essencial de alecrim por *spray drying*, Fernandes (2013) verificou que a variável que apresentou maior influência sobre a umidade das partículas foi a temperatura de entrada do ar de secagem. Com o aumento da temperatura do ar de secagem e a redução da vazão de alimentação, o teor de umidade das microcápsulas reduziu. No presente estudo, a alta temperatura do ar de entrada (180 °C) e a baixa vazão de alimentação (1,2 mL/ min) possivelmente influenciaram o resultado de (baixa) umidade do produto final.

A solubilidade das microcápsulas obtidas no presente estudo (51,3 ± 3,7 g/100 g) resultou superior à solubilidade das microcápsulas de óleo essencial de alecrim relatada por Fernandes (2013) (46,6 ± 1,2 g/100 g). Yousefi, Emam-Djomeh e Mousavi (2011) afirmam que a solubilidade é fortemente influenciada pelo material de parede e sua concentração, mais do que pelas condições de processo. Fernandes (2013) utilizou o mesmo material de parede utilizado no presente estudo - goma arábica - porém numa concentração menor (20 g/100 g) do que a utilizada neste estudo (30 g/100 g), justificando a diferença nos resultados de solubilidade.

O resultado de higroscopicidade encontrado (35,5 ± 0,3 g/100 g) pode ser justificado pela (alta) concentração de goma arábica (30 g/100 g) e pela (alta) temperatura de entrada do ar de secagem (180 °C). Os resultados encontrados por Fernandes (2013) demonstram que a absorção de água das partículas aumentou com o aumento da concentração do material de parede (goma arábica) acima de 20 g/100 g. Este fato pode ser atribuído à natureza higroscópica da goma arábica. Sua estrutura química apresenta um elevado número de ramificações constituídas de grupos hidrofílicos, que se ligam facilmente às moléculas de água. A respeito da temperatura do ar de secagem, valores mais baixos de higroscopicidade foram obtidos quando foram utilizadas

temperaturas de entrada mais baixas ( $< 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Isso se deve ao fato de que as microcápsulas produzidas sob estas condições têm maior teor de umidade e, consequentemente, menor gradiente de concentração de água entre o produto e o ambiente. Comportamento semelhante foi encontrado por Frascareli *et al.* (2011), em seu trabalho sobre microencapsulamento de óleo de café por atomização, utilizando goma arábica como material encapsulante.

A Tabela 4.2 apresenta os resultados de caracterização do processo de microencapsulamento do óleo essencial de orégano.

**Tabela 4.2:** Caracterização do processo de microencapsulamento por *spray drying*.

Parâmetros	(%)
Eficiência encapsulamento	$85,0 \pm 3,6$
Rendimento	$58,1 \pm 1,8$

A eficiência de encapsulamento de aromas e óleos essenciais é influenciada pela estabilidade da emulsão inicial. Quanto maior a estabilidade da emulsão, maior a eficiência do processo. A eficiência de encapsulamento encontrada no presente estudo ( $85,0 \pm 3,6\%$ ) é semelhante à encontrada por Frascareli *et al.* (2011) ( $85,2\%$ ) e superior à encontrada por Sarkar *et al.* (2013) ( $80,6\%$ ), em seu trabalho sobre microencapsulamento de óleo de hortelã em goma arábica por *spray drying*. Fäldt e Bergenstahl (1995) afirmam que a eficiência de encapsulamento e, por conseguinte, o rendimento de processo, se devem aos diferentes materiais de núcleo e de parede utilizados no processo e suas concentrações. Os autores verificaram que um aumento no teor de óleo, em relação ao material de parede, resultou em menor eficiência de encapsulamento.

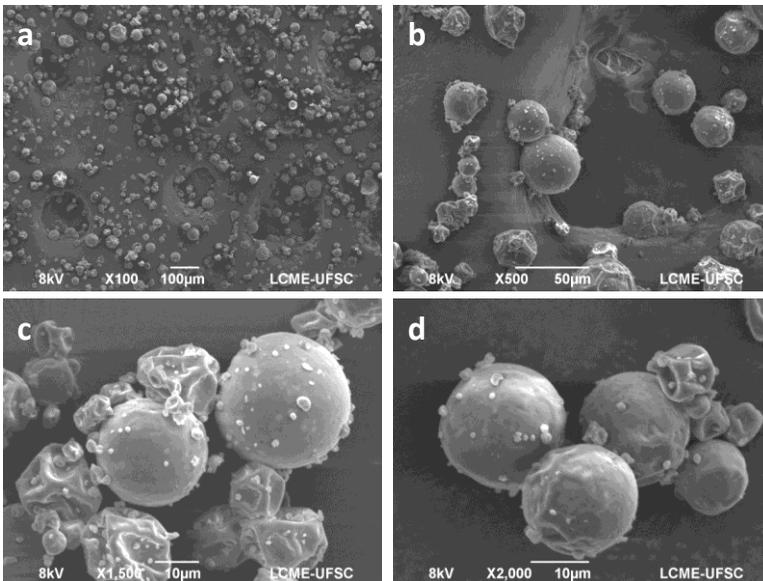
O rendimento do processo de microencapsulamento do presente estudo ( $58,1 \pm 1,8\%$ ) foi superior aos valores encontrados por Tan, Chan e Heng (2005), para o microencapsulamento de óleo de peixe (O) em suspensão de amido modificado (AM). As proporções de O:AM de 1:2 e 1:0,7 resultaram em rendimentos da ordem de  $43,8\%$  e  $47,8\%$ , respectivamente. De acordo com esses autores, o menor rendimento deveu-se à adesão de microcápsulas às paredes do *spray dryer*. E o maior rendimento deveu-se ao tamanho das microcápsulas e à maior eficiência de encapsulamento, resultando em menos óleo na superfície da microcápsula e menor adesão às paredes do equipamento.

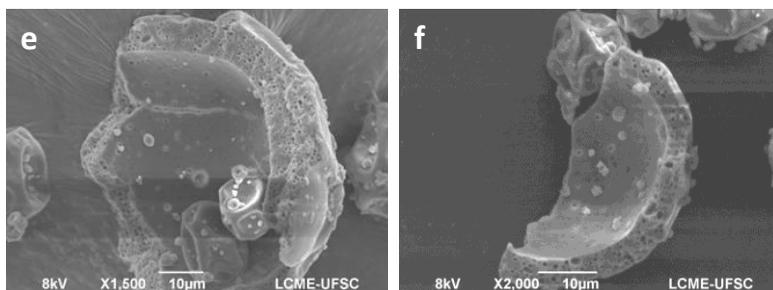
Numa relação OE:MP alta, a quantidade de material de parede não é suficiente para encapsular o óleo, fazendo que este permaneça na superfície da microcápsula. No presente estudo, a relação OE:MP (1:4) resultou em alta eficiência e rendimento de processo, sugerindo que a seleção e relação dos materiais de parede e núcleo foi ideal. A média de rendimento dos processos de microencapsulamento de óleos essenciais por *spray drying* encontra-se em torno de 60 %. Além disso, as especificações do equipamento utilizado (*Mini Spray Dryer*) sugerem um rendimento máximo de processo de 70 %.

#### 4.3.2.2 Microestrutura/Morfologia

A Figura 4.2 apresenta os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microcápsulas.

**Figura 4.2:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de microcápsulas de goma arábica - óleo essencial de orégano (a, b, c, d = topografia externa; e, f = detalhes microestruturais da cápsula e cavidade central).





As micrografias (a), (b), (c) e (d) apresentam microcápsulas de formato esférico, com aparência típica de materiais produzidos em *spray dryer*. Segundo Sheu e Rosenberg (1995), a topografia exterior das microcápsulas é afetada pela composição do material de parede. Aquelas compostas somente de carboidratos e/ou que apresentam proporções elevadas desse composto apresentam um grau de deformação mais elevado. As depressões nas superfícies das partículas são mais significativas em partículas recobertas com polissacarídeos. O encolhimento da superfície também é resultado da rápida contração das partículas durante a fase inicial do processo de secagem (Kim, Morr e Schenz, 1996).

De acordo com Mongenet, Charrier e Chalier (2000) e Bertolini, Siani e Grosso (2001), a ausência ou baixo teor de óleo resulta numa retração mais extensa das superfícies. Já em proporções de OE:MP maiores, o óleo ocupa um volume maior da microcápsula e reduz os efeitos de encolhimento durante a secagem. Os pontos de aglomeração sobre a superfície externa e/ou interna das microcápsulas podem ser explicados pela deposição de gotículas de óleo sobre essas superfícies e a consequente plasticização da sua estrutura e formação de grumos.

As micrografias (e) e (f) apresentam detalhes microestruturais das microcápsulas, compostas de paredes porosas de pequena espessura, semelhantes a uma esponja, como demonstram as cavidades na parede da microcápsula. A cavidade central é resultado da expansão da cápsula com o aumento da temperatura no interior da partícula. Os mecanismos associados com a formação desses espaços vazios estão relacionados à expansão das partículas durante as últimas fases do processo de secagem (Sheu e Rosenberg, 1995; Soottitantawat *et al.*, 2003).

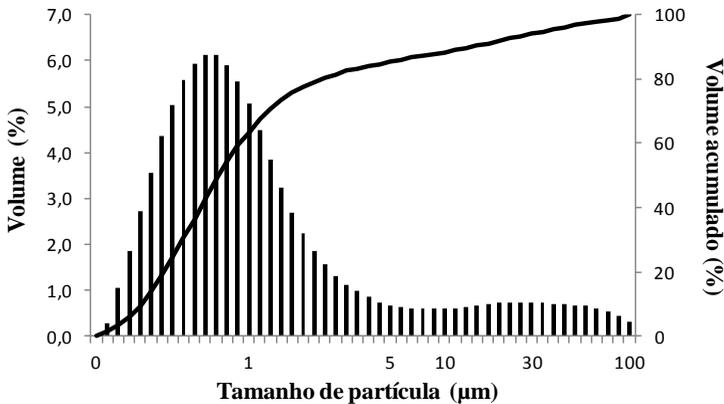
Segundo Soottitantawat *et al.* (2003), a morfologia das microcápsulas, resultante do processo de *spray drying*, afeta algumas de suas propriedades, tais como a taxa de liberação dos compostos ativos e

as propriedades de fluxo do pó. A liberação dos compostos depende da porosidade e da integridade da superfície da cápsula, bem como da distribuição dos ativos no seu interior, diretamente relacionada à morfologia da partícula atomizada.

#### 4.3.2.3 Distribuição de tamanho de partículas

A Figura 4.3 apresenta a curva de distribuição de tamanho das partículas da emulsão goma arábica - óleo essencial de orégano.

**Figura 4.3:** Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de partículas da emulsão goma arábica - óleo essencial de orégano.



O tamanho das partículas das emulsões é um parâmetro importante, relacionado à sua estabilidade física. O princípio geralmente aceito é o de que gotículas menores indicam emulsões fisicamente mais estáveis (Kim, Moor e Schenz, 1996).

Os resultados da análise de distribuição de tamanho das partículas da emulsão goma arábica - óleo essencial de orégano demonstram partículas de diâmetro médio  $d_m$  de  $0,5 \mu\text{m}$  e tamanhos característicos  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  de  $0,2 \mu\text{m}$ ,  $0,7 \mu\text{m}$  e  $16,0 \mu\text{m}$ , respectivamente. Segundo Ma *et al.* (2012), partículas lipídicas são susceptíveis aos fenômenos de coalescência. O revestimento incompleto da superfície na interface com o material de parede pode levar à formação de gotículas maiores. Esse fenômeno é, possivelmente, o responsável pela presença de partículas de maiores diâmetros ( $d > 30 \mu\text{m}$ ) na emulsão goma arábica-óleo de

orégano. No entanto, cerca de 90 % das partículas apresentaram diâmetro menor do que 16,0  $\mu\text{m}$ .

Em seu trabalho sobre microencapsulamento de óleo de café, Frascareli *et al.* (2011) encontraram diâmetros médios menores para as partículas da emulsão quando utilizaram agentes encapsulantes - proteínas do soro de leite e goma arábica - puros (sem mistura). Esse fato pode ser atribuído às propriedades emulsificantes desses materiais. Quando utilizadas misturas de materiais de parede, especialmente com a maltodextrina, os diâmetros das partículas da emulsão resultaram maiores. Soottitantawat *et al.* (2003) encontraram que, para todas as combinações de materiais de parede, o aumento do diâmetro das partículas da emulsão resultou numa diminuição da retenção do composto ativo. Esse resultado sugere que o uso de um material de parede adequado e na forma pura (sem mistura), como o utilizado no presente estudo, resulta em tamanhos de partículas menores e capazes de maior retenção dos ativos durante a atomização e secagem.

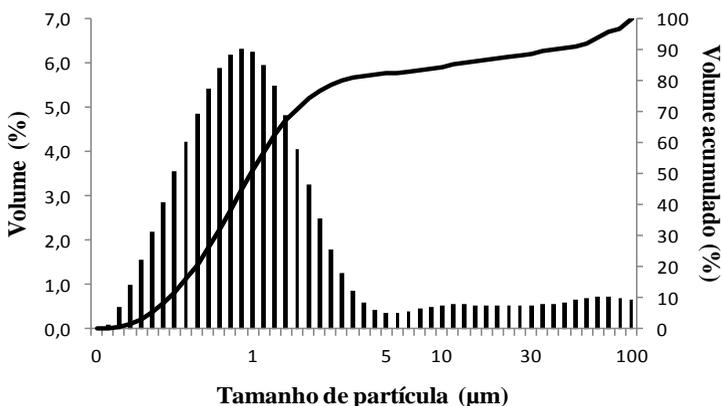
Além da qualidade do material encapsulante, a formação de glóbulos pequenos e de tamanho uniforme está relacionada com a capacidade desses materiais de revestir completamente as gotículas de óleo durante a homogeneização da emulsão, para evitar a coalescência das partículas (Kim, Moor e Schenz, 1996). Para isso, faz-se necessário uma relação ideal entre material de núcleo (MN) e material de parede (MP). Segundo Hogan *et al.* (2001), em relações óleo/goma arábica entre 1,0 e 2,0, a quantidade de goma arábica disponível para atuar como emulsionante torna-se limitante, resultando na produção de gotículas maiores. Os autores relatam que emulsões preparadas com razões de óleo/goma menores do que 1,0 resultaram em diâmetros de partículas menores, suficientes para produzir emulsões estáveis. Os resultados do presente estudo, no qual utilizou-se uma relação de MN:MP de 1:4 (0,25), corroboram com os resultados do estudo dos autores acima citados.

Além da viscosidade e estabilidade, alguns autores demonstram que o tamanho da partícula da emulsão tem um efeito considerável na eficiência de encapsulamento de aromas e óleos durante a secagem em *spray drying* (Sheu e Rosenberg, 1995; Soottitantawat *et al.*, 2003; Soottitantawat *et al.*, 2005). Nesses estudos, a eficiência de encapsulamento aumentou com a redução do tamanho da partícula da emulsão de alimentação. A razão disso é que uma emulsão de tamanho de partícula reduzido permanece estável durante o processo de *spray drying* (Jafari *et al.*, 2008).

Alguns estudos também têm demonstrado que a estabilidade da emulsão influencia a qualidade e a funcionalidade das microcápsulas (Sheu e Rosenberg, 1995; Kim, Moor e Schenz, 1996). Os diâmetros das partículas da emulsão refletem nas características do produto final, como a concentração de óleo superficial e total das microcápsulas (Hogan *et al.*, 2001).

A Figura 4.4 apresenta a curva de distribuição de tamanho das microcápsulas contendo óleo de orégano. No presente estudo, os resultados da análise de distribuição de tamanho das microcápsulas apontam um diâmetro médio  $d_m$  de  $0,8 \mu\text{m}$  e diâmetros característicos  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  de  $0,3 \mu\text{m}$ ,  $0,9 \mu\text{m}$  e  $39,7 \mu\text{m}$ , respectivamente. O tamanho das partículas/microcápsulas é determinado, principalmente, pelas características da emulsão, como a viscosidade e a concentração de sólidos; e pelos parâmetros operacionais de atomização, como o diâmetro e a posição do atomizador (*nozzle*), a vazão de alimentação e a pressão do ar de atomização (McNamee *et al.*, 1998; Hogan *et al.*, 2001). No geral, uma alta pressão e um bocal pequeno resultam em partículas menores.

**Figura 4.4:** Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de microcápsulas contendo óleo essencial de orégano.



A grande variação no tamanho pode ser atribuída à aglomeração das partículas ricas em óleo com as partículas pobres em óleo, que sofrem encolhimento e contração (Hogan *et al.*, 2001). Pelas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 4.2

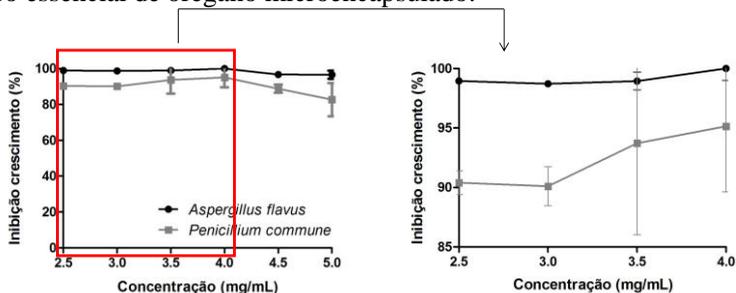
– item 3.2.2), é possível observar a presença de partículas maiores em conjunto com partículas menores. Durante a análise, as partículas agregadas não podem ser separadas, justificando a presença de partículas grandes (~100  $\mu\text{m}$ ) (Teodoro *et al.*, 2014). Segundo Frascareli *et al.* (2011), a presença de partículas grandes (40 - 100  $\mu\text{m}$ ) também pode estar associada à formação de ligações irreversíveis. Pode-se afirmar que a amostra analisada no presente estudo apresenta uma pequena quantidade de partículas compreendidas nessa faixa de tamanho, uma vez que cerca de 90 % das partículas resultaram em diâmetro < 40  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2.4 Atividade antimicrobiana

##### 4.3.2.4.1 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A Figura 4.5 apresenta os resultados da análise de determinação da MIC das microcápsulas de óleo de orégano.

**Figura 4.5:** Inibição do crescimento (%) de *A. flavus* e *P. commune* por óleo essencial de orégano microencapsulado.



A Figura 4.5 demonstra que, na menor concentração testada (2,5 mg/mL), a inibição do crescimento do *A. flavus* foi quase total, alcançando valores de 99,0 %, ao passo que para o *P. commune* esse valor foi de 90,4 %. A concentração absoluta de maior percentual de inibição, para ambos os microrganismos, foi de 4,0 mg/mL, considerada a MIC do óleo de orégano microencapsulado. Nessa concentração, 100 % do crescimento de *A. flavus* e 95,1 % do crescimento de *P. commune* foram inibidos. No entanto, considerando-se o erro de análise, pode-se afirmar que ambos os microrganismos tiveram 100 % de inibição do

crescimento em concentrações variando entre 3,5 e 4,0 mg/mL. Acima dessa concentração, a inibição do crescimento fúngico apresentou tendência decrescente, provavelmente devido à solubilidade limitada das microcápsulas no solvente. Acima de 5,0 mg/mL, a baixa solubilidade das microcápsulas comprometeu o procedimento e a medida da sua atividade antimicrobiana.

O *P. commune* apresentou-se mais resistente aos efeitos do óleo essencial de orégano microencapsulado do que o *A. flavus*, como na determinação da MIC do óleo puro. O valor de MIC para o óleo microencapsulado foi igual ao valor de MIC para o óleo puro, para inibição do *P. commune*. Para inibição do *A. flavus*, esse valor foi 4 vezes maior. Essa diferença pode ser justificada pelas diferenças de composição das amostras avaliadas e pelas interações e alterações promovidas pelo processo de microencapsulamento, de forma que a comparação dos resultados não é indicada.

Leimann *et al.* (2009) avaliaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de capim-limão puro e microencapsulado contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e encontraram a mesma concentração mínima inibitória para ambos os estados do óleo. Este resultado demonstra que, apesar da pequena variação na concentração relativa (%) dos componentes, promovida pelo microencapsulamento do óleo, não houve alteração da sua capacidade antimicrobiana. Os autores concluíram que o processo de encapsulamento não promoveu deterioração do óleo essencial, nem prejuízo da sua atividade biológica.

Da mesma forma, os resultados do presente estudo sugerem que o microencapsulamento do óleo de orégano em goma arábica não foi prejudicial e/ou limitante à sua atividade antimicrobiana. As microcápsulas mantiveram o largo espectro de atividade antifúngica do óleo essencial de orégano.

#### **4.3.2.4.2 Dose Mínima Inibitória (MID)**

A Tabela 4.3 apresenta os resultados de MID do óleo essencial de orégano microencapsulado contra os fungos *A. flavus* e *P. commune*.

**Tabela 4.3:** MID ( $\mu\text{L/L}$ ) do óleo essencial de orégano microencapsulado.

Microrganismo	MID ( $\mu\text{L} / \text{L}$ )
<i>P.commune</i>	22,8
<i>A. flavus</i>	273,6

Os resultados de MID confirmam a maior resistência do *A. flavus* aos efeitos dos compostos voláteis liberados pelas microcápsulas, como ocorrido com o óleo de orégano puro, apesar da diferença nos valores de MID entre o óleo de orégano puro e microencapsulado.

A diferença entre os valores de atividade antifúngica do óleo de orégano, no seu estado puro ou microencapsulado, pode ser atribuída às diferenças de volatilidade relativa dos seus componentes e às interações entre material de parede e material de núcleo, promovidas pelo processo de microencapsulamento. Segundo Ré (1998), além de fatores tais como a volatilidade, a solubilidade e a difusividade dos compostos voláteis, as possíveis interações entre os voláteis e o material da parede devem ser levadas em consideração na microencapsulação por *spray drying*. As interações físicas ou físico-químicas levam à formação de complexos insolúveis e à associação molecular do material de parede com o volátil por meio de ligações de hidrogênio, afetando indiretamente a retenção dos compostos.

Outra justificativa para a diferença nos valores de MID diz respeito à alteração na composição relativa do óleo após o processo de microencapsulamento. Arana-Sánchez *et al.* (2010) promoveram o microencapsulamento de três óleos de orégano mexicano com proporções de carvacrol, timol e p-cimeno diferentes. Segundo os autores, o composto p-cimeno teve seu teor reduzido nas microcápsulas, comparado ao óleo puro. Em compensação, os conteúdos de carvacrol e timol foram maiores nas microcápsulas do que nos óleos puros. As diferenças na composição relativa justificam as diferenças nos resultados das atividades biológicas desses óleos.

Os resultados de MID do presente estudo sugerem que não houve prejuízo da sua atividade antimicrobiana do óleo de orégano, devido ao processo de microencapsulamento. Esse processo é considerado uma técnica de baixo custo (comparada a outras técnicas de microencapsulamento) e eficaz de preservação das propriedades dos óleos essenciais.

#### 4.4 Conclusões parciais

- ✓ A formulação e as características da emulsão de alimentação do *spray dryer* influenciaram as características das microcápsulas, além do rendimento e eficiência do processo de microencapsulamento;
- ✓ A relação 1:4 entre material de núcleo (MN) (óleo essencial de orégano) e material de parede (MP) (goma arábica) permitiu a obtenção de microcápsulas de formato característico, com diâmetro médio reduzido ( $d_m = 0,8 \mu\text{m}$ ) e boa capacidade de retenção de voláteis, expressa pela eficiência de encapsulamento (85,0 %);
- ✓ Os resultados das análises de atividade antimicrobiana das microcápsulas demonstraram que a expressão dessa propriedade está relacionada à composição do material e às possíveis interações entre os diversos componentes das amostras;
- ✓ Os resultados de MIC e MID do óleo de orégano microencapsulado demonstraram que sua atividade antimicrobiana não foi prejudicada pelo processo de microencapsulamento.

## CAPÍTULO 5

### **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROFIBRAS DE CELULOSE PARA PRODUÇÃO DE BIOCMPÓSITOS DE AMIDO-CELULOSE POR TAPE-CASTING**

#### **5.1. Introdução**

Problemas ambientais relacionados à geração de lixo e poluição, associados à necessidade de criação de mercado para materiais naturais renováveis, incentivaram a pesquisa sobre a produção de biopolímeros (Guilbert, Gontard e Gorris, 1996; Fakhouri *et al.*, 2007). Essa prática permite agregar valor a matérias primas de baixo custo e cria alternativas ao uso de polímeros de origem petroquímica (Avérous, Fringant e Moro, 2001; Larotonda *et al.*, 2004).

A utilização de amido para a produção de filmes biodegradáveis tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas (Dufresne e Vignon, 1998; Avérous, Fringant e Moro, 2001; Vicentini, 2003; Müller, Yamashita e Laurindo, 2008; Souza *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2015). Juntamente com a celulose, o amido constitui uma das mais abundantes fontes de carboidratos disponível. De baixo custo, alta disponibilidade e origem renovável, o amido de mandioca tem sido muito utilizado na elaboração de filmes biodegradáveis (Kechichian *et al.*, 2010; Müller, Yamashita e Laurindo, 2008; Souza *et al.*, 2013; Müller, Laurindo e Yamashita, 2009; Moraes *et al.*, 2013). A iniciativa cria uma alternativa econômica para a mandiocultura brasileira, ao mesmo tempo em que contribui para a redução dos impactos ambientais causados pelas embalagens derivadas de petróleo (Larotonda *et al.*, 2004).

Filmes de amido apresentam limitações, quando comparados aos materiais sintéticos. Dada sua natureza hidrofílica, esses materiais apresentam alta permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas inferiores (Müller, Yamashita e Laurindo, 2009; Müller, Laurindo e Yamashita, 2011). No geral, sua produção está condicionada à adição de plastificantes e/ou à mistura com outros polímeros, como as fibras naturais (Larotonda *et al.*, 2004; Krochta e Mulder-Johnston, 1997; Müller, Yamashita e Laurindo, 2009). Os plastificantes contribuem para a melhoria das características mecânicas da película, pela redução das forças intermoleculares do polímero e aumento da mobilidade das cadeias (Mali, 2002; Müller *et al.*, 2008). As fibras

naturais promovem reforço mecânico e aumentam a resistência à água dos filmes de amido (Dufresne e Vingnon, 1998; Müller, Laurindo e Yamashita, 2009; Moraes *et al.*, 2013). O desenvolvimento de biocompósitos, por meio da incorporação de fibras naturais à matriz do biopolímero, é uma alternativa para a superação dessas deficiências (Müller *et al.*, 2009; Müller, Laurindo e Yamashita, 2011).

As propriedades dos biocompósitos dependem das características das fibras e da matriz polimérica e da interação entre ambos (Silva *et al.*, 2009). O baixo custo, associado ao potencial de reciclagem das fibras celulósicas naturais, tem resultado na sua utilização na elaboração de compósitos. A substituição das fibras sintéticas já é realidade nos setores industriais automotivo, de embalagem e de produção de móveis (Alemdar e Sain, 2008).

A celulose é o biopolímero mais abundante no mundo, amplamente utilizado devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade e sustentabilidade. Quimicamente, a celulose é um polímero linear de cadeia longa, composto de anéis de D-glicose, unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Suas cadeias são organizadas em microfibrilas compactas, estabilizadas por meio de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. As microfibrilas são compostas de regiões altamente ordenadas, rígidas e inflexíveis (cristalinas), que se alternam com regiões desordenadas e flexíveis (amorfas) (Klemm *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011).

Fibrilas de celulose em micro e nano escalas podem apresentar propriedades diferentes das fibras em tamanho original (Wang e Cheng, 2009). Essas diferenças são resultado da quebra da estrutura da celulose em micro/nanofibras individualizadas, de cristalinidade elevada e material amorfo reduzido (Eichhorn *et al.*, 2010). Os métodos utilizados para a produção de micro/nanofibras se dividem em tratamentos mecânicos, químicos e enzimáticos. Os resultados desses tratamentos são materiais com características diferentes, segundo a matéria-prima, pré-tratamento e processo de desintegração utilizados (Chen *et al.*, 2011).

As microfibras de celulose também podem ser produzidas pelo uso associado de hidrólise ácida e tratamento mecânico. A hidrólise ácida é capaz de remover as regiões amorfas das fibras (Cheng, Wang e Rials, 2009). A desorganização natural dessas porções favorece o acesso e a hidrólise das cadeias (Silva e D'Almeida, 2009). As características das fibras obtidas são resultado de variáveis como o tempo e a temperatura de hidrólise, concentração da solução ácida e relação

ácido/matéria-prima (Araki *et al.*, 1998; Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008).

O tratamento mecânico de alta intensidade com ultrassom produz uma forte oscilação da pressão local, devido à cavitação. A cavitação é um fenômeno físico de formação, expansão e implosão de microbolhas em solução aquosa. O colapso violento das bolhas induz ondas de choque sobre as superfícies das fibras, causando erosão das superfícies ao longo da direção axial. O impacto rompe as interfaces e promove a desintegração das fibras (Wang e Cheng, 2009; Tischer *et al.*, 2010; Zhao, Feng e Gao, 2007).

A produção de filmes de amido pela técnica de *casting* é muito comum. No entanto, essa técnica apresenta limitações, uma vez que não permite a preparação de filmes de grandes dimensões e demanda longos tempos de secagem. A técnica de *tape-casting*, por sua vez, é considerada um método de *scale up* de filmes biodegradáveis, alternativo ao método de *casting*. Nesse processo, a suspensão filmogênica é moldada sobre um suporte, como consequência do movimento relativo entre um dispositivo para espalhamento (*doctor blade*) e o suporte (Moraes *et al.*, 2013, Moraes *et al.*, 2014).

Diante do exposto, os objetivos do presente estudo foram produzir e caracterizar microfibras de celulose para aplicação na produção de biocompósitos de amido-celulose por *tape-casting*.

## 5.2. Materiais e métodos

### 5.2.1 Matéria-prima

As fibras de celulose branqueadas de eucalipto foram cedidas pela empresa Cenibra S/A (Celulose Nipo-Brasileira S/A - MG). A madeira de eucalipto é composta de 34-48 % de celulose, 20-25 % de hemicelulose e 20-29 % de lignina, dentre outros (Castro, 2009). O pré-tratamento das fibras foi realizado na empresa, pelo método sulfato (*Kraft*). Esse processo promove a digestão das fibras em meio alcalino, sob alta pressão e temperatura, para solubilização da hemicelulose e separação da lignina.

Para elaboração dos biocompósitos, foram utilizados amido de mandioca (17 a 20 % de amilose e 80 a 83 % de amilopectina) (Companhia Lorenz - Indaial - SC); microfibras de celulose de eucalipto e plastificante glicerol (Vetec Química Fina - RJ).

## 5.2.2 Tratamentos para a produção de microfibras de celulose

O processo de separação das fibras de celulose é organizado em três etapas, geralmente: (1) tratamento químico ou enzimático, para separação da hemicelulose e lignina; (2) hidrólise ácida ou enzimática, para rompimento da estrutura das fibras; e (3) desintegração mecânica, para separação das partículas (Newman e Staiger, 2008). A etapa (1) deste processo foi realizada na empresa doadora do material.

A polpa de celulose seca, compactada e disposta em folhas (Figura 5.1) foi rasgada e triturada em Moinho Multi-Useo (TE 631-2 Tecnal-SP). A polpa moída (Figura 5.2) foi submetida aos tratamentos apresentados na Tabela 5.1. Os tratamentos de hidrólise ácida e tratamento mecânico em ultrassom de alta intensidade foram aplicados separadamente e de forma associada. A seleção dos ácidos e as condições das hidrólises ácidas (tempo, temperatura, concentração da solução ácida) com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e ácido clorídrico (HCl) foram determinadas com base nos trabalhos de Molina (2013) e Nasri-Nasrabadi, Behzad e Bagheri (2014), respectivamente.

**Figura 5.1:** Polpa de celulose compacta



**Figura 5.2:** Polpa de celulose seca moída



**Tabela 5.1:** Tratamentos para produção de microfibras de celulose

Tratamento	*Fibras (%)	Hidrólise (min)	Ultrassom (min)
$H_2O$	0,1	-	30/ 60/ 90/120
$H_2SO_4$ 0,1 M	0,1	90	30/60/90
HCl 2 M	0,1	30	30/60
		60/90/120	30
	0,2	30/60/90	30
		30/60/90	30
0,5	30/60/90	30	
	30/60	-	

\* Concentração de fibras em suspensão aquosa

A hidrólise ácida foi realizada em banho termostatzado (Tecnal TE-184 - SP) a 80 °C, sob agitação constante de 300 - 325 rpm (Agitador IKA-RW 20 - China). O tratamento mecânico foi realizado em equipamento de ultrassom (Sonics VC505 - Sonics and Materials, Inc., USA), de 500 W de potência, frequência de 20 Hz, equipado com uma ponteira cilíndrica de titânio de 1,3 cm de diâmetro. Os tempos de tratamento aplicados estão apresentados na Tabela 5.1.

As fibras tratadas foram centrifugadas (Centrífuga Q222T204) a 3900 rpm por 1 minuto e lavadas repetidamente com água destilada até pH > 5. As fibras lavadas foram secas em estufa com circulação de ar (Tecnal TE-394/2 - SP) a 60 °C, moídas e armazenadas em frascos de vidro, à temperatura ambiente, até o uso.

A necessidade de produção das microfibras de celulose foi determinada pelo resultado dos testes preliminares de dispersão das fibras em tamanho original numa suspensão filmogênica de amido. Os filmes resultantes apresentaram fibras mal dispersas e aglomeradas. As microfibras de celulose foram incorporadas à matriz filmogênica de amido no intuito de suprir as deficiências mecânicas e de barreira à água desses materiais.

### 5.2.3 Elaboração da suspensão filmogênica

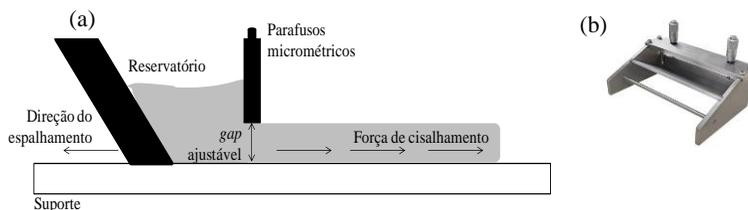
As suspensões filmogênicas foram preparadas mediante o aquecimento e agitação de uma mistura de amido e glicerol e/ou amido/glicerol/microfibras de celulose em banho termostático (Microprocessador com Circulador Q214M2 - Quimis - SP), a  $69 \pm 1$  °C (temperatura de gelatinização do amido de mandioca), e agitador mecânico (Agitador Digital IKA RW 20 - China). As formulações estudadas variaram quanto à concentração de amido (3, 4 e 5 g/100 mL de suspensão); concentração do plastificante glicerol (15, 20, 25 e 30 g de glicerol/100 g de amido); e concentração de microfibras de celulose (0, 2, 4, 6, 20 e 25 g de microfibras de celulose/100 g de amido).

### 5.2.4 Produção de filmes por *tape-casting*:

Os filmes de amido foram produzidos pelo processo de *tape-casting*, em equipamento desenvolvido no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI - EQA - UFSC), por Moraes *et al.* (2013). O equipamento é composto de um suporte de alumínio (80 cm x 40 cm), dotado de aberturas laterais que permitem a circulação de água no seu

interior e recoberto por uma película de poliéster (Mylar, Douglas-Hanson, Hammond, WI, EUA) (Figura 5.3-a). O suporte de alumínio foi aquecido com água circulante a 50 °C, proveniente de um banho termostático. O espalhamento da suspensão foi realizado com a ajuda de um dispositivo (*Doctor-blade*) (BYK, China) (30 cm de largura), composto de um reservatório e lâmina com abertura (mm) controlada por parafusos micrométricos (Figura 5.3-b) e movimentado por um motor acoplado ao equipamento. As velocidades de espalhamento testadas foram de 105 e 265 cm/min e aberturas de lâminas de 1, 2 e 3 mm. Os experimentos foram realizados em atmosfera com umidade relativa (UR) variando de 55 % a 60 % e temperaturas entre 20 °C e 25 °C. A secagem dos filmes foi realizada sobre o suporte. Após a secagem, os filmes foram acondicionados em câmaras de umidades relativas de 58, 75 e 90 % (em razão da aplicação do produto final em pães de forma, caracterizados pela alta  $a_w$ ), à temperatura ambiente, por 96 horas. Todos os ensaios de caracterização foram realizados após o condicionamento das amostras.

**Figura 5.3:** Equipamento de *tape-casting* (a) e dispositivo *Doctor Blade* (b).



(Fonte: Moraes *et al.*, 2013).

## 5.2.5 Caracterização das microfibras de celulose e filmes de amido

### 5.2.5.1 Distribuição de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho das fibras de celulose foi avaliada por difração a laser, em Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), acoplado a uma unidade de dispersão Hydro SM (Malvern Instruments, Reino Unido). Os tamanhos das partículas ( $\mu\text{m}$ ) foram relacionados ao diâmetro de uma esfera de volume equivalente. Os

tamanhos característicos de partícula determinados  $d_m$ ,  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  ( $\mu\text{m}$ ) correspondem, respectivamente, aos tamanhos médio e situados em 10, 50 e 90 % da curva de distribuição acumulada. As medidas foram realizadas em duplicata, com média de 10 leituras por amostra, e os resultados apresentados como valores médios das leituras.

### 5.2.5.2 Potencial zeta ( $\zeta$ )

O potencial zeta ( $\zeta$ ) das fibras de celulose foi determinado em equipamento dispersor de luz *Zetasizer* nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), através da medida da magnitude relativa da mobilidade eletroforética das partículas (mV). Os experimentos foram realizados em duplicata, com média de 3 leituras por amostra, e os resultados apresentados como valores médios das leituras.

### 5.2.5.3 Microestrutura

A microestrutura das fibras de celulose foi avaliada por microscopia ótica, em microscópio ótico (Leica DM4000M), acoplado a uma câmera (DC300). As microfibras de celulose e os filmes de amido também foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6390LV.

### 5.2.5.4 Difração de raios X (DRX)

A cristalinidade das microfibras de celulose e dos filmes de amido foi avaliada por difração de raios X, em difratômetro Philips X-Pert Pro MPD (Panalytical, Netherland), utilizando-se radiação de  $\text{Cu-K}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), voltagem de 40 kV e corrente de 45 mA. As análises foram realizadas no intervalo entre  $2\theta = 2^\circ$  e  $2\theta = 60^\circ$ . O índice de cristalinidade das amostras foi determinado pelo método de Segal *et al.* (1959), conforme a Equação 5.1:

$$X_{\text{CR}} (\%) = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100 \quad \text{Equação 5.1}$$

na qual  $I_{002}$  = intensidade máxima de difração em  $2\theta \approx 22\text{-}23^\circ$ , atribuída às regiões cristalinas da amostra e;  $I_{\text{am}}$  = intensidade mínima em  $2\theta \approx 18\text{-}19^\circ$ , atribuída às regiões não cristalinas.

### **5.2.5.5 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros FTIR das fibras de celulose e filmes de amido foram determinados em espectrofotômetro Agilent (modelo Cary 600 Series FTIR Spectrometer). Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

### **5.2.5.6 Umidade**

A umidade dos filmes de amido foi determinada em Analisador de Umidade Smart Turbo (CEM Corporation – USA), segundo os métodos oficiais da A.O.A.C. (*Association of Official Agricultural Chemists*) (1995).

### **5.2.5.7 Espessura**

A espessura dos filmes de amido foi determinada em micrômetro digital (Digimatic MDC-Lite, Japão) (resolução 0,001 mm). As medidas foram realizadas em pontos aleatórios das amostras.

### **5.2.5.8 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por ensaios de tração em texturômetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems, England), com base no método D882-02 (ASTM, 2002). Os filmes foram recortados em corpos de prova de 100 mm x 25 mm e acoplados em garras a uma distância inicial de 80 mm e velocidade de deslocamento de 0,8 mm/s. Os parâmetros determinados foram: tensão de ruptura ( $\sigma_{rup}$ ), alongamento na ruptura ( $\epsilon$ ) e módulo de Young (Y). A análise dos dados foi realizada com a ajuda do programa *Texture Expert Exceed 2.61* (Stable Micro Systems, England).

### **5.2.5.9 Propriedades de barreira à água**

#### **5.2.5.9.1 Isotermas de sorção de umidade**

As isotermas de sorção de umidade dos filmes de amido foram determinadas pelo método gravimétrico estático. Inicialmente, os filmes foram mantidos em dessecador com pentóxido de fósforo por 20 dias, à

temperatura ambiente. Posteriormente, amostras de filme de peso conhecido foram acondicionadas em recipientes herméticos com diferentes condições de umidade relativa, promovidas pelo uso de soluções salinas saturadas (Tabela 5.2). Os recipientes foram colocados em estufa do tipo B.O.D., à temperatura de 25 °C. As amostras foram pesadas periodicamente até o equilíbrio e as umidades determinadas em estufa a 105 °C.

**Tabela 5.2:** Atividade de água de soluções salinas saturadas.

Solução salina saturada	Atividade de água
Cloreto de lítio	0,116
Acetato de potássio	0,227
Cloreto de magnésio	0,327
Carbonato de Potássio	0,438
Nitrato de magnésio	0,529
Nitrato de sódio	0,645
Cloreto de sódio	0,753
Cloreto de potássio	0,843
Cloreto de bário	0,903

Os dados experimentais foram representados matematicamente pelo modelo de GAB (Guggenheim - Anderson - de Boer), segundo a Equação 5.2:

$$X_{eq} = \frac{kCX_0a_w}{(1-ka_w) - (1-ka_w + Cka_w)} \quad \text{Equação 5.2}$$

na qual  $X_{eq}$  é o conteúdo de umidade de equilíbrio (g de água/g de massa seca) na atividade de água  $a_w$ ,  $k$  é a constante de GAB, relacionada ao calor de sorção na multicamada,  $C$  é a constante de Guggenheim, que representa o calor de adsorção da monocamada e  $X_0$  é o teor de umidade da monocamada. Os parâmetros foram estimados ajustando-se o modelo matemático aos dados experimentais por regressão não-linear com o *software* MATLAB (R2011a).

### 5.2.5.9.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de amido foi avaliada com base no método padrão E96-80 (ASTM, 1989). Após o

condicionamento dos filmes, amostras de espessura conhecida foram recortadas em discos com área de permeação de 0,0030 m<sup>2</sup> e adaptadas à abertura circular de cápsulas metálicas de difusão, contendo cloreto de cálcio anidro (CaCl<sub>2</sub>). O conjunto (cápsula + filme) foi mantido em uma câmara a 25 °C, contendo uma solução saturada de cloreto de sódio (UR = 75 %). As cápsulas foram pesadas periodicamente e a PVA dos filmes calculada pela Equação 5.3:

$$PVA = \frac{W.L}{A.\rho_S(a_{w1}-a_{w2})} \quad (\text{g/h.m.Pa}) \quad \text{Equação. 5.3}$$

na qual  $W$  é a taxa de permeação (g/h),  $L$  é a espessura do filme (m),  $A$  é a área de permeação (m<sup>2</sup>),  $\rho_s$  é a pressão de saturação do vapor de água a 25 °C (Pa) e  $a_{w1}$  e  $a_{w2}$  são as atividades de água no exterior e interior da cápsula. A taxa de permeação ( $W$ ) é calculada por regressão linear a partir das curvas de ganho de massa *versus* tempo.

### 5.2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey de comparação múltipla, com nível de confiança de 95 %, utilizando-se o *software Estatística 8* (Statsoft, Inc., USA).

## 5.3. Resultados e discussão

### 5.3.1 Tratamentos para a produção de microfibras de celulose

As microfibras de celulose foram produzidas conforme os tratamentos dispostos na Tabela 5.1 (item 2.2). O melhor tratamento para a obtenção dessas microfibras, utilizadas na produção dos biocompósitos de amido-celulose, foi selecionado conforme os resultados apresentados nos itens 3.3.1 e 3.3.2, a seguir, sobre a distribuição de tamanho e potencial *zeta* das partículas, respectivamente.

### 5.3.2 Elaboração de suspensão filmogênica e produção de filmes por *tape-casting*

A formulação mais adequada para a preparação dos filmes de amido por *tape-casting* foi selecionada conforme os resultados da

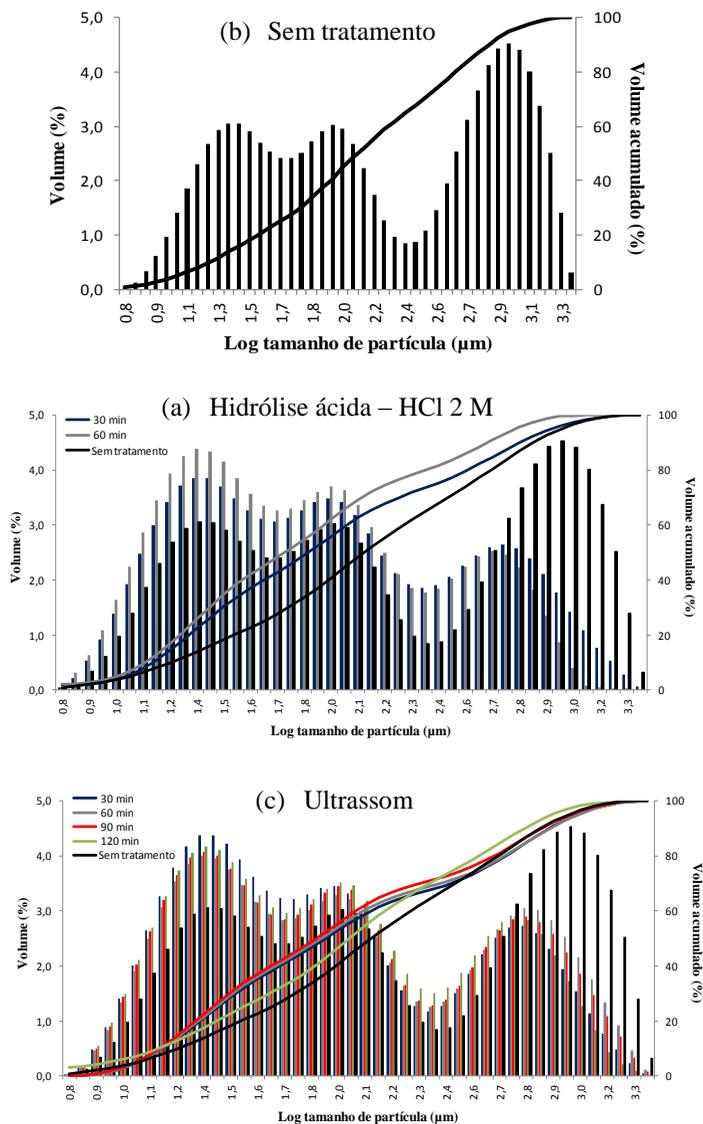
análise das amostras de filmes após o processo de secagem e condicionamento. Foram observados aspectos de continuidade (ausência de fissuras), manuseabilidade (com base na facilidade de retirada do filme do suporte) e uniformidade. As formulações contendo 3 e 4 g de amido/100 mL de suspensão resultaram em uma suspensão de menor viscosidade, difícil de ser espalhada e um filme frágil, quebradiço e pouco espesso. Esses resultados levaram à seleção da concentração de 5 g de amido/100 mL de suspensão. Em relação ao teor de glicerol, filmes preparados com concentrações de 15 g de glicerol/100 g de amido resultaram em um material quebradiço, ao passo que os filmes contendo 30 g de glicerol/100 g de amido resultaram difíceis de manusear, frágeis, muito úmidos, especialmente após o condicionamento. Esses resultados levaram à seleção da concentração de 25 g de glicerol/100 g de amido para a elaboração dos filmes. Para a determinação da concentração de microfibras de celulose adequada aos propósitos do estudo, amostras de filmes com diferentes concentrações de microfibras foram submetidas às análises de propriedades mecânicas e de barreira à água. Os resultados levaram à seleção da concentração de 25 g de microfibras/100 g de amido. As condições de processo e condicionamento selecionadas foram as seguintes: abertura da lâmina em 3 mm (a fim de garantir filmes com espessura  $\geq 100 \mu\text{m}$ ), velocidade de espalhamento de 105 cm/min e umidade relativa de condicionamento de 75 %, adequada ao propósito final de aplicação dos filmes.

### **5.3.3 Caracterização das microfibras de celulose e filmes de amido**

#### **5.3.3.1 Distribuição de tamanho de partícula**

A importância do conhecimento do tamanho e da distribuição de tamanho das partículas está associada às operações de produção de sistemas particulados em geral. A resistência mecânica, densidade, propriedades térmicas, elétricas e a microestrutura dos materiais particulados dependem diretamente da distribuição de tamanho das partículas que compõem esses materiais (Jillavenkatesa *et al.*, 2001). A Figura 5.4 apresenta as curvas de distribuição de tamanho das fibras de celulose não tratadas e das fibras submetidas aos tratamentos ácido e mecânico, separadamente.

**Figura 5.4:** Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de fibras de celulose sem tratamento (a); tratadas por hidrólise ácida em HCl 2 M (b); e tratamento mecânico em ultrassom (c).



A análise da Figura 5.4 demonstra que os tratamentos ácido e mecânico são capazes de reduzir o tamanho original das fibras (sem tratamento), especialmente daquelas de maiores comprimentos ( $\mu\text{m}$ ), mesmo quando aplicados em separado. Esse resultado é efeito da difusão do ácido até o interior das microfibrilas durante o processo de hidrólise (Mariano, 2013) e da desintegração/separação promovida pelo uso do tratamento mecânico em ultrassom.

A grande variação nos tamanhos está possivelmente associada à variedade nas dimensões dos domínios cristalinos da fibra (Mariano, 2013), à estrutura de múltiplas camadas e às ligações de hidrogênio interfibrilares das fibras de celulose (Cheng, Wang e Rials, 2009).

As Tabelas 5.3 e 5.4 apresentam, respectivamente, os tamanhos de partícula  $d_m$ ,  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  ( $\mu\text{m}$ ), relativos aos tratamentos ácido e em ultrassom.

**Tabela 5.3:** Tamanhos ( $\mu\text{m}$ ) das fibras de celulose sem tratamento e submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M.

Tempo hid	$d_m$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )
0	410,9 $\pm$ 84,4 <sup>a</sup>	17,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	139,5 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>	1148,3 $\pm$ 109,6 <sup>a</sup>
30	214,3 $\pm$ 39,5 <sup>b</sup>	14,7 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	71,2 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	615,2 $\pm$ 26,6 <sup>b</sup>
60	149,1 $\pm$ 7,0 <sup>c</sup>	13,9 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	58,9 $\pm$ 2,7 <sup>c</sup>	461,6 $\pm$ 13,4 <sup>c</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.4:** Tamanhos ( $\mu\text{m}$ ) das fibras de celulose sem tratamento e submetidas ao tratamento mecânico em ultrassom (US).

Tempo US	$d_m$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )
0	410,9 $\pm$ 84,4 <sup>a</sup>	17,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	139,5 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>	1148,3 $\pm$ 109,6 <sup>a</sup>
30	262,3 $\pm$ 28,3 <sup>b</sup>	15,2 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>	80,6 $\pm$ 6,3 <sup>c</sup>	790,4 $\pm$ 36,4 <sup>b</sup>
60	258,4 $\pm$ 31,5 <sup>bc</sup>	14,9 $\pm$ 0,2 <sup>cd</sup>	76,6 $\pm$ 4,2 <sup>c</sup>	788,2 $\pm$ 29,6 <sup>b</sup>
90	237,0 $\pm$ 21,1 <sup>bc</sup>	14,6 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>	72,7 $\pm$ 5,0 <sup>c</sup>	740,3 $\pm$ 31,0 <sup>bc</sup>
120	220,5 $\pm$ 28,5 <sup>c</sup>	16,4 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	110,4 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>	655,0 $\pm$ 47,7 <sup>c</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

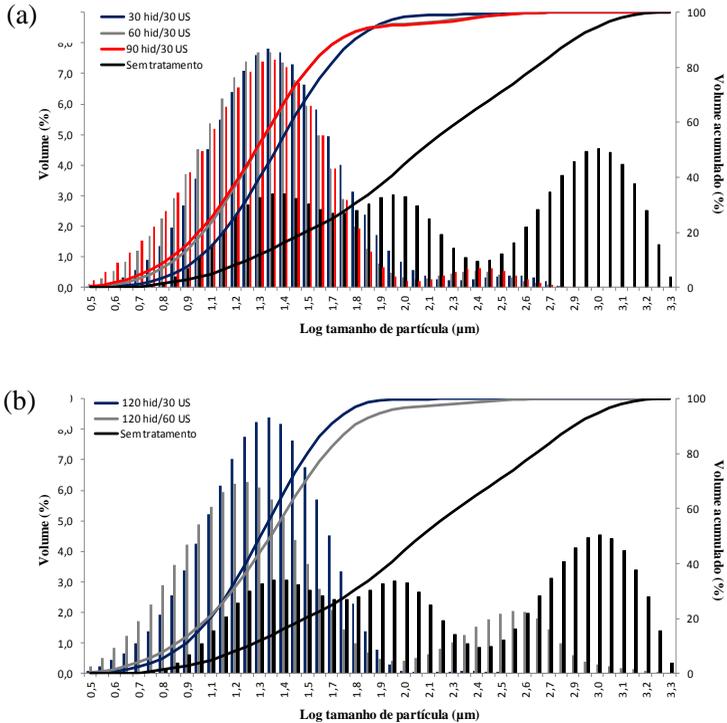
A análise das Tabelas 5.3 e 5.4 sugere que os tempos de tratamento exercem efeito positivo na redução do tamanho das fibras de celulose. O aumento do tempo de hidrólise ácida (Tabela 5.2) resultou

em diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho das fibras. O tempo de reação é um dos parâmetros mais importantes a se considerar na hidrólise ácida de polpa de celulose de madeira. Um tempo longo de reação promove a digestão completa da celulose, enquanto que uma reação muito curta resulta em fibras longas, mal dispersas e agregadas (Beck-Candanedo, Roman e Gray, 2005). Além do tempo de reação, o tipo de ácido empregado na hidrólise interfere nos resultados do tratamento. Um ácido forte pode efetivamente quebrar a celulose amorfa e liberar cristais na suspensão (Hubbe *et al.*, 2008).

Em se tratando do ultrassom, os tempos de tratamento variando entre 30 e 90 minutos resultaram em pouca ou nenhuma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho das fibras. Longos períodos de ultrassom (120 minutos) exerceram menor efeito na redução do tamanho das fibras de menores comprimentos ( $d < d_{50}$ ) ( $\mu\text{m}$ ), comparado aos tratamentos de menor período de duração ( $\leq 90$  minutos). Os resultados de  $d_m$  indicam que não há necessidade de longos tempos de ultrassom ( $> 30$  min), uma vez que o aumento do tempo de tratamento resultou em pouca ou nenhuma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho médio das microfibras. Os resultados sugerem que o tempo não é fator determinante no processo de ultrassom. Nesses casos, a redução do tamanho das fibras depende mais da intensidade e da frequência da onda do que exatamente do tempo de tratamento. Em seu trabalho para obtenção de nanofibras de madeira de álamo, Chen *et al.* (2011) observaram uma melhora substancial na dispersão das suspensões com o aumento da potência de ultrassom. O resultado foi o aumento no grau de fibrilação, enfraquecimento das ligações de hidrogênio e aumento da área superficial das fibras de celulose. Quanto maior a potência utilizada, mais energia é transferida para a suspensão e maior é a microfibrilação da celulose (Camargo, 2010).

No intuito de avaliar o efeito dos tratamentos ácido e mecânico, quando aplicados de maneira associada, os experimentos seguintes foram realizados pela combinação dos dois métodos. A Figura 5.5 apresenta as curvas de distribuição de tamanho das fibras não tratadas e tratadas por hidrólise ácida em HCl 2 M e ultrassom associados. As Tabelas 5.5 e 5.6 apresentam os tamanhos característicos  $d_m$ ,  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  correspondentes.

**Figura 5.5:** Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de fibras de celulose em suspensão a 0,1 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e ultrassom (US).



**Tabela 5.5:** Tamanhos ( $\mu\text{m}$ ) das fibras de celulose em suspensão a 0,1 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e tratamento mecânico (US) (a).

Tempo hid (min)	Tempo US (min)	$d_m$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )
30	30	$32,3 \pm 5,1^a$	$9,8 \pm 0,3^a$	$24,5 \pm 1,4^a$	$58,9 \pm 4,0^a$
60	30	$31,6 \pm 7,1^a$	$7,8 \pm 0,5^b$	$19,9 \pm 1,5^b$	$49,0 \pm 4,0^b$
90	30	$32,1 \pm 7,7^a$	$7,2 \pm 0,6^c$	$19,6 \pm 2,2^b$	$49,1 \pm 2,7^b$

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.6:** Tamanhos ( $\mu\text{m}$ ) das fibras de celulose em suspensão a 0,1 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e tratamento mecânico (US) (b).

<b>Tempo hid (min)</b>	<b>Tempo US (min)</b>	<b><math>d_m</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>d_{10}</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>d_{50}</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>d_{90}</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
120	30	$24,0 \pm 0,3^b$	$8,4 \pm 0,2^a$	$20,8 \pm 0,8^b$	$45,1 \pm 1,4^b$
120	60	$33,3 \pm 0,7^a$	$7,5 \pm 0,4^b$	$23,0 \pm 2,2^a$	$58,2 \pm 2,1^a$

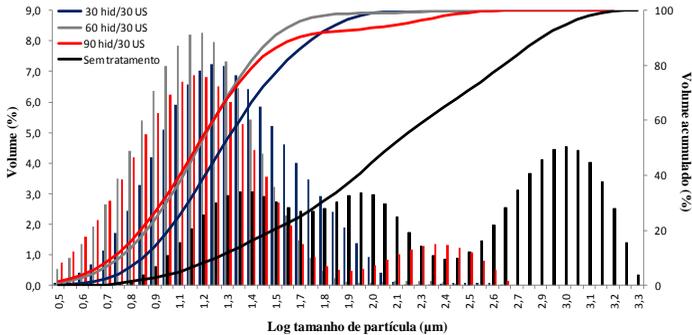
\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

O uso de tempos crescentes de hidrólise, em tempo fixo de ultrassom (30 minutos) (Tabela 5.5), resultou em diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho das fibras. Em condições de tempo fixo de hidrólise (120 minutos) (Tabela 5.6), no entanto, o aumento do tempo de tratamento em ultrassom teve menor efeito na redução do tamanho das fibras de maiores comprimentos ( $d > d_{10}$ ) ( $\mu\text{m}$ ). Os resultados das tabelas sugerem que os tratamentos ácido e mecânico mais curtos - 30 minutos de hidrólise e 30 minutos de ultrassom - são suficientes para produzir microfibras de tamanho bem reduzido ( $d_{90} = 59 \mu\text{m}$ ).

De acordo com Newman e Staiger (2008), os tratamentos ácido e mecânico têm funções diferentes. A hidrólise ácida é utilizada para romper a estrutura das fibras, enquanto que o ultrassom é utilizado para separação das partículas.

Com base nos resultados das Tabelas 5.5 e 5.6, o tempo de tratamento em ultrassom para os experimentos seguintes foi fixado em 30 minutos. No intuito de aumentar o rendimento do processo, os tratamentos foram aplicados a suspensões aquosas de fibras a 0,2 e 0,5 %, conforme disposto nas Figuras 5.6 e 5.7, respectivamente. As Tabelas 5.7 e 5.8 apresentam, respectivamente, os tamanhos característicos  $d_m$ ,  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$ .

**Figura 5.6:** Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de fibras de celulose em suspensão a 0,2 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e ultrassom (US).



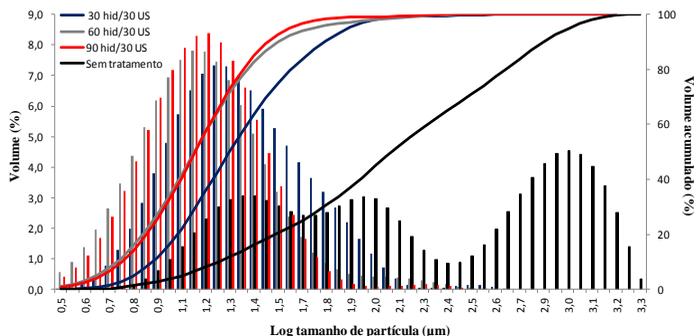
**Tabela 5.7:** Tamanhos ( $\mu\text{m}$ ) das fibras de celulose em suspensão a 0,2 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e tratamento mecânico.

Tempo hid (min)	$d_m$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )
30	$35,1 \pm 2,1^a$	$10,6 \pm 0,5^a$	$25,9 \pm 0,6^a$	$70,7 \pm 1,4^a$
60	$25,1 \pm 4,7^b$	$7,8 \pm 0,3^b$	$19,1 \pm 0,8^b$	$44,1 \pm 1,4^c$
90	$38,8 \pm 10,3^a$	$6,9 \pm 0,5^c$	$17,9 \pm 1,3^c$	$49,7 \pm 5,3^b$

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Figura 5.6 e Tabela 5.7 indicam que o aumento do tempo de hidrólise, em tempo fixo de ultrassom (30 minutos), resultou em diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho das microfibras de celulose. O aumento da concentração da suspensão não comprometeu a eficiência de redução do tamanho original das fibras, nas condições do tratamento. Com base nesses resultados, o mesmo tratamento foi aplicado a uma suspensão mais concentrada (0,5 % fibras), com o objetivo de avaliar a capacidade do tratamento de aumentar o rendimento, sem comprometer a eficiência do processo.

**Figura 5.7:** Distribuição volumétrica (%) de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) de fibras de celulose em suspensão a 0,5 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e ultrassom (US).



**Tabela 5.8:** Tamanhos ( $\mu\text{m}$ ) das fibras de celulose em suspensão a 0,5 % (p/v) submetidas à hidrólise ácida (hid) em HCl 2 M e 30 min de tratamento mecânico (US).

Tempo hid (min)	$d_m$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )
30	$38,2 \pm 1,3^a$	$11,0 \pm 0,4^a$	$26,3 \pm 0,5^a$	$77,8 \pm 1,2^a$
60	$26,1 \pm 1,5^b$	$7,2 \pm 0,0^c$	$17,5 \pm 0,2^b$	$45,9 \pm 1,3^b$
90	$23,2 \pm 1,7^c$	$7,7 \pm 0,0^b$	$17,7 \pm 0,1^b$	$40,6 \pm 0,5^c$

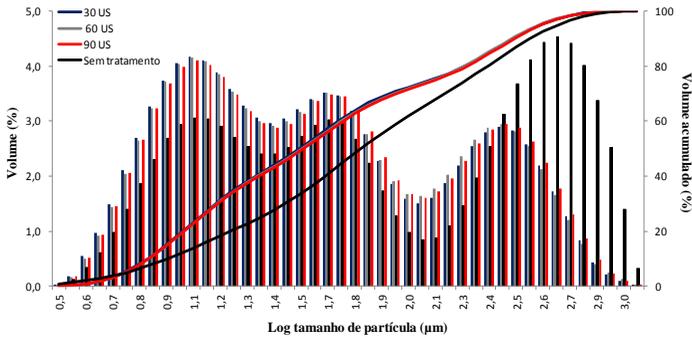
\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Figura 5.7 e Tabela 5.8 indicam que o aumento do tempo de hidrólise ácida, em tempo fixo de ultrassom (30 minutos), resultou em diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho das fibras. O aumento da concentração da suspensão não comprometeu a eficiência de redução do tamanho das fibras, nas condições do tratamento e permitiu o aumento do rendimento de processo.

Em paralelo aos tratamentos com ácido clorídrico (HCl), foram realizados tratamentos com solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 0,1 M, menos concentrada, a fim de promover um tratamento ácido menos agressivo e dispendioso. De acordo com Silva e D'Almeida (2009), o ácido empregado na hidrólise pode afetar as características da dispersão em sistema aquoso.

A Figura 5.8 apresenta as curvas de distribuição de tamanho das fibras de celulose sem tratamento e tratadas por hidrólise ácida em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M e ultrassom. A Tabela 5.9 apresenta os tamanhos  $d_m$ ,  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  correspondentes.

**Figura 5.8:** Distribuição volumétrica (%) do tamanho ( $\mu\text{m}$ ) das fibras de celulose submetidas a 90 minutos de hidrólise ácida em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M e ultrassom (US).



**Tabela 5.9:** Tamanhos ( $\mu\text{m}$ ) das fibras de celulose sem tratamento e submetidas a 90 minutos de hidrólise ácida em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M e ultrassom (US).

Tempo US (min)	$d_m(\mu\text{m})$	$d_{10}(\mu\text{m})$	$d_{50}(\mu\text{m})$	$d_{90}(\mu\text{m})$
0	$410,9 \pm 84,4^a$	$17,2 \pm 0,5^a$	$139,5 \pm 36,3^a$	$1148,3 \pm 109,6^a$
30	$198,4 \pm 15,9^b$	$14,4 \pm 0,2^b$	$67,9 \pm 3,3^b$	$605,8 \pm 26,3^b$
60	$198,8 \pm 24,9^b$	$14,5 \pm 0,4^b$	$69,6 \pm 4,0^b$	$589,6 \pm 33,4^b$
90	$203,4 \pm 16,1^b$	$14,5 \pm 0,3^b$	$71,2 \pm 4,1^b$	$620,4 \pm 30,8^b$

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados demonstram que o uso associado de hidrólise ácida em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M e ultrassom teve efeito positivo na redução do tamanho original das fibras. No entanto, o uso de tempos crescentes de tratamento em ultrassom não resultou em diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho das fibras. Tempos mais longos de tratamento mecânico (90 minutos) tiveram menor impacto na redução de tamanho

das fibras de celulose, comparado aos tempos de tratamento mais curtos (30 e 60 minutos).

Esses resultados também demonstram que a hidrólise ácida em solução de HCl 2 M foi mais eficiente na redução do tamanho original das fibras de celulose do que a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M. De acordo com os resultados da análise de distribuição de tamanho de partícula, o melhor tratamento para a redução do tamanho original das fibras de celulose à escala micrométrica é composto por hidrólise ácida de uma suspensão de fibras a 0,5 % (p/v) em HCl 2 M, durante 60 minutos, associado ao tratamento em ultrassom durante 30 minutos. Esse tratamento resultou em um tamanho médio de fibras reduzido ( $d_m = 26,1 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ).

### 5.3.3.2 Potencial *zeta* ( $\zeta$ )

A Tabela 5.10 apresenta os resultados de potencial *zeta* das suspensões de fibras de celulose submetidas à hidrólise ácida e tratamento mecânico em ultrassom. De acordo com Lieberman, Reiger e Banker (1989), um valor absoluto de potencial *zeta* maior do que 25 mV é indicativo de sistemas estáveis. Um valor abaixo disso indica que as partículas tendem a se aglomerar muito facilmente.

O valor absoluto do potencial *zeta* das fibras de celulose não tratadas ( $5,3 \pm 0,1$  mV) resultou bem inferior ao considerado de uma suspensão estável. Os tratamentos com ultrassom produziram suspensões de valores absolutos de potencial *zeta* maiores do que 25 mV. A hidrólise ácida em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M, ao contrário, não produziu suspensões estáveis, segundo o valor do potencial *zeta* das suspensões ( $\leq 25$  mV). Os resultados da análise de distribuição do tamanho de partícula e potencial *zeta* das suspensões tratadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M indicam a possibilidade de formação de uma carga superficial baixa, resultante de uma hidrólise incompleta. Uma superfície suficientemente carregada é resultado da esterificação de grupos hidroxilo por íons sulfato (Favier, Chanzy e Cavaille, 1995; Dong, Revol e Gray, 1998).

Os valores de potencial *zeta* das suspensões tratadas com HCl 2 M são indicativos de estabilidade. Segundo Araki *et al.* (1998), o uso de ácido clorídrico gera suspensões instáveis, com partículas que tendem a sofrer aglomeração por ausência de carga superficial. No entanto, os resultados demonstram que é possível produzir suspensões estáveis com HCl, nas condições do tratamento utilizadas neste estudo.

**Tabela 5.10:** Potencial *zeta* das suspensões aquosas de microfibras de celulose.

Tratamento	*Fibras (%)	Hidrólise (min)	Ultrassom (min)	Potencial <i>zeta</i> ( $\zeta$ ) (mV)
H <sub>2</sub> O	0,5	-	-	-5,3 ± 0,1
	0,5	-	30	-32,1 ± 0,2
			60	-31,7 ± 0,1
			90	-32,3 ± 1,1
			120	-28,8 ± 1,3
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M	0,1	90	30	-13,8 ± 0,7
			60	-15,9 ± 1,0
			90	-18,8 ± 1,2
HCl 2 M	0,1	30	30	-30,9 ± 1,3
		60		-29,2 ± 0,4
		90		-27,7 ± 0,6
		120		-33,5 ± 0,3
	0,2	30	30	-28,1 ± 1,1
		60		-29,0 ± 0,3
		90		-30,9 ± 0,9
	0,5	30	30	-18,9 ± 0,3
		60		-30,8 ± 0,6
		90		-27,5 ± 0,2
		30		-21,7 ± 0,5
	60	-	-15,1 ± 1,1	

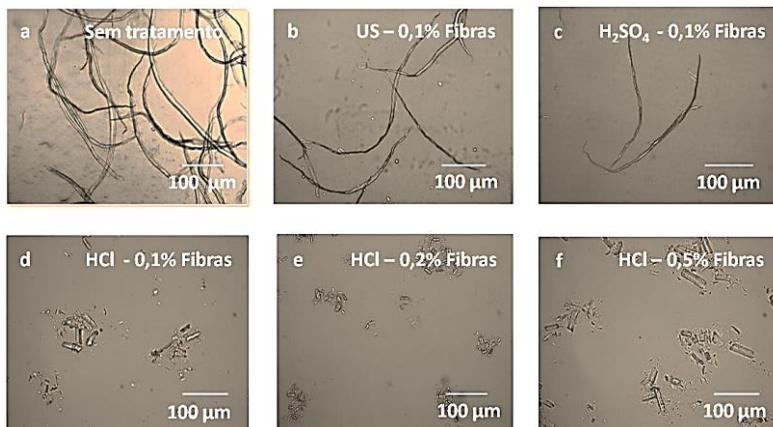
\* Concentração de fibras em suspensão aquosa

O tratamento ideal para a produção das microfibras de celulose foi determinado segundo os resultados das análises de distribuição de tamanho de partícula e potencial *zeta*. Segundo esses resultados, o tratamento ideal é composto de hidrólise ácida em solução de HCl 2 M de uma suspensão de fibras 0,5 %, durante 60 minutos, associada ao tratamento mecânico em ultrassom durante 30 minutos.

### 5.3.3.3 Microestrutura

Os resultados das análises de microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) das fibras de celulose estão apresentados nas Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente.

**Figura 5.9:** Efeito dos tratamentos sobre a morfologia e o tamanho das fibras de celulose: (a) fibras de celulose sem tratamento; (b) tratamento com ultrassom (US); (c) 90 minutos hidrólise ácida em  $H_2SO_4$  0,1 M e 30 minutos US; (d), (e) e (f) 60 minutos hidrólise ácida em HCl 2 M e 30 minutos US.

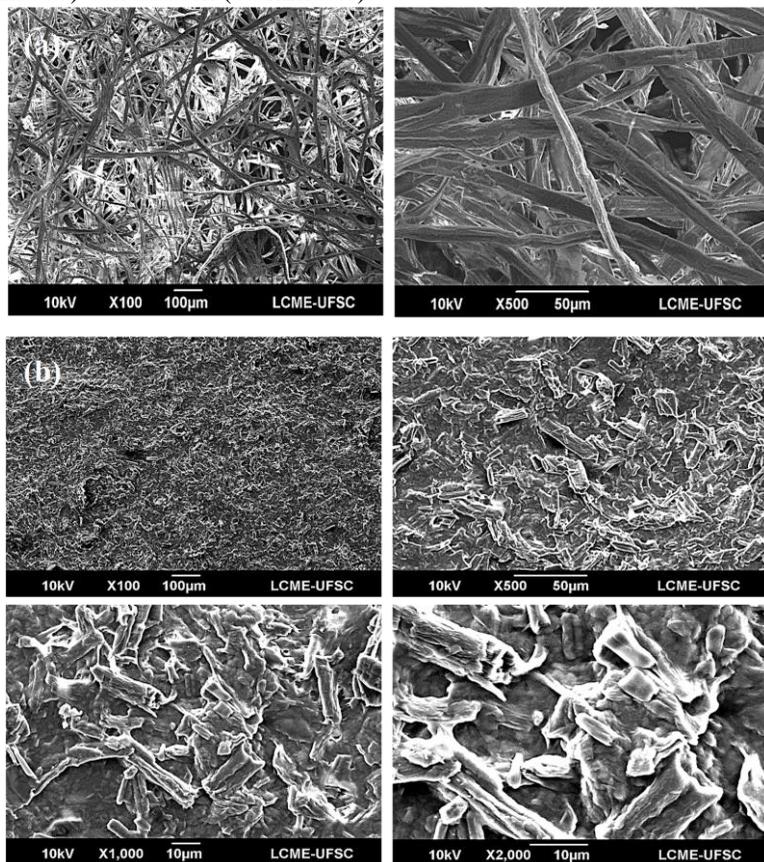


Os tratamentos representados em (b) e (c) resultaram em microfibras de maiores comprimentos ( $\mu m$ ), comparadas àquelas obtidas pelo tratamento ácido com solução de HCl 2 M, representados em (d), (e) e (f). As microfibras resultantes desses tratamentos têm formato cilíndrico, semelhante ao formato das fibras originais/sem tratamento, representadas em (a). Os tratamentos com solução de HCl 2 M resultaram em fibras de menores comprimentos ( $\mu m$ ), em formato de hastes. Os aglomerados comumente observados devem-se à grande área superficial e fortes interações de hidrogênio presentes nestes sistemas (Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008).

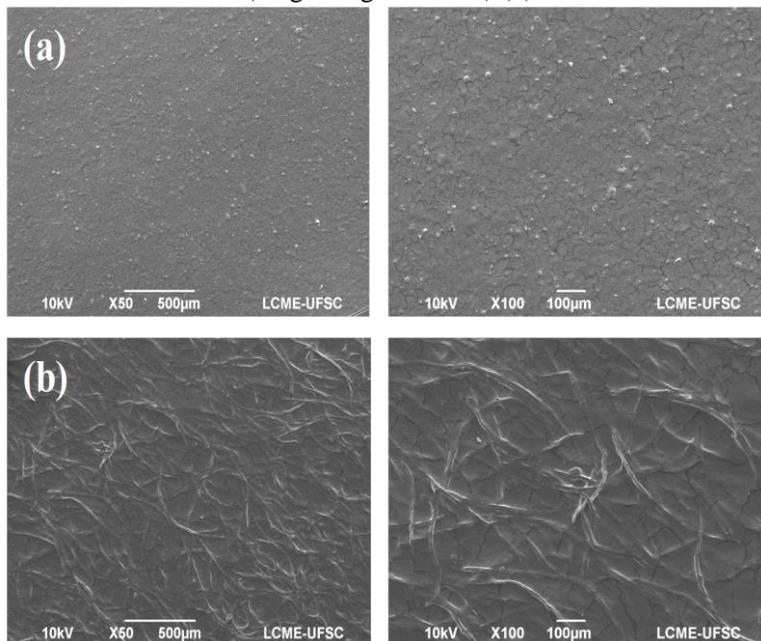
A Figura 5.10 confirma as alterações estruturais e de superfície das fibras de celulose, resultantes dos tratamentos ácido e mecânico. A Figura 5.11 apresenta os resultados de microscopia eletrônica de

varredura dos filmes de amido sem fibras e dos filmes adicionados de microfibras de celulose.

**Figura 5.10:** Microscopia eletrônica de varredura: (a) fibras sem tratamento; (b) fibras submetidas à hidrólise ácida em HCl 2 M (60 minutos) e ultrassom (30 minutos).



**Figura 5.11:** Microscopias eletrônicas de varredura das superfícies de filmes de amido sem fibras (a); e de filmes de amido adicionados de microfibras de celulose (25 g/100 g de amido) (b).



As micrografias correspondentes às películas sem a adição de fibras, apresentadas em (a), demonstram uma matriz homogênea e contínua. As micrografias apresentadas em (b), representadas pelos filmes de amido adicionados de microfibras de celulose, demonstram uma distribuição homogênea e aleatória das microfibras na amostra, bem cimentadas à matriz de amido, indicando compatibilidade do material. Segundo Avérous, Fringant e Moro (2001), isso é devido às fortes interações entre as fibras de celulose e a matriz de amido. Müller, Laurindo e Yamashita (2009) e Moraes, Müller e Laurindo (2012) também observaram essas características em filmes de amido de mandioca adicionados de fibras de celulose.

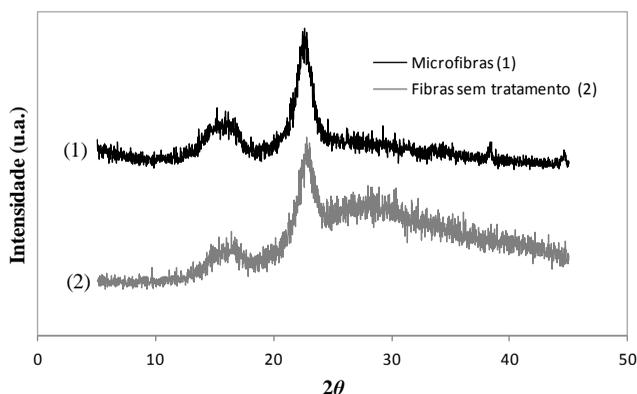
À medida que o tamanho das partículas diminui, a área superficial aumenta, proporcionando uma ligação interfacial mais eficiente (Lewis e Nielsen, 1970). A utilização de fibras de celulose em microescala pode ter contribuído para uma interação maior e mais eficiente com a matriz filmogênica de amido. Além disso, misturas de

partículas com diferentes tamanhos promovem um empacotamento mais denso, uma vez que as partículas pequenas podem preencher o espaço intersticial entre as partículas grandes estreitamente empacotadas, para formar um aglomerado (Ahmed e Jones, 1990).

### 5.3.3.4 Difração de raios X (DRX)

A Figura 5.12 apresenta os resultados das análises de difração de raios-X (DRX) das fibras sem tratamento e microfibras de celulose.

**Figura 5.12:** Difratoogramas das fibras sem tratamento e microfibras de celulose.



Os difratogramas das fibras (Figura 5.12) são característicos de celulose tipo I, onde o halo amorfo e o pico cristalino ficam situados entre os ângulos  $18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$  e  $22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$ , respectivamente (Lengowski *et al.*, 2013). De acordo com Morán *et al.* (2008), a ausência de um dublete (pico duplo) em  $2\theta = 22^\circ$  também é indicativo de estrutura cristalina de celulose tipo I. Os resultados indicam que a estrutura cristalina da celulose não foi alterada durante os tratamentos químico e mecânico.

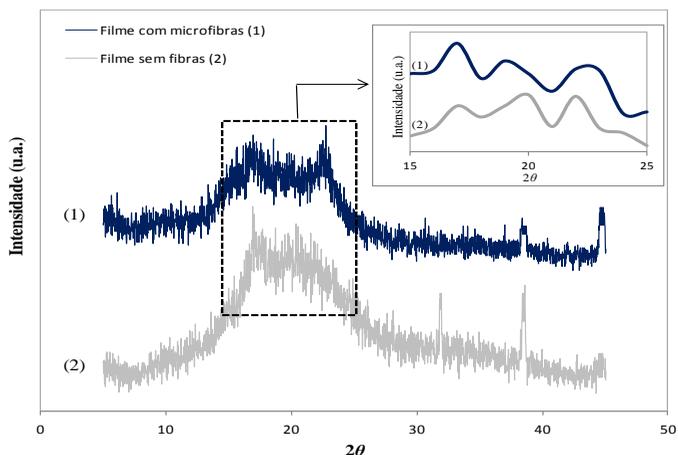
A determinação da cristalinidade de amostras celulósicas é limitada pela dificuldade na separação das partes amorfa e cristalina. Os cristais de celulose são muito pequenos, da ordem de 20 -50 Å de diâmetro, por conseguinte, a separação das partes não é trivial (Thygesen *et al.*, 2005). Em qualquer reação química, a acessibilidade das moléculas de celulose é determinante para o processo de

desestruturação. A maioria dos reagentes penetra somente as regiões amorfas e a superfície dos cristalitos, deixando as regiões intracristalinas intactas (Ciolacu, Ciolacu e Popa, 2011).

Quaisquer tratamentos químicos e/ou mecânicos afetam a cristalinidade das fibras celulósicas. O pico de difração mais nítido, em torno de  $2\theta = 22^\circ$ , é uma indicação do grau de cristalinidade mais elevado das fibras tratadas. O aumento do número de regiões de cristalinidade aumenta a rigidez da celulose e a resistência à tração das fibras (Alemdar e Sain 2008).

A Figura 5.13 apresenta os difratogramas dos filmes de amido sem fibras e adicionados de microfibras de celulose (6 g microfibras/100 g amido).

**Figura 5.13:** Difratogramas dos filmes de amido sem fibras e adicionados de microfibras de celulose (6 g microfibras/100 g amido).



A análise dos difratogramas dos filmes de amido (Figura 5.13), especialmente do detalhe, aponta três picos compreendidos em  $2\theta = 15^\circ$  e  $2\theta = 25^\circ$ , mais precisamente em  $2\theta \sim 17^\circ$ ,  $19^\circ$  e  $22^\circ$ . Segundo Famá, Goyanes e Gerschenson (2007), esse padrão de raios-X corresponde a uma estrutura do tipo B-V. Em geral, os amidos de tubérculos apresentam uma estrutura cristalina do tipo B. A introdução de agentes complexantes em preparações de amido perturba as conformações em dupla hélice, através da formação de uma cadeia simples com hélices em

conformação do tipo V. Segundo Dufresne e Vignon (1998), o pico em torno de  $16-17^\circ$  deve-se à orientação das fibras e cristalização da amilose. O pico em torno de  $2\theta = 22^\circ$  é típico da cristalinidade da celulose (Ma, Yu e Kennedy, 2005; Müller *et al.* 2009, Moraes *et al.* 2012).

As Tabelas 5.10 e 5.11 apresentam os respectivos índices de cristalinidade das amostras de fibras de celulose e filmes de amido.

**Tabela 5.11:** Índice de cristalinidade ( $X_{CR}$  %) de fibras e microfibras de celulose.

Amostra	$X_{CR}$ (%)
Fibras sem tratamento	69,6
Microfibras (tratadas)	78,8

**Tabela 5.12:** Índice de cristalinidade ( $X_{CR}$  %) de filmes de amido.

Amostra	$X_{CR}$ (%)
Filme sem fibras	28,8
Filme com microfibras	32,7

Segundo a Tabela 5.11 e de acordo com o método de Segal *et al.* (1959), o índice de cristalinidade das fibras não tratadas resultou em 69,6 %. O tratamento das fibras por hidrólise em solução de ácido clorídrico pouco concentrada (HCl 2 M) e ultrassom resultou no aumento do índice da cristalinidade do material para 78,8 %. Morán *et al.* (2008) estudaram a extração e preparação de nanocelulose de fibras de sisal e observaram índices de cristalinidade de cerca de 75 % para a celulose comercial e a celulose tratada por hidrólise ácida, cloração, extração alcalina e branqueamento. A avaliação foi realizada pelo mesmo método.

Lengowski *et al.* (2013) submeteu folhas secas de celulose *Kraft* branqueada de *Eucalyptus* spp. à hidrólise ácida em solução concentrada de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), variando a concentração ácida, os tempos e as temperaturas de hidrólise. Os índices de cristalinidade obtidos variaram entre 78,6 % e 89,7 %, mas houve formação de celulose tipo II para alguns tratamentos. A possível causa foi a alta concentração do ácido sulfúrico (64 % v/v), associado às condições do processo, que ocasionaram a degradação das regiões amorfa e cristalina das amostras e promoveram alterações nas ligações na cadeia da

celulose. No presente estudo, utilizou-se uma solução ácida pouco concentrada (HCl 2 M) e condições de processo mais amenas, que promoveram o aumento da cristalinidade da celulose, comparado à celulose original (não tratada), mas, e principalmente, garantiram a manutenção da estrutura original da celulose (tipo I). As reações com menores temperatura e concentração ácida são mais apropriadas para obtenção de um produto final mais homogêneo e de maior rendimento (Lengowski *et al.*, 2013).

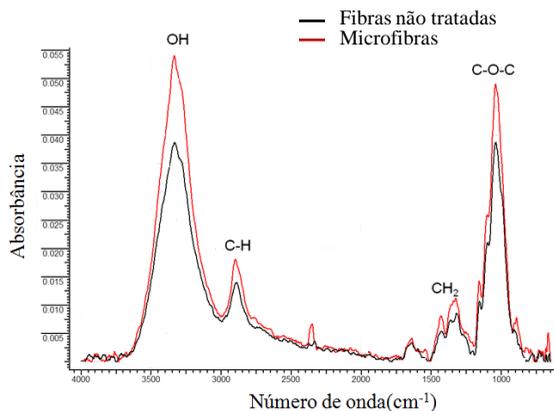
O índice de cristalinidade dos filmes de amido (Tabela 5.12) resultou em 28,8 % para os filmes de amido sem fibras e 32,7 % para os filmes adicionados de microfibras de celulose. Esses resultados se assemelham aos resultados de Famá *et al.* (2005), que encontraram uma cristalinidade de 35,9 % em películas de amido de mandioca e glicerol. Os resultados da Tabela 5.12 demonstram que a adição das microfibras de celulose à suspensão filmogênica contribuiu para o aumento da cristalinidade das películas, mas vale salientar que esse pequeno aumento se deve, possivelmente, à baixa concentração de microfibras de celulose na amostra. Ma, Yu e Kennedy (2005), em seu trabalho sobre compósitos de amido reforçados com fibras naturais, mostraram que o pico atribuído à cristalinidade de celulose ( $2\theta = 22^\circ$ ) aumentou nas amostras de filmes segundo o teor de fibra. Esses resultados corroboram com os resultados apresentados na Figura 5.13.

### **5.3.3.5 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A Figura 5.14 apresenta os espectros FTIR das fibras não tratadas e das microfibras de celulose produzidas por tratamento ácido em HCl 2 M, durante 60 minutos, associado ao tratamento mecânico em ultrassom por 30 minutos.

A Figura 5.14 apresenta perfis típicos de fibras de celulose. O modelo tradicional de celulose considera que as cadeias contêm regiões cristalinas (organizadas) e amorfas (menos organizadas) (Liu, 2013). O espectro correspondente às fibras não tratadas apresentou, no geral, uma redução na intensidade de absorvância das bandas, comparado ao espectro das microfibras devido, provavelmente, à presença de uma proporção maior de regiões amorfas na amostra de fibras não tratadas.

**Figura 5.14:** Espectros FTIR das fibras não tratadas e microfibras de celulose produzidas por hidrólise ácida (HCl 2 M) e ultrassom.



Na região compreendida entre os números de onda 3600 e 3100  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à distensão da vibração dos grupos hidroxilo, pode-se obter informações acerca dos enlaces de hidrogênio, tanto intra como intermoleculares. As alterações na estrutura cristalina da celulose promovem uma diminuição do número de enlaces de hidrogênio. A celulose não tratada apresentou menor intensidade e menor número de onda (3326,6  $\text{cm}^{-1}$ ) nessa região do que as microfibras tratadas (3332,7  $\text{cm}^{-1}$ ), sugerindo uma maior quantidade de celulose amorfa nas fibras não tratadas. Já a vibração do grupamento C-H, relacionada à banda em torno de número de onda 2900  $\text{cm}^{-1}$ , sugere que quanto maior os números de onda, maior a proporção de regiões amorfas da celulose. Esse fato foi comprovado pelo maior número de onda da celulose não tratada nessa região (2904,24  $\text{cm}^{-1}$ ), comparada às microfibras (2894,56  $\text{cm}^{-1}$ ) (Ciolacu, Ciolacu e Popa, 2011).

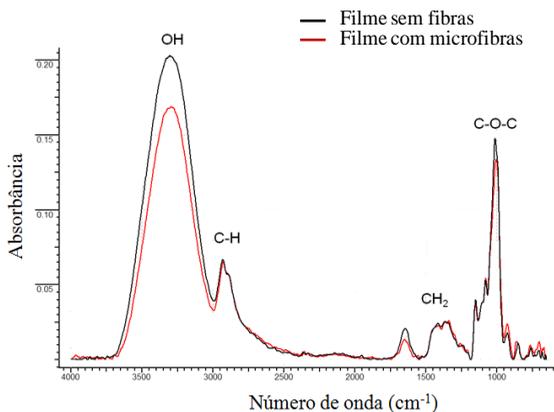
No transcurso da hidrólise, as áreas amorfas são as mais afetadas, geralmente. Tanto na banda em torno 1430  $\text{cm}^{-1}$  (vibração pela flexão do  $\text{CH}_2$  simétrico), quanto em 898  $\text{cm}^{-1}$  (alongamento dos grupos C-O-C nos enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glicosídicos), pode-se observar menores bandas de absorção nas fibras não tratadas, indicando, uma vez mais, uma proporção maior de regiões amorfas nessa amostra. A banda de absorção em 898  $\text{cm}^{-1}$  é chamada de banda amorfa e apresentou número de onda

maior para as fibras não tratadas ( $900,6 \text{ cm}^{-1}$ ), comparado às microfibras ( $898,6 \text{ cm}^{-1}$ ).

O índice de cristalinidade (IC) descreve a quantidade relativa de material cristalino na celulose. Os índices empíricos ( $A_{1420}/A_{893}$ ) e total ( $A_{1375}/A_{2900}$ ) são os mais comumente utilizados para o cálculo da cristalinidade relativa da celulose, segundo Fan, Dan e Huang (2012). Ambos os índices resultaram maiores nas microfibras (0,75 e 0,61 respectivamente) do que nas fibras originais (não tratadas) (0,73 e 0,54 respectivamente), confirmando o aumento da cristalinidade da celulose após a hidrólise ácida.

A Figura 5.15 apresenta os espectros FTIR dos filmes de amido-glicerol e amido-glicerol-microfibras de celulose.

**Figura 5.15:** Espectros FTIR de filmes de amido-glicerol e amido-glicerol-microfibras de celulose (6 g microfibras/100 g amido).



De acordo com a Figura 5.15, os espectros com banda de absorção principal entre  $3600\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ , referentes aos grupos hidroxilo livres (OH) de amido puro, são perfis típicos de filmes de amido de mandioca (Marques *et al.*, 2006). A banda em  $3300 \text{ cm}^{-1}$  representa, especificamente, a presença de ligações de hidrogênio intramoleculares, enquanto a banda em  $2930 \text{ cm}^{-1}$  refere-se às vibrações dos grupos C-H. O aumento da intensidade de absorção nesta região pode estar relacionado a uma proporção mais elevada de ligações covalentes do amido puro. A banda na região de  $1645 \text{ cm}^{-1}$  está relacionada com a quantidade da água ligada ao filme (Kacurakova e Mathlouthi, 1996).

Esta apresentou-se maior no filme com microfibras, devido ao seu maior índice de cristalinidade, refletido pelo maior número de onda ( $1648,82 \text{ cm}^{-1}$ ), comparado com o filme de amido sem fibras ( $1643,89 \text{ cm}^{-1}$ ). Na região entre  $1200\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ , podem ser observadas bandas relacionadas com grupos C-O e C-O-H, representantes das ligações glicosídicas e ligações diferentes às estabelecidas com o amido (Marques *et al.*, 2006). O aumento na intensidade da absorvância dos filmes adicionados de microfibras nessa região pode ter sido causado pelas interações com a celulose.

Os índices de cristalinidade empíricos ( $A_{1420}/A_{893}$ ) e total ( $A_{1375}/A_{2900}$ ) dos filmes foram calculados a fim de se avaliar o efeito da adição das microfibras na cristalinidade relativa das amostras. Ambas as relações resultaram maiores para os filmes adicionados de microfibras (1,28 e 0,35, respectivamente) do que nos filmes de amido-glicerol (1,21 e 0,34, respectivamente), confirmando o aumento da cristalinidade dos filmes de amido pela adição de microfibras de celulose.

### 5.3.3.6 Propriedades mecânicas

Os resultados de espessura e dos parâmetros do teste de tração dos filmes de amido-glicerol e amido-glicerol-microfibras de celulose estão apresentados na Tabela 5.13 e representados na Figura 5.16.

**Tabela 5.13:** Propriedades mecânicas de filmes de amido de mandioca-microfibras de celulose.

Amostra	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	$\sigma$ (MPa)	$\epsilon$ (%)	Y (MPa)
F0	$108,9 \pm 17,3^a$	$4,8 \pm 0,8^c$	$17,2 \pm 4,0^a$	$1,5 \pm 0,3^b$
F1	$129,9 \pm 38,8^a$	$14,6 \pm 1,1^b$	$12,7 \pm 2,2^{ab}$	$1,2 \pm 0,2^b$
F2	$132,6 \pm 33,8^a$	$27,1 \pm 2,8^a$	$10,8 \pm 1,6^b$	$3,8 \pm 0,8^a$

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

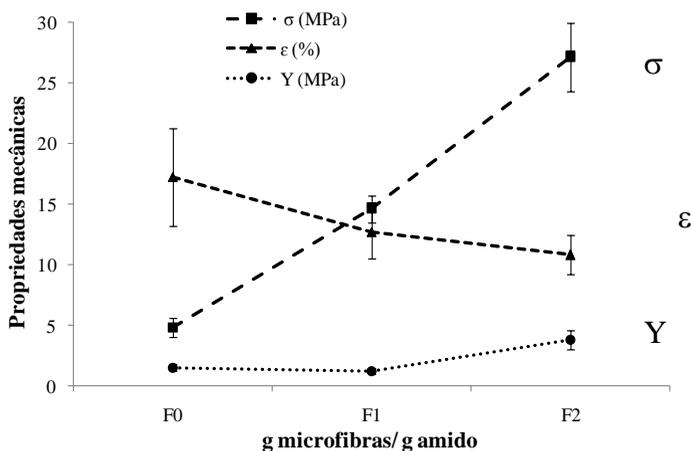
F0 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido;

F1 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 20 g fibras/100 g amido;

F2 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 25 g fibras/100 g amido.

Esses resultados demonstram um aumento na espessura, na resistência à tração ( $\sigma$ ) e no módulo de elasticidade ( $Y$ ) dos filmes, em paralelo à redução no alongamento ( $\epsilon$ ), segundo o teor de microfibras de celulose. O aumento nos valores de resistência à tração indica reforço mecânico dos filmes de amido com a adição de microfibras de celulose (Müller, Yamashita e Laurindo, 2009a, Moraes *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2013). O aumento nos valores do módulo de Young com a adição de microfibras indica aumento na rigidez dos filmes. Segundo Ma *et al.*, (2005), este fato é atribuído à semelhança entre as estruturas químicas da celulose e do amido.

**Figura 5.16:** Propriedades mecânicas de filmes de amido adicionados de microfibras de celulose.



Os resultados representados na Figura 5.16 estão de acordo com os reportados na literatura, sobre filmes de amido adicionados de diferentes tipos de fibras (Curvelo *et al.*, 2001; Lu, Weng e Cao, 2006; Müller, Yamashita e Laurindo, 2009a; Müller, Yamashita e Laurindo, 2009b).

A maioria das teorias que explicam a ação de reforço de um agente de enchimento assume uma adesão perfeita entre o material de enchimento e a matriz polimérica. O tamanho da partícula de enchimento/reforço pode afetar grandemente a resistência à ruptura dos

compósitos. Em geral, a resistência à tração aumenta com a redução no tamanho da partícula de reforço. O aumento da área interfacial permite uma ligação mais eficaz entre as partículas e a matriz. Paralelo ao tamanho das partículas, a forma de incorporação desse material à matriz também desempenha um papel importante na determinação da força do sistema (Ahmed e Jones, 1990).

O aumento associado da resistência à tração e espessura está relacionado com o processo de secagem. De acordo com Jansson e Thuvander (2004), a explicação está nas diferentes taxas de evaporação de água. Em filmes menos espessos, a água evapora rapidamente e as macromoléculas não têm tempo para se mover durante o processo de secagem. Em contrapartida, tempos de secagem mais longos, observados para filmes mais espessos, permitem que as macromoléculas se reorientem, aumentando a cristalinidade do material. No presente estudo, o aumento da concentração de microfibras resultou em filmes mais espessos e mais resistentes.

O módulo de elasticidade ou módulo de Young é uma medida da rigidez do sistema. Aumentando-se o teor de microfibras, há um aumento no valor do módulo de armazenamento, indicando se tratar de materiais mais rígidos, quando processados com maiores teores de microfibras. Esses resultados estão em concordância com os dados reportados por Müller *et al.* (2009), Moraes *et al.* (2012) e Moraes *et al.* (2013). As teorias que lidam com sistemas compostos indicam que o módulo de elasticidade resultante depende apenas da fração volumétrica do material de enchimento e não do tamanho da partícula. No entanto, em geral, o módulo de elasticidade aumenta à medida que o tamanho da partícula diminui. No presente estudo, a utilização de fibras de celulose reduzidas à microescala contribuiu para o aumento do módulo de elasticidade dos filmes.

O alongamento na ruptura diminuiu com o teor de microfibras. De acordo com Kunanopparat *et al.* (2008), a adição de fibras promove a deplasticização da matriz de amido, devido à competição pela absorção do plastificante entre a matriz de amido e as fibras.

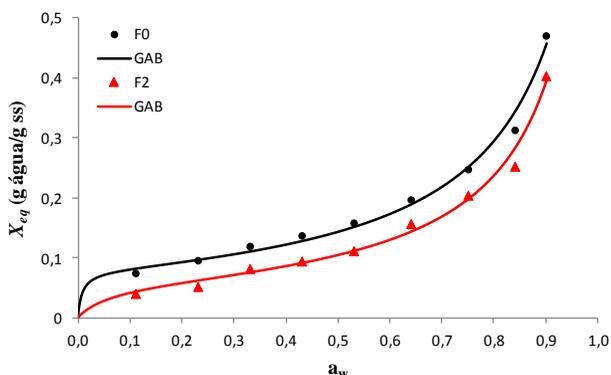
O aumento de  $\sigma$  e  $Y$  e a redução de  $\epsilon$  estão relacionados ao aumento da cristalinidade dos filmes com a adição de microfibras de celulose, como observado nos difratogramas de raios-X. As propriedades mecânicas dos filmes são afetadas pela presença de novos compostos. Este comportamento é resultado de vários fatores, tais como a cristalinidade, plastificação do polímero e interface fibra-matriz (Persico *et al.*, 2009).

### 5.3.3.7 Propriedades de barreira à água

#### 5.3.3.7.1 Isotermas de sorção de umidade

A Figura 5.17 apresenta as isotermas de sorção de umidade dos filmes de amido. A Tabela 5.14 apresenta os parâmetros do modelo GAB e os coeficientes de correlação.

**Figura 5.17:** Isotermas de sorção de umidade - Ajuste de GAB aos dados experimentais de umidade de equilíbrio *versus*  $a_w$  de filmes de amido-glicerol (F0) e filmes de amido-glicerol-microfibras de celulose (F2).



F0 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido;

F2 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 25 g fibras /100 g amido.

As isotermas de sorção de umidade resultaram em curvas do tipo sigmoidal, com comportamento característico de materiais amiláceos hidrofílicos. O modelo de GAB (Guggenheim - Anderson - de Boer) se ajustou bem aos dados experimentais ( $R^2 = 0,99$ ), em acordo com o reportado anteriormente por outros estudos (Mali *et al.*, 2005; Müller, Yamashita e Laurindo, 2009b). A inclinação da curva (*curve shoulder*) próximo à  $a_w = 0,03$  foi reduzida com a adição de microfibras de celulose nos filmes, como reportado por Müller, Yamashita e Laurindo (2009b) e Moraes *et al.* (2012), confirmando a menor higroscopicidade das fibras de celulose, em relação ao amido.

**Tabela 5.14** Parâmetros estimados do modelo de GAB ajustado aos dados experimentais de sorção de água dos filmes de amido-glicerol (F0) e filmes de amido-glicerol-microfibras de celulose (F2).

Parâmetros GAB	F0	F2
$X_0$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,0779	0,0584
$k$	0,9216	0,9476
$C$	137,18	16,52
$R^2$	0,9880	0,9872
RMSE	0,0160	0,0034

Considerando-se que a diferença entre as formulações está na presença de microfibras de celulose, pode-se afirmar que a adição desse material à suspensão filmogênica de amido promoveu a redução da umidade de equilíbrio, confirmada pela redução do teor de água na monocamada ( $X_0$ ). Esse valor indica a quantidade máxima de água que pode ser adsorvida em uma única camada por grama de filme seco e representa uma medida do número de sítios de sorção.

A adição de um agente plastificante - glicerol - provém mais sítios ativos de sorção, através da exposição dos seus grupos hidrofílicos hidroxilo, nos quais as moléculas de água podem ser adsorvidas (Mali *et al.*, 2005). Ambas as formulações contêm a mesma concentração de glicerol, de forma que a diferença nos valores de  $X_0$  é devida à presença das microfibras de celulose, menos higroscópicas do que o amido. A isoterma de sorção correspondente à formulação contendo microfibras de celulose (F2) demonstra claramente uma higroscopicidade inferior, em acordo com trabalhos relatados pela literatura (Curvelo *et al.*, 2001; Dufresne e Vignon, 1998; Müller *et al.*, 2009, Moraes *et al.*, 2012). Segundo Avérous *et al.* (2001), esse comportamento é atribuído às interações entre as fibras e os sítios hidrofílicos da cadeia de amido, em substituição às interações amido-água, predominantes em filmes sem fibras.

O valor do parâmetro  $C$ , relativo ao calor de adsorção na monocamada, apresentou uma grande variação, reduzindo drasticamente com a adição de microfibras de celulose. Por outro lado, o valor de  $k$  apresentou pequena variação com a adição de microfibras na suspensão filmogênica. Segundo Fidelis *et al.* (2015), os valores da constante de sorção na multicamada ( $k$ ) estão correlacionadas com o comportamento

isotérmico em  $a_w$  acima de 0,65. Quanto maior a absorção de água dos filmes nessa região, maiores os valores de  $k$ . Os valores dos parâmetros de GAB encontrados neste estudo estão de acordo com valores relatados na literatura, para filmes de amido (Müller, Yamashita e Laurindo, 2008).

Os resultados do estudo de Curvelo, Carvalho e Agnelli (2001), sobre a produção de um compósito de amido de milho termoplástico e fibras de celulose, demonstraram uma redução de sorção de umidade com a incorporação de fibras. Estes resultados são atribuídos ao fato de que o amido é mais hidrófilo do que a celulose, associado ao fato de que parte do plastificante é absorvido pelas fibras, resultando em uma matriz menos hidrófila. Dufresne e Vignon (1998) encontraram um resultado semelhante para a absorção de água em filmes de amido e microfibrilas de celulose. O comportamento das isotermas de sorção representadas no presente estudo se assemelha aos encontrados pelos autores acima citados.

### 5.3.3.7.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A Tabela 5.15 apresenta os valores de umidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de amido, correspondentes às formulações F0, F1 e F2.

**Tabela 5.15:** Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes de amido e microfibras de celulose.

Amostra	Umidade (%)	PVA ( $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ ) $\times 10^{-7}$
F0	$13,0 \pm 0,1^a$	$4,9 \pm 0,1^a$
F1	$10,8 \pm 0,3^b$	$3,7 \pm 0,1^b$
F2	$10,5 \pm 0,4^b$	$3,6 \pm 0,1^b$

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

F0 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido;

F1 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 20 g fibras/100 g amido;

F2 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 25 g fibras/100 g amido.

De acordo com os resultados da Tabela 5.15, a incorporação de microfibras de celulose reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a umidade dos filmes. Isso se deve à menor afinidade das fibras de celulose pela água, comparado ao amido (Curvelo *et al.*, 2001; Dufresne e Vignon, 1998; Ma *et al.*, 2005; Müller, Yamashita e Laurindo, 2009b).

O plastificante glicerol torna as cadeias poliméricas menos densas e, conseqüentemente, mais permeáveis. Além disso, o caráter higroscópico do plastificante aumenta o conteúdo de água no filme e a mobilidade das moléculas (Cuq *et al.*, 1997). No entanto, sabendo-se que o glicerol é comum às três formulações, pode-se afirmar que a diferença nos valores de PVA é devida ao conteúdo de microfibras de celulose nos filmes.

A adição de cargas em um polímero afeta o mecanismo de difusão através do material, devido às diferenças nas propriedades de permeabilidade entre a matriz e as partículas. Em polímeros semicristalinos, a difusão das moléculas ocorre através da fase amorfa, ou seja, a fração cristalina não contribui para a permeabilidade (Persico *et al.*, 2009). Dessa forma, pode-se afirmar que os filmes F1 e F2 tem menor PVA, comparados ao filme F0, devido à menor fração amorfa presente nas amostras. Além disso, o maior coeficiente de solubilidade da água nos filmes sem fibras (F0) justifica a maior PVA observada, comparado aos filmes F1 e F2 (adicionados de microfibras de celulose) (Dufresne e Vignon, 1998).

A PVA dos filmes também está relacionada à sua espessura. Os filmes mais espessos apresentaram menor PVA. Esse comportamento é explicado pela estrutura de filmes mais espessos e pelos tempos de secagem mais longos, que resultam em organizações mais densas e cristalinidades mais elevadas das moléculas de amido (Moraes *et al.*, 2015).

Além desses fatores, o conteúdo de água e as interações em filmes de amido são dependentes da umidade relativa (UR) à qual esses materiais são expostos. Müller, Yamashita e Laurindo (2009b) observaram que o aumento da UR do ar resultou em valores de PVA mais elevados para as amostras estudadas. Mali (2002) estudou a PVA de filmes de amido de inhame condicionados em umidade relativa de 2-75 % e encontrou valores de  $10^{-7}$  g / m. h. Pa, aproximadamente. Esses valores são similares aos encontrados no presente estudo para filmes de amido de mandioca.

#### 5.4. Conclusões parciais

- ✓ A associação dos tratamentos ácido e mecânico é capaz de produzir suspensões estáveis de celulose em microescala;
- ✓ A hidrólise ácida e o tratamento com ultrassom não produzem grande efeito na redução do tamanho original das fibras, quando aplicados separadamente;
- ✓ O ácido sulfúrico não foi capaz de reduzir significativamente o tamanho das fibras de celulose e/ou produzir uma suspensão estável, nas condições utilizadas nos tratamentos;
- ✓ A hidrólise ácida com ácido clorídrico promoveu a redução do tamanho das fibras de celulose em mais de 10 vezes o tamanho original e produziu suspensões estáveis;
- ✓ Os tratamentos ácido e mecânico associados promoveram o aumento da cristalinidade da celulose e dos filmes aos quais foi adicionada, mas não alteraram a estrutura/conformação original das fibras;
- ✓ Os espectros FTIR corroboram com os resultados de DRX, no que diz respeito ao aumento da cristalinidade da celulose, promovido pelos tratamentos para produção de microfibras, e dos filmes adicionados de microfibras;
- ✓ A utilização das fibras de celulose em escala micrométrica permitiu maior e melhor adesão à matriz polimérica, contribuindo para o reforço mecânico dos filmes de amido-glicerol;
- ✓ A umidade de equilíbrio dos filmes de amido foi reduzida com a adição de microfibras de celulose, devido à higroscopicidade inferior das fibras, comparada ao amido, e às interações fibras-amido;
- ✓ A PVA dos filmes de amido foi reduzida devido à redução da difusividade e coeficiente de solubilidade de água nos filmes, promovida pela adição de microfibras de celulose à matriz polimérica.

## CAPÍTULO 6

### **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES ATIVOS ANTIMICROBIANOS APLICADOS NA CONSERVAÇÃO DE PÃES**

#### **6.1 Introdução**

O uso de filmes e revestimentos comestíveis é uma alternativa complementar de preservação e manutenção da qualidade dos alimentos durante o seu armazenamento. Além disso, esses materiais são um meio viável para a incorporação de agentes antimicrobianos, antioxidantes, aromatizantes, nutrientes e corantes, que incrementam sua função protetora (Perez-Gago e Krochta, 2001).

A incorporação de conservantes naturais ao material de embalagem cria possibilidades de eliminação ou redução do uso de aditivos e representa uma vantagem em relação à aplicação direta de conservantes sintéticos para extensão da vida útil de alimentos. Dentre os aditivos de origem natural aplicados a essas embalagens, destacam-se os extratos de plantas e seus óleos essenciais (Appendini e Hotchkiss, 2002; Suppakul *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais são caracterizados pela presença de componentes muito voláteis, mesmo à temperatura ambiente. Neste caso, o processo de microencapsulamento permite a retenção e volatilização gradual desses compostos, contribuindo para um efeito prolongado da atividade de seus componentes (Teodoro *et al.*, 2014). Quando incorporados a uma matriz polimérica, os agentes antimicrobianos microencapsulados dão origem aos filmes ativos antimicrobianos.

A incorporação de compostos ativos microencapsulados em polímeros sugere uma liberação gradual do agente antimicrobiano e constitui uma vantagem sobre a imersão em solução contendo o ativo ou a pulverização desses ativos na superfície dos alimentos. Nesses processos, a atividade antimicrobiana dos ativos pode ser rapidamente reduzida, devido à inativação dos agentes ou à diluição da concentração ativa por componentes dos alimentos. Quando o agente antimicrobiano é liberado ao longo do tempo, a cinética de crescimento microbiano na superfície do produto e a atividade antimicrobiana dos agentes incorporados aos filmes podem ser equilibradas. A ideia é que a liberação do agente antimicrobiano seja mantida a uma taxa tal, de modo

que a concentração na superfície se mantenha acima da concentração mínima inibitória (Appendini e Hotchkiss, 2002).

Os fatores que influenciam a liberação dos ativos microencapsulados incluem o tipo e a geometria das partículas do núcleo e do material encapsulante, as interações entre o material encapsulante e o núcleo, a volatilidade dos compostos, a proporção entre núcleo e encapsulante e o tamanho das partículas (Azeredo, 2005). Outros fatores que afetam as taxas de liberação são o método de produção do filme e a interação química entre o agente e o polímero (Suppakul *et al.*, 2003).

Além das características das microcápsulas e do filme antimicrobiano, os componentes alimentares afetam significativamente a eficácia das substâncias antimicrobianas e a sua liberação. Associado à composição dos alimentos, as condições de armazenamento também afetam a capacidade antimicrobiana das embalagens ativas. O aumento da temperatura e/ou umidade relativa de armazenamento pode aumentar a taxa de migração dos agentes ativos na película (Quintavalla e Vicini, 2002; Suppakul *et al.*, 2003).

Os pães pertencem a uma categoria de alimentos de consumo elevado e valor agregado significativo. Sabe-se também que esses alimentos possuem vida útil reduzida, delimitada pela segurança microbiológica, razão pela qual muitos produtos são inutilizados para consumo pouco tempo após a sua produção (Gutiérrez *et al.*, 2009). Uma das alternativas para a redução das perdas por deterioração microbiana é a utilização de embalagens ativas antimicrobianas, associadas aos métodos tradicionais de conservação de pães. As embalagens ativas interagem com o produto e são capazes de reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microrganismos, prolongando a vida útil do alimento embalado (Han, 2000; Souza *et al.*, 2013).

A embalagem antimicrobiana pode desempenhar um papel importante na redução do crescimento de agentes deteriorantes e patogênicos. Importante salientar que essas embalagens devem ser consideradas como uma das etapas da ‘tecnologia de obstáculos’, capaz de retardar o crescimento microbiano e estender o prazo de validade de alimentos perecíveis (Appendini e Hotchkiss, 2002).

Diante do exposto, o objetivo principal desse estudo foi a produção de um filme ativo antimicrobiano, a partir da incorporação de óleo essencial de orégano microencapsulado numa matriz polimérica à base de amido-microfibras de celulose, e a avaliação da sua atividade antimicrobiana, quando aplicado na conservação de pães de forma.

## **6.2 Materiais e Métodos**

### **6.2.1 Matéria-prima:**

Os filmes ativos antimicrobianos foram elaborados utilizando-se amido de mandioca (17 a 20 % de amilose e 80 a 83 % de amilopectina) (Companhia Lorenz - Indaial – SC); microfibras de celulose de eucalipto, produzidas conforme disposto no Capítulo 5; plastificante glicerol (Vetec Química Fina - RJ) e microcápsulas de goma arábica contendo óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), produzidas conforme disposto no Capítulo 4.

### **6.2.2 Elaboração da suspensão filmogênica:**

As suspensões filmogênicas foram preparadas mediante o aquecimento e agitação de uma mistura de amido-glicerol-microfibras de celulose, conforme descrito no Capítulo 5 – item 2.3. De acordo com os resultados das análises das propriedades dos filmes de amido-microfibras de celulose, apresentados no Capítulo 5, a suspensão filmogênica foi elaborada obedecendo-se à seguinte formulação: 5 g de amido/100 mL de suspensão, 25 g de glicerol/100 g de amido e 25 g de microfibras/100 g de amido. Para a produção dos filmes ativos antimicrobianos, a suspensão gelatinizada foi adicionada das microcápsulas contendo óleo essencial de orégano, em concentrações variadas. A homogeneização foi realizada em agitador mecânico (Agitador Digital IKA RW 20 - China).

### **6.2.3 Produção de filmes por *tape-casting*:**

Os filmes antimicrobianos foram produzidos por *tape-casting*, em condições de processo e equipamento descritos no Capítulo 5 – item 2.4. Após a secagem, os filmes foram condicionados em câmara à umidade relativa de 75 %, à temperatura ambiente, por 96 horas. Os ensaios de caracterização foram realizados após o condicionamento das amostras.

## **6.2.4 Caracterização dos filmes:**

### **6.2.4.1 Umidade**

A umidade dos filmes foi determinada em Analisador de Umidade Smart Turbo (CEM Corporation – USA), segundo os métodos oficiais da A.O.A.C. (*Association of Official Agricultural Chemists*) (1995).

### **6.2.4.2 Espessura**

A espessura dos filmes foi determinada em micrômetro digital (Digimatic MDC-Lite, Japão) (resolução de 0,001 mm). As medidas foram realizadas em pontos aleatórios das amostras.

### **6.2.4.3 Microestrutura**

A microestrutura dos filmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em microscópio JEOL JSM 6390LV.

### **6.2.4.4 Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana dos filmes foi expressa pela dose mínima inibitória (MID), determinada pelo método de volatilização em disco, conforme descrito no Capítulo 3 - item 2.4.3. A MID foi considerada a concentração de óleo de orégano microencapsulado ( $\mu\text{L/L}$  de *headspace*) capaz de inibir visível e completamente o crescimento dos microrganismos.

Além da determinação da MID, foram avaliados os efeitos temporário/prolongado e fungistático/fungicida dos filmes antimicrobianos, conforme descrito no Capítulo 3 – item 2.4.3. As placas foram avaliadas a cada 7 dias, durante o período máximo de 21 dias.

A atividade antimicrobiana dos filmes ativos também foi avaliada pelo método de difusão em disco (antifungigrama), conforme Norma M02-A11 (NCCLS, 2012), com modificações.

#### **6.2.4.4.1 Método de difusão em disco (antifungigrama)**

O teste de difusão em disco avalia a atividade de uma substância frente a um microrganismo e relaciona o tamanho da zona de inibição do crescimento microbiano à substância ensaiada (Pinto, Kaneko e Ohara, 2003).

Inicialmente, o meio de cultivo PDA estéril, acrescido de 0,1 % de solução corante Rosa de Bengala 5 % (p/v), foi adicionado às placas de Petri estéreis. Após a solidificação do meio, a superfície do ágar foi inoculada com 100 µL da suspensão do inóculo padrão de *Aspergillus flavus* e *Penicillium commune* (preparado conforme disposto no Capítulo 3 - item 2.4.1). Discos de 2,0 cm de filmes antimicrobianos foram aplicados sobre a superfície do ágar inoculado. As concentrações testadas variaram de 0,5 a 10 g de microcápsulas/100 mL de suspensão. O controle foi realizado com filmes não adicionados de microcápsulas. As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C por 96 horas e as zonas de inibição de crescimento dos microrganismos foram medidas com o auxílio de um paquímetro.

#### **6.2.4.5 Propriedades Mecânicas**

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por ensaios de tração em texturômetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems, England), com base no método D882-02 (ASTM, 2002), conforme descrito no Capítulo 5 – item 5.2.5.8.

#### **6.2.4.6 Propriedades de barreira à água**

##### **6.2.4.6.1 Isotermas de sorção de umidade**

As isotermas de sorção de umidade dos filmes antimicrobianos foram determinadas pelo método gravimétrico estático, conforme descrito no Capítulo 5 – item 5.2.5.9.1.

##### **6.2.4.6.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)**

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi avaliada com base no método padrão E96-80 (ASTM, 1989), conforme descrito no Capítulo 5 – item 5.2.5.9.2.

### **6.2.5 Aplicação – filmes antimicrobianos e a conservação de pães**

A avaliação da capacidade dos filmes antimicrobianos de retardar o desenvolvimento fúngico em pães de forma foi realizada por análise microbiológica de contagem, baseado na metodologia proposta por López *et al.* (2013), com adaptações.

A formulação do filme antimicrobiano utilizado nessa etapa foi selecionada com base nos resultados dos ensaios microbiológicos anteriores de MID e difusão em disco: 5 g de amido de mandioca/100 mL de suspensão, 25 g de glicerol/100 g de amido, 25 g de microfibras de celulose/100 g de amido e 1,5 g de microcápsulas/100 mL de suspensão.

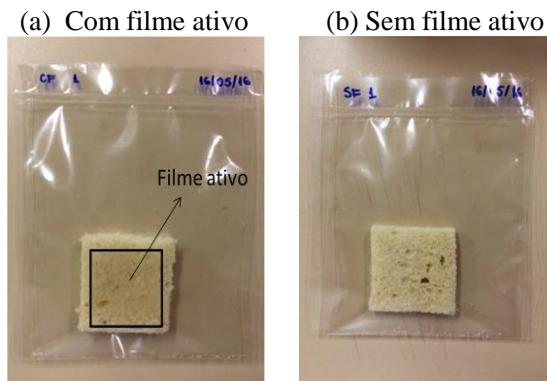
Os pães de forma foram produzidos e adquiridos na padaria do supermercado Hiper Bom, em Florianópolis – SC. Os pães foram elaborados com farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico, açúcar cristal, gordura vegetal hidrogenada, sal refinado, aromatizante artificial e melhoradores de farinha. Os pães de forma foram armazenados em temperatura ambiente. A validade dos pães é de 5 dias. O experimento teve início no último dia do prazo de validade dos pães.

As fatias de pães de forma foram cortadas em quadrados de 6 cm x 6 cm e acondicionadas, individualmente, em embalagens estéreis de 16,5 cm x 19,5 cm, de polipropileno biorientado e polietileno de baixa densidade (PPBO/PEBD), espessura de 75 µm, permeável ao vapor de água, ao oxigênio e à luz. Os filmes ativos foram cortados em quadrados de 4 cm x 4 cm e embalados em contato com os pães, conforme demonstra a Figura 6.1 (a). O controle foi realizado com pães embalados sem o filme antimicrobiano - Figura 6.1 (b). As embalagens foram seladas (Selovac, 200B) e mantidas em condições ambientes (T e UR) até o momento da análise.

A cada 7 dias, 2,5 g de pão foram homogeneizados em 40 mL de água peptonada estéril 1 %. A seguir, foram realizadas diluições com o homogeneizado, seguidas de plaqueamento por profundidade em meio de cultura PDA estéril, acrescido de 0,1 % de solução corante Rosa de Bengala 5 % (p/v). As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C por 7 dias, seguidos da contagem do número de colônias. Os resultados foram expressos em UFC/g pão. A análise das amostras, para verificação da presença de colônias visíveis a olho nu, foi realizada diariamente.

A cada repetição da análise de contagem microbiana, os pães de forma e filmes também foram caracterizados quanto ao pH,  $a_w$  e umidade (%).

**Figura 6.1:** Pães de forma embalados em contato com o filme ativo antimicrobiano (a); e na ausência do filme ativo (controle) (b).



O tempo de extensão da vida útil dos pães pelo filme antimicrobiano foi definido como o necessário para se alcançar a contagem máxima de fungos e bolores para produtos de panificação ( $5 \times 10^3$  UFC/g de amostra), estabelecido pela Portaria n° 451, do Ministério da Saúde (1997), que define critérios e padrões microbiológicos para alimentos.

### 6.2.6 Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado com o auxílio do *software* *Statistica 8* (StatSoft, EUA), por meio de Análise de variância (ANOVA) e teste Tukey de comparação de médias ( $p < 0,05$ ).

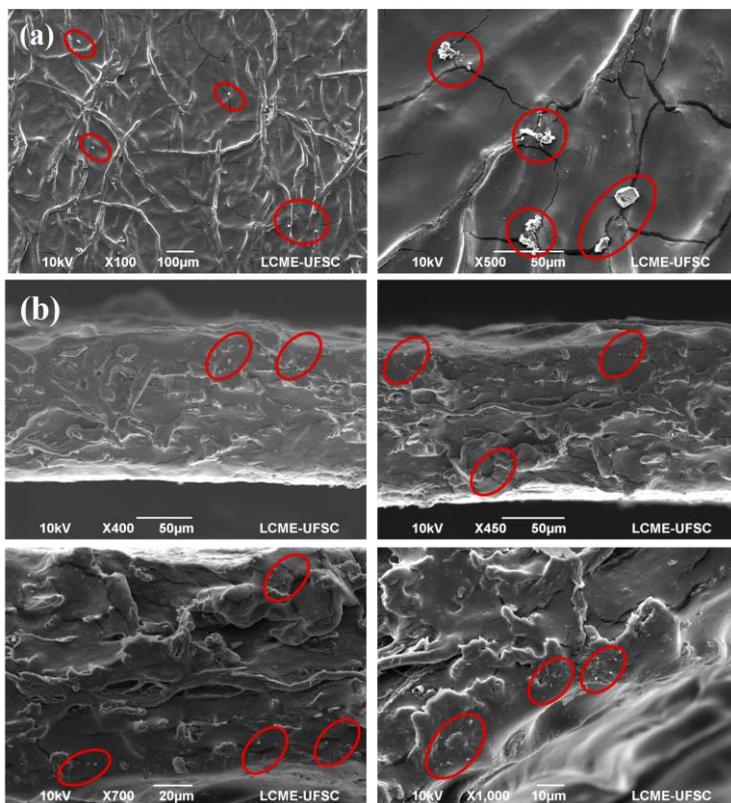
## 6.3 Resultados e Discussão

### 6.3.1 Caracterização dos filmes:

#### 6.3.1.1 Microestrutura

A Figura 6.2 apresenta os resultados da microscopia eletrônica de varredura de filmes antimicrobianos.

**Figura 6.2:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de amido-microfibras de celulose e microcápsulas de óleo essencial de orégano (a) superfície; (b) corte transversal. Linha vermelha: distribuição das microcápsulas na matriz polimérica.



A dificuldade na visualização se deve, principalmente, à diferença nas dimensões dos materiais que compõem o filme, como as microfibras de celulose e as microcápsulas, por exemplo. Além disso, a pequena concentração de microcápsulas nos filmes (1,5 g microcápsulas/100 mL suspensão) e seu o tamanho médio (0,8  $\mu\text{m}$ ) também podem ter contribuído nesse sentido.

### 6.3.1.2 Atividade antimicrobiana

#### 6.3.1.2.1 Dose mínima inibitória (MID)

Os resultados de MID dos filmes antimicrobianos estão apresentados na Tabela 6.1.

**Tabela 6.1:** MID ( $\mu\text{L/L}$ ) dos filmes antimicrobianos contra os fungos *A. flavus* e *P. commune*.

Microrganismo	MID ( $\mu\text{L/L}$ )
<i>P. commune</i>	136,8
<i>A. flavus</i>	136,8

Os resultados de MID demonstram que os filmes antimicrobianos apresentaram o mesmo efeito sobre os fungos *A. flavus* e *P. commune* - inibição de 100 % do crescimento – na concentração de 1,5 g microcápsulas/100 mL suspensão filmogênica. Esses resultados confirmam a importância de se considerar a composição da amostra em estudo e as interações entre os compostos na avaliação dos resultados, uma vez que o óleo de orégano manifestou capacidades antimicrobianas diferentes quando avaliado no seu estado puro, microencapsulado e incorporado em filmes de amido.

A manifestação da atividade antimicrobiana do óleo de orégano microencapsulado e incorporado no filme de amido-microfibras de celulose depende da capacidade das moléculas de se difundirem para a superfície das microcápsulas e, posteriormente, pela matriz do filme. Segundo Valencia-Chamorro *et al.* (2008), a eficácia na difusão de um agente antimicrobiano incorporado a um filme depende do tamanho, da forma (linear, ramificada ou cíclica) e da polaridade da molécula difusiva, da estrutura química do filme e do grau de formação de ligações cruzadas entre as moléculas. A forma das moléculas relaciona-se de maneira diferente às taxas de difusão. Os óleos essenciais são

substâncias multicomponentes. O carvacrol, composto majoritário do óleo de orégano utilizado no presente estudo, apresenta uma estrutura cíclica. Cagri, Ustunol e Ryser (2001) relataram que o uso de filmes à base de proteína de soro isolada contendo ácido sórbico (estrutura linear) resultou numa maior inibição de *Listeria monocytogenes* do que as películas contendo ácido p-aminobenzóico (estrutura cíclica).

Além do agente antimicrobiano, polímeros de diferentes constituições retêm óleos essenciais em diferentes graus. A produção de filmes ativos necessita de concentrações de óleo essencial capazes de promover a saturação do sistema pela presença de moléculas livres e não prejudicar a expressão da atividade antimicrobiana do composto (Ávila-Sosa *et al.*, 2012). No presente estudo, o composto-base (amido de mandioca) utilizado na produção dos filmes ativos pode ter interagido com os componentes do óleo de orégano e as propriedades, do ativo ou do amido, podem ter sido afetadas como resultado desta interação. Um composto ativo complexado com amido é diferente do composto no seu estado livre, no que diz respeito à solubilidade, difusividade, coeficiente de partição e capacidade de penetrar as membranas biológicas. A eficácia do composto pode ser alterada, se o mesmo está ligado a tal complexo; quando o complexo se dissocia, o composto pode, então, tornar-se disponível e promover o efeito desejado (Mansour e Guth, 1968).

Segundo Mansour e Guth (1968), a natureza da interação da matriz com os agentes antimicrobianos depende do tipo de matriz e da concentração e das características químicas do conservante. No trabalho de Royo *et al.* (2010), o óleo de sálvia adicionado a filmes de proteína do soro do leite não apresentou atividade antimicrobiana na concentração utilizada. Segundo os autores, isto se deve, provavelmente, à baixa difusividade dos compostos ativos na matriz de proteína de soro de leite. Este resultado sugere que a atividade antimicrobiana de filmes ativos é função do tipo de composto e do processo utilizado na sua produção, ou seja, um único óleo essencial pode ou não ter um efeito antimicrobiano, dependendo da matriz utilizada e da sua capacidade de liberar o composto ativo.

Cagri *et al.* (2001) relataram que filmes elaborados com proteínas promovem melhor retenção de moléculas cíclicas, como o timol, o eugenol e o carvacrol, do que filmes a base de polissacarídeos. Ponce *et al.* (2008) observaram que as interações químicas entre os grupos amino de um filme a base de caseína e os grupos carboxila podem bloquear os sítios antimicrobianos ativos. No trabalho Ávila-Sosa *et al.* (2012), a

utilização de filmes de quitosana ou amido resultou numa menor retenção dos compostos voláteis, ou seja, o aumento do número de moléculas na fase vapor, responsáveis pelo aumento da atividade antimicrobiana, ocorreu em concentrações mais baixas dos óleos de canela e orégano mexicano.

Além do composto-base, os demais componentes do filme podem interferir na atividade do composto incorporado à matriz. Algumas macromoléculas, como a celulose e seus derivados, além de serem alvos potenciais para o crescimento microbiano, também interagem em algum grau com os conservantes, reduzindo assim a disponibilidade dos mesmos para exercer atividade antimicrobiana. Esses compostos podem inibir a atividade do agente, através da interação com o conservante e redução da sua disponibilidade para as células microbianas ou por oferecer proteção física às células contra a ação do ativo (Kurup, Wan e Chan, 1995). As interações entre o amido e as microfibras de celulose com o óleo de orégano podem ter determinado o resultado de atividade antimicrobiana encontrado neste estudo. Os resultados da análise de MID justificam a necessidade de adição de maiores concentrações do composto ativo na elaboração dos filmes antimicrobianos, devido à redução da volatilidade relativa dos compostos ativos, promovida pelo microencapsulamento, e possível perda parcial de atividade do óleo de orégano, resultante das interações com os componentes do filme.

Apesar disso, a complexação de um composto ativo com o amido pode ser um método útil para retardar a liberação de um composto e, assim, reduzir a sua toxicidade (Mansour e Guth, 1968). Diante disso, e apesar do potencial citotóxico, o óleo de orégano microencapsulado e incorporado a uma matriz de amido e microfibras de celulose pode se apresentar como uma boa alternativa para a conservação de pães de forma (objetivo do estudo).

A avaliação dos efeitos temporário/prolongado e fungistático/fungicida dos filmes antimicrobianos foi realizada em filmes elaborados com a concentração de microcápsulas sugerida pelos resultados de MID. Os efeitos resultaram prolongado e fungicida ao final de 21 dias. Esse resultado depende, no geral, da concentração dos compostos ativos e do tamanho do inóculo.

### 6.3.1.2.2 Método de difusão em disco (antifungigrama)

Os resultados do antifungigrama, expressos pelo halo de inibição do crescimento de *A. flavus* e *P. commune*, promovido pelo uso de filme antimicrobiano, estão apresentados na Tabela 6.2.

A literatura não dispõe de uma medida limite de halo (mm). Dessa forma, convencionou-se que a presença ou ausência de halo de inibição representam resistência ou sensibilidade à substância testada (Nweze, Mukherjee e Ghannoum, 2010).

**Tabela 6.2:** Diâmetro (mm) do halo de inibição do crescimento de *A. flavus* e *P. commune*.

Concentração de microcápsulas (mg/mL de suspensão)	*Diâmetro (mm) halo de inibição	
	<i>A. flavus</i>	<i>P. commune</i>
15	**Ausência	**Ausência
20	15,1	6,5
30	39,0	33,0

\*Diâmetro (mm) do halo de inibição, descontado o diâmetro do disco de filme.

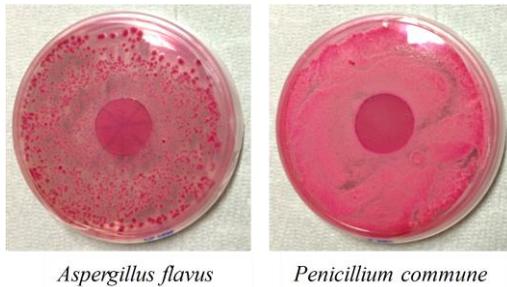
\*\*Ausência de halo = crescimento em toda a superfície da placa.

Os resultados da Tabela 6.2 sugerem que o *A. flavus* é mais sensível aos efeitos do óleo essencial de orégano microencapsulado e incorporado aos filmes de amido-microfibras de celulose do que o *P. commune*, nas concentrações testadas. Os resultados da análise demonstram que o aumento na concentração do composto antimicrobiano resultou no aumento do halo de inibição. Os fungos *A. flavus* e *P. commune* provaram-se sensíveis ao óleo de orégano microencapsulado e incorporado em filmes de amido em concentrações  $\geq 20$  mg/mL. Esse comportamento também foi observado por Botre *et al.* (2010), em seu trabalho sobre incorporação de óleo de orégano em filmes celulósicos para aplicação em pizza pronta refrigerada, em que o aumento da concentração do óleo resultou no aumento do halo de inibição do crescimento de *Penicillium spp* e *S. aureus*.

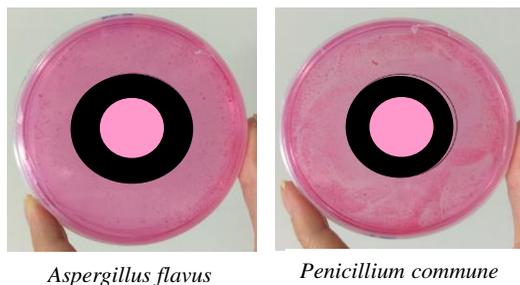
A Figura 6.3 representa os resultados do antifungigrama (Tabela 6.2).

**Figura 6.3:** Halo de inibição de crescimento de *A. flavus* e *P. commune* por filmes antimicrobianos.

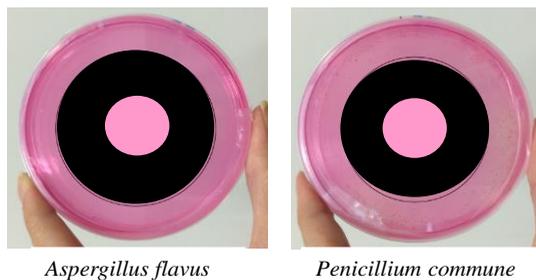
(a) 15 mg/mL – Ausência de halo de inibição



(b) 20 mg/mL – Presença de halo de inibição (em preto)



(c) 30 mg/mL - Presença de halo de inibição (em preto)



A atividade antimicrobiana determinada pela técnica de difusão em ágar é significativamente influenciada pelo tipo e tamanho do disco,

pela concentração do composto ativo, pela capacidade do ativo de se difundir no meio de cultura, pelas propriedades do meio e pelos microrganismos investigados. Nesse método, a presença de matéria particulada na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar (Rios, Recio e Villar, 1988). Segundo Cagri, Ustunol e Ryser (2001), uma interação entre os grupamentos do polímero e os componentes do agente incorporado pode reduzir ou até impedir a migração dos compostos ativos para o sistema. Dessa forma, os resultados obtidos com essa técnica devem ser utilizados somente como avaliação preliminar da sensibilidade de microrganismos às diferentes substâncias com propriedades antimicrobianas.

Alguns autores afirmam que os resultados obtidos com este método são somente qualitativos e nem sempre reprodutíveis. No entanto, associados aos resultados de técnicas complementares, como o método de volatilização em disco (MID), é possível se determinar o potencial antimicrobiano de muitos compostos e/ou a resistência de muitas classes de microrganismos.

Apesar das limitações, esta continua a ser a técnica mais comum utilizada para a avaliação da capacidade antimicrobiana de óleos essenciais (microencapsulados ou não) adicionados em filmes (Kalemba e Kunicka, 2003).

### 6.3.1.3 Propriedades mecânicas

A Tabela 6.3 apresenta os resultados da análise de tração dos filmes ativos.

**Tabela 6.3:** Propriedades mecânicas de filmes antimicrobianos adicionados de óleo essencial de orégano microencapsulado.

Amostra	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	$\sigma$ (MPa)	$\varepsilon$ (%)	Y (MPa)
F2	$132,6 \pm 33,8^a$	$27,1 \pm 2,8^a$	$10,8 \pm 1,6^b$	$3,8 \pm 0,8^a$
F3	$152,3 \pm 12,7^a$	$20,2 \pm 3,1^b$	$17,9 \pm 1,8^a$	$3,7 \pm 0,4^a$

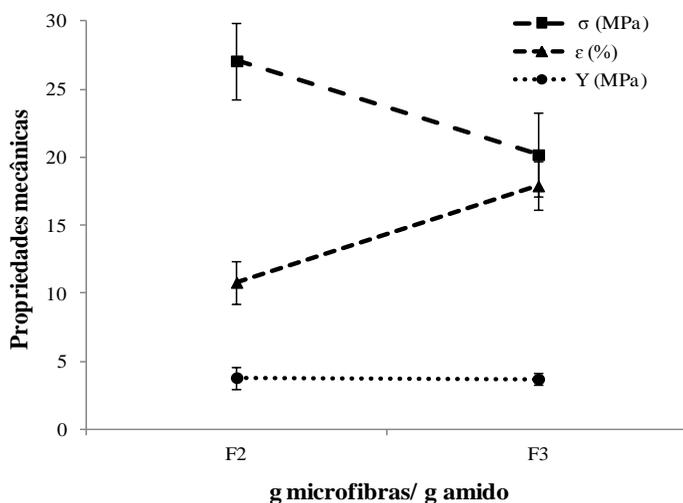
\*Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

F2 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 25 g fibras/100 g amido;  
 F3 = 5 % amido + 25 g glicerol/100 g amido + 25 g fibras/100 g amido  
 + 1,5 g microcápsulas/ 100 mL suspensão.

As propriedades mecânicas de embalagens antimicrobianas dependem das características do ativo, da composição química final do polímero, da interação entre o polímero e o ativo e das condições de processamento do material (Gontard e Guilbert, 1996, Atarés, Bonilla e Chiralt, 2010). Os resultados da Tabela 6.3 demonstram que a incorporação de óleo essencial de orégano microencapsulado em filmes de amido de mandioca-microfibras de celulose promoveu uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na resistência à tração ( $\sigma$ ) desse material. A alongação, ao contrário, teve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) com a adição das microcápsulas. O módulo de Young, que representa a rigidez dos filmes, não variou significativamente ( $p < 0,05$ ) com a incorporação das microcápsulas de óleo essencial, comparado ao filme controle (F2).

A Figura 6.4 retrata o efeito da adição do ativo antimicrobiano nas propriedades mecânicas dos filmes.

**Figura 6.4:** Efeito da adição de microcápsulas de óleo essencial de orégano nas propriedades mecânicas de filmes de amido de mandioca-microfibras de celulose.



A incorporação de lipídeos na matriz tende a reduzir a tensão suportada pelo filme, pela redução da interação entre as moléculas do polímero e promoção de domínios flexíveis dentro do filme (Yang e Paulson, 2000; Limpisophon, Tanaka e Osako, 2010). Segundo Espitia

*et al.* (2009), os constituintes químicos do óleo essencial diminuem a resistência à carga máxima e atuam como plastificante da matriz. As interações entre o polímero e os óleos essenciais dão origem a estruturas complexas, que reduzem as forças de coesão da rede de amido e os valores de resistência à tração dos filmes (Jimenez, 2013).

Atarés, Bonilla e Chiralt (2010) demonstraram que o aumento da concentração de óleo essencial de canela em filmes à base de proteína de soja promoveu a redução da resistência à tração dos filmes. Espitia *et al.* (2009) também observaram esse comportamento quando incorporaram óleos essenciais em filmes de base celulósica. No trabalho de Persico *et al.* (2009), o desempenho mecânico de filmes de polietileno e nanopartículas foi afetado pela presença de carvacrol. Segundo os autores, o carvacrol atua como um plastificante para a matriz e como um agente dispersante para o material de enchimento (nanopartículas).

Segundo Botre *et al.* (2010), o aumento na deformação do filme é resultado da natureza do óleo essencial, que age como um plastificante, penetrando a matriz polimérica e alterando a conformação das cadeias. O resultado é um filme de maior maleabilidade, com maior estiramento das cadeias. Segundo Yang e Paulson (2000), a adição de óleos essenciais reduz a interação entre as moléculas do polímero, promovendo a redução da rigidez e o aumento concomitante da extensibilidade/elasticidade do filme.

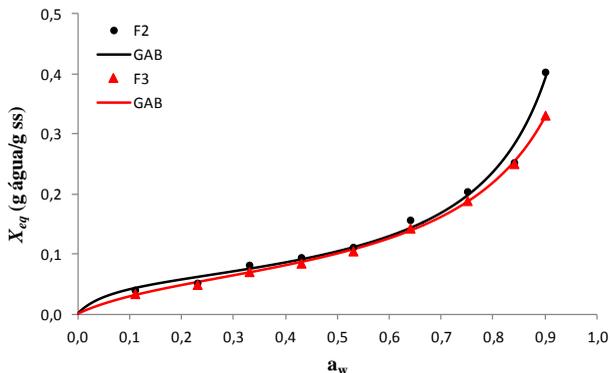
A redução dos valores de resistência à tração e o aumento nos valores de alongamento de matrizes poliméricas incorporadas com óleo essencial são os resultados mais comuns para esse tipo de material (Suput *et al.*, 2016). Esse comportamento está de acordo com os resultados encontrados por Souza *et al.* (2013), Ghasemlou *et al.* (2013) e Benavides *et al.* (2012).

### **6.3.1.4 Propriedades de barreira à água**

#### **6.3.1.4.1 Isotermas de sorção de umidade**

Na Figura 6.5 estão representadas as isotermas de sorção de umidade das amostras de filmes de amido e filmes ativos. A Tabela 6.4 apresenta os parâmetros do modelo GAB e os coeficientes de correlação.

**Figura 6.5:** Isotermas de sorção de umidade - Ajuste de GAB aos dados experimentais de umidade de equilíbrio *versus*  $a_w$  de filmes de amido-glicerol-microfibras de celulose (F2) e filmes ativos (F3).



As isotermas de sorção de umidade resultaram em curvas do tipo sigmoidal, com comportamento característico de materiais hidrofílicos. Os dados experimentais de umidade de equilíbrio em função da atividade de água foram bem descritos pelo modelo de GAB (Guggenheim - Anderson - de Boer) ( $R^2 = 0,99-1,00$ ).

A diferença entre as amostras está na presença de microcápsulas de óleo essencial de orégano na amostra F3. As curvas demonstram que, em atividades de água variando de 0,3 a 0,7, a adsorção de água das amostras é praticamente coincidente. Esse fato permite afirmar que, na concentração de 1,5 g de microcápsulas/100 mL de suspensão, a adição de óleo essencial microencapsulado à suspensão filmogênica de amido-microfibras de celulose não significou variação na adsorção de água dos filmes ativos em  $a_w < 0,7$ . Acima deste valor, o teor de água das amostras aumentou, dada a disponibilidade de água no ambiente de armazenamento. A diferença de comportamento de F2 e F3 em  $a_w > 0,7$  pode estar relacionada à plasticização das microcápsulas pela água e disponibilização do óleo de orégano em F3. Daí a menor adsorção de água em relação às amostras controle (F2). Esses resultados concordam com os resultados obtidos Mali *et al.* (2005) e Pelissari, Yamashita e Grossman (2011).

**Tabela 6.4:** Parâmetros estimados do modelo de GAB ajustado aos dados experimentais de sorção de água dos filmes de amido-glicerol-microfibras de celulose (F2) e filmes ativos (F3).

Parâmetros GAB	F2	F3
$X_0$	0,0584	0,0655
$k$	0,9476	0,8980
$C$	16,52	6,94
$R^2$	0,9872	0,9991
RMSE	0,0152	0,0034

De acordo com os resultados da Tabela 6.4, os valores de  $X_0$  resultaram muito semelhantes, enquanto que os valores do parâmetro  $C$  apresentaram uma variação, reduzindo com a adição de microcápsulas. O valor de  $k$  também apresentou pequena variação com a adição das microcápsulas na suspensão filmogênica.

Os óleos essenciais contêm altas concentrações de fenólicos, tais como o carvacrol, eugenol e timol. Os compostos fenólicos são capazes de reagir com mais de um sítio da matriz polimérica e promover ligações cruzadas. Portanto, diferentes compostos apresentam propriedades diferentes e afetam a matriz do filme de forma diferente (Burt, 2004).

#### 6.3.1.4.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A Tabela 6.5 apresenta os resultados da análise de permeabilidade ao vapor de água de filmes de amido-microfibras de celulose incorporados com microcápsulas de óleo essencial de orégano.

**Tabela 6.5:** Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes a base de amido-microfibras de celulose, incorporados de ativo antimicrobiano.

Amostra	g microcápsulas/ 100 mL suspensão	PVA ( $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ ) x $10^{-7}$
F2	0	$3,6 \pm 0,1^a$
F3	1,5	$2,4 \pm 0,1^b$

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Segundo Pérez-Gago e Krochta (2001), a incorporação de um material lipídico (hidrofóbico) em películas a base de proteínas-polissacarídeos (hidrofílicos) melhoram as propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes (Pérez-Gago e Krochta, 2001).

Os resultados da tabela demonstram que a incorporação de microcápsulas de óleo essencial de orégano na matriz amido-microfibras de celulose contribuiu para a redução da permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes antimicrobianos (F3), comparado ao controle (F2).

McHugh e Krochta (1994) demonstraram que o tamanho da partícula lipídica tem efeito sobre a PVA da película. Quanto menor o diâmetro médio das partículas, menor o valor de PVA, devido à imobilização das cadeias poliméricas na interface com as partículas, resultando na formação de uma estrutura mais ordenada e bem reticulada, com menor permeabilidade ao vapor de água. O diâmetro médio das micropartículas utilizadas no presente estudo ( $d_m = 0,8 \mu\text{m}$ ) pode ter contribuído para a estabilização da matriz, resultando em menor PVA dos filmes ativos (F3), comparado ao controle (F2).

Segundo Atarés, Bonilla e Chiralt (2010), os monoterpenos, comumente encontrados em óleos essenciais, aumentam a hidrofobicidade da película. A presença de uma fase dispersa hidrofóbica, mesmo em pequena concentração, limita a transferência de vapor de água, pela interferência na fase hidrófila e aumento do fator de tortuosidade de transferência de massa. O óleo de orégano é rico em monoterpenos, como o carvacrol e o timol, que, além de responsáveis pelas principais manifestações das atividades biológicas desse óleo, também interferem no comportamento das películas às quais são adicionados.

Segundo Persico *et al.* (2009), a redução adicional da PVA promovida pela adição do ativo depende meramente da difusão e não da solubilidade do composto. O ativo atua como um agente de intercalação, promovendo o inchaço das partículas. Isto resulta numa maior tortuosidade do caminho, retardando o transporte de vapor. A transferência de vapor de água ocorre, geralmente, através da parte hidrófila da película e depende da razão entre os componentes hidrófilos-hidrofóbicos do filme. Filmes contendo partículas lipídicas são mais eficazes como barreiras contra a umidade, em comparação àqueles sem a adição de óleo, devido à natureza hidrofóbica dos óleos. Mesmo em pequenas concentrações, as partículas de óleo essencial de orégano atuam como barreira à transferência de vapor de água, resultando em

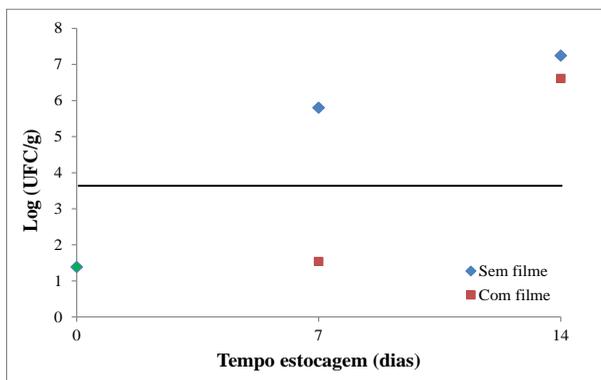
menor permeabilidade dos filmes antimicrobianos (F3), comparados ao controle (F2).

No presente estudo, a diferença nos valores de PVA dos filmes de amido é devido à presença de micropartículas de óleo essencial de orégano na matriz polimérica. Os resultados comprovaram que a adição desse material, mesmo em baixas concentrações, afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) o valor da PVA dos filmes.

### 6.3.2 Aplicação – filmes antimicrobianos e conservação de pães

A Figura 6.6 apresenta o resultado da análise de contagem microbiana, utilizada para avaliar a capacidade dos filmes ativos antimicrobianos de estender a vida útil de pães de forma comerciais.

**Figura 6.6:** Contagem microbiana (UFC/g) em pães de forma embalados em contato e sem contato com os filmes antimicrobianos.



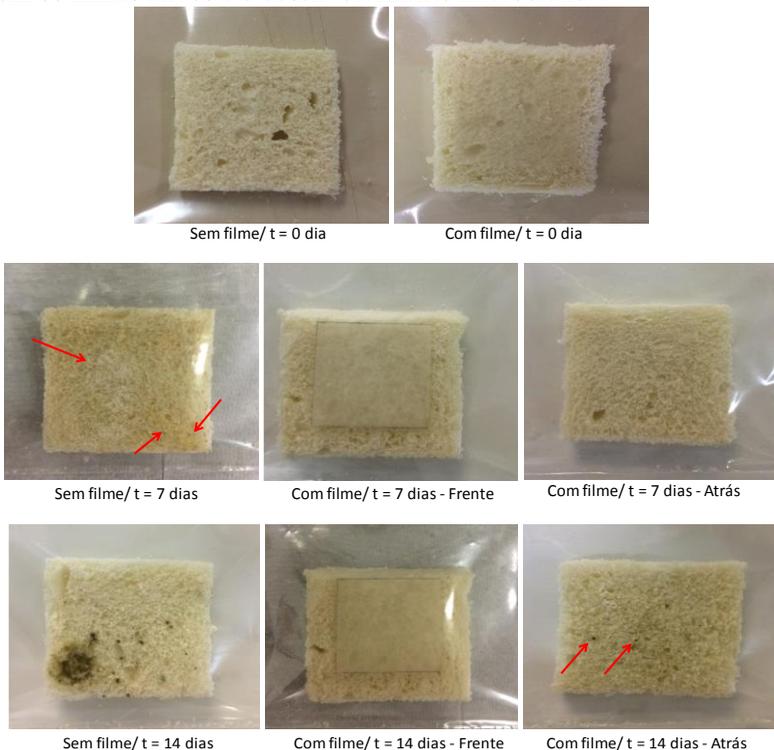
\* Linha em preto: limite de contaminação fúngica para produtos de panificação ( $5 \times 10^3$  UFC/g de amostra), estabelecido pela Portaria nº 451, do Ministério da Saúde (1997).

Pela análise da Figura 6.6, é possível verificar um crescimento microbiano 75 % maior nas amostras de pães embalados sem o filme antimicrobiano, nos primeiros 7 dias de armazenamento, em comparação à contagem inicial (marcador verde). Esse incremento foi suficiente para ultrapassar o limite máximo determinado pela legislação para contagem de fungos e bolores em produtos de panificação. Por

outro lado, os pães embalados em contato com o filme antimicrobiano apresentaram uma contagem microbiana abaixo do estabelecido pela legislação e semelhante à contagem inicial, mesmo após 7 dias de armazenamento.

Após 14 dias de armazenamento, no entanto, os resultados indicam um aumento expressivo do crescimento microbiano nas amostras, mesmo as embaladas com o filme antimicrobiano. É importante observar que, além da contagem microbiana, os pães foram submetidos à análise visual diária, para identificação do desenvolvimento de colônias visíveis a olho nu. Os resultados indicaram a presença de colônias de fungos nos pães embalados com os filmes antimicrobianos somente após o 10º dia de armazenamento. Esses resultados estão demonstrados na Figura 6.7, que apresenta a evolução do crescimento microbiano durante o tempo de armazenamento e análise das amostras.

**Figura 6.7:** Amostras de pães de forma embaladas em contato ou não com os filmes ativos e o desenvolvimento microbiano.



A análise da Figura 6.7 permite a observação do efeito do filme antimicrobiano no desenvolvimento de fungos nos pães de forma. Os pães embalados sem o filme ativo apresentaram colônias brancas e pretas (escuras) nos primeiros dias após o armazenamento. Essas colônias escuras se tornaram visíveis a olho nu nos pães embalados com o filme ativo após o 10º dia de armazenamento, aproximadamente.

Os agentes antimicrobianos incorporados nos filmes podem interagir diretamente com os microrganismos deteriorantes ou com a atmosfera no interior da embalagem. As vantagens na utilização de um composto volátil, nesse caso um óleo essencial, estão relacionadas às características sensoriais dos produtos alimentícios. Esses compostos podem ter uma influência mínima sobre o sabor e aroma finais do produto e sua liberação pode ser regulada, quando incorporados em polímeros (Matan *et al.*, 2006). A utilização do óleo de orégano microencapsulado contribuiu para a redução da intensidade do odor característico do óleo.

Segundo Oussallah *et al.* (2004), o tipo, a concentração do composto ativo e a composição do filme têm efeito crucial na atividade biológica desses filmes. Apesar da ação antimicrobiana *in vitro* comprovada dos óleos essenciais, muitas vezes são necessárias concentrações muito maiores do ativo para se alcançar a mesma eficiência, quando aplicados em alimentos. A grande disponibilidade de nutrientes em alimentos permite aos microrganismos repararem o dano celular rapidamente. Além dos fatores intrínsecos ao alimento, os fatores extrínsecos (temperatura, umidade relativa, etc) também influenciam a sensibilidade microbiana e interferem nos resultados das análises.

Os processos de produção e condicionamento dos filmes também promovem perdas importantes e a concentração do ativo no produto final é inferior à inicial. Associado a isso, deve-se levar em consideração a eficiência do processo de encapsulamento do óleo e a capacidade de difusão do ativo pela matriz. Todos esses fatores implicam numa disponibilidade limitada do ativo para exercer sua atividade. Os resultados deste estudo demonstram que, mesmo quando utilizado numa concentração baixa, o óleo de orégano microencapsulado foi capaz de estender a vida útil dos pães (nas dimensões empregadas) em até 7 dias, além do prazo de validade nominal. Esse fato demonstra o alto potencial antimicrobiano do óleo de orégano, mesmo quando microencapsulado e incorporado a uma matriz filmogênica.

A implicação para a aplicação tecnológica de filmes ativos é o ponto de equilíbrio entre a inibição desejada e o tempo de proteção

necessário (vida útil do produto). A difusividade do composto ativo no interior dos alimentos é crítica e deve ser considerada na concepção deste tipo de material, com esse fim. O uso combinado com outros conservantes e/ou embalagem com atmosfera modificada pode ser uma alternativa.

A Tabela 6.6 apresenta os resultados de caracterização das amostras dos pães de forma e filme antimicrobiano ao longo do período de armazenamento.

**Tabela 6.6:** Caracterização dos pães de forma e filmes antimicrobianos.

Parâmetros	Tempo de estocagem (dias)	Amostras		
		Pão sem filme	Pão com filme	Filme
$a_w$	0	0,94	NA	0,75
	7	0,94	0,94	0,95
	14	0,94	0,94	0,94
pH	0	5,3	NA	NA
	7	5,3	5,3	
	14	5,4	5,3	
Umidade (%)	0	33,1	NA	NA
	7	34,5	34,7	
	14	33,0	31,6	

NA: não avaliado

Os resultados da Tabela 6.6 demonstram uma  $a_w > 0,9$  para os pães de forma. Essas condições são propícias ao desenvolvimento de uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras. Segundo Pitt e Hocking (1999), fungos contaminantes de pães pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* compreendem grande parte dos organismos capazes de crescer em  $a_w \sim 0,9$ .

No entanto, em condições de alta  $a_w$ , o material ativo microencapsulado se difunde mais facilmente através da parede da cápsula, aumentando a liberação dos compostos ativos sobre a superfície dos pães. Esse fato foi observado por Soottitantawat *et al.* (2005), em seu trabalho sobre o microencapsulamento de mentol em diferentes materiais de parede. A taxa de liberação do composto aumentou

dramaticamente com o aumento da temperatura e da atividade de água, especialmente em  $a_w > 0,5$ . Segundo os autores, nessas condições há uma mudança na estrutura da matriz. Em baixa  $a_w$ , a matriz da cápsula encontra-se no estado vítreo e a estrutura permanece intacta. Nesse caso, tem-se uma alta retenção de voláteis e uma liberação mais lenta, devido à menor mobilidade das moléculas voláteis. Uma vez que a estrutura da cápsula é danificada pela absorção de água e a matriz passa a um estado plástico, as taxas de liberação são aumentadas, possivelmente pela maior mobilidade dos voláteis.

Os pHs dos pães de forma tiveram pouca ou nenhuma variação durante o armazenamento (em contato ou não com o filme antimicrobiano). Em condições de alta  $a_w$ , os fungos competem com as bactérias como contaminantes de alimentos. Nesses casos, o pH desempenha um papel decisivo. As bactérias se desenvolvem melhor em condição de pH neutro. À medida que o pH é reduzido a cerca de 5, o crescimento de bactérias se torna progressivamente menos provável, ao passo que a maioria dos fungos é pouco afetada pelo pH ao longo de um amplo intervalo, geralmente de 3 a 8. O pH 5 é considerado ótimo para o desenvolvimento de fungos. Nesses casos, o efeito de outros fatores que limitam o crescimento desses microrganismos deve tornar-se aparente e sobrepor o efeito do pH (Pitt e Hocking, 1999). No presente estudo, o pH manteve-se em torno de 5,3, condição ótima para o crescimento fúngico.

A utilização do óleo essencial de orégano como conservante e fator limitante do desenvolvimento de fungos não demonstrou relação aparente com o pH, uma vez que não houve diferença no valor desse parâmetro entre as amostras de pães embalados na presença ou ausência do filme ativo. Embora diga-se que a atividade antifúngica da maioria dos óleos essenciais dependa dos níveis de pH, Guynot *et al.* (2005) não encontraram nenhuma relação clara entre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais testados em seu trabalho e a acidez do meio. As amostras embaladas foram mantidas a temperatura e umidade relativa ambientes. Durante todo o período de armazenamento dos pães, houve pequena variação no seu teor de umidade.

O crescimento de fungos em um determinado alimento é governado por uma série de parâmetros físicos e químicos. A definição destes parâmetros pode auxiliar muito na avaliação da estabilidade dos alimentos. No entanto, muitos desses fatores não atuam de forma independente, algumas vezes, mas de forma sinérgica. No presente estudo, a possível sinergia entre a embalagem ativa e as condições de

armazenamento dos pães resultou na redução da velocidade de crescimento fúngico e na extensão da vida útil de pães de forma, cumprindo com o objetivo geral do trabalho.

#### 6.4 Conclusões parciais

- ✓ O óleo de orégano microencapsulado e incorporado à matriz polimérica manifestou atividade antimicrobiana eficaz, mesmo quando utilizado em baixas concentrações;
- ✓ A atividade antimicrobiana do filme atesta a capacidade de difusão das moléculas do agente antimicrobiano para a superfície das microcápsulas e matriz polimérica;
- ✓ A diferença nos valores de MID entre o óleo no estado livre e microencapsulado e incorporado numa matriz polimérica pode ser explicada pela formação de um complexo amido-microfibras de celulose-microcápsulas e pelas interações entre os componentes;
- ✓ A variação nas propriedades mecânicas dos filmes ativos – redução da resistência à tração e módulo de Young e aumento do alongamento – com a adição do óleo de orégano microencapsulado é resultado da redução das interações amido-amido e amido-microfibras de celulose e da plasticidade promovida pelos componentes do óleo;
- ✓ A adição de óleo de orégano microencapsulado em baixas concentrações em uma matriz polimérica de amido-microfibras de celulose não implicou em diferença substancial no comportamento das isotermas de sorção de umidade em  $a_w < 0,7$ . A plasticização promovida pelas microcápsulas e o aumento da disponibilidade de óleo em  $a_w > 0,7$  implicaram em menor adsorção de água pelos filmes ativos, comparados ao controle;
- ✓ A redução da PVA dos filmes ativos se deve à redução da mobilidade e coeficiente de solubilidade de água nos filmes, causada pela incorporação de microfibras de celulose e partículas lipídicas à matriz polimérica;
- ✓ O uso de filmes antimicrobianos contribuiu para a extensão da vida útil de pães de forma comerciais em até 10 dias, considerando as condições da análise e a composição do filme ativo;
- ✓ A utilização de um composto ativo volátil incorporado em uma matriz polimérica se sobrepôs às possíveis interações do agente com o ambiente e o alimento e garantiu o exercício da atividade antimicrobiana, mesmo quando utilizado em baixas concentrações.

## 7. CONCLUSÕES FINAIS

- ✓ Os óleos essenciais de orégano e hortelã são ricos em compostos com comprovadas ações antimicrobiana e antioxidante, apesar do potencial citotóxico. Os respectivos compostos majoritários carvacrol e mentol são os responsáveis pelas atividades biológicas e potencial citotóxico dos óleos de orégano e hortelã. O estudo toxicológico prévio fornece informações para o uso seguro desses compostos multipropriedades;
- ✓ As condições de processo e método de microencapsulamento (*spray drying*) do óleo de orégano em goma arábica não prejudicaram a expressão da atividade antimicrobiana dos compostos voláteis e em solução do óleo essencial;
- ✓ O processo de hidrólise ácida associado ao tratamento mecânico em ultrassom produziu fibras de celulose em escala micrométrica. A adição de microfibras às matrizes poliméricas à base de amido promoveu o reforço mecânico e redução da higroscopicidade e permeabilidade ao vapor de água dos biocompósitos;
- ✓ Os filmes antimicrobianos produzidos pela adição de óleo de orégano microencapsulado à matriz amido-microfibras de celulose e aplicados a pães de forma apresentaram atividade atestada pela extensão da vida útil dos pães;
- ✓ A adição de óleo de orégano microencapsulado à matriz amido-microfibras de celulose alterou o comportamento mecânico e de barreira à água dos filmes ativos;
- ✓ Filmes ativos antimicrobianos produzidos pela incorporação de óleo essencial microencapsulado em matrizes poliméricas de amido-microfibras de celulose têm efeito positivo na extensão da vida útil de pães de forma. Esses filmes são uma alternativa tecnologicamente viável para a redução das perdas de pães. As concentrações (do ativo) utilizadas são baixas, possibilitando a produção de embalagens ativas viáveis economicamente.

## **SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS**

- ✓ Avaliação da toxicidade das microcápsulas de óleo essencial e filmes ativos;
- ✓ Estudo da liberação de compostos voláteis a partir das microcápsulas e filmes ativos;
- ✓ Avaliação da composição química do óleo essencial microencapsulado;
- ✓ Análise sensorial dos pães após contato com os filmes ativos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABIP - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA. *Performance* do setor de panificação e confeitaria brasileiro em 2013. (2014). Disponível em <http://www.propan.com.br/>. Acesso em Fev/2015.

ADAMIEC, J.; KALEMBA, D. Analysis of microencapsulation ability of essential oils during spray drying. *Drying Technology*, v. 24, n. 9, p. 1127-1132, 2006.

AHMED, S.; JONES, F. R. A review of particulate reinforcement theories for polymer composites. *Journal of Materials Science*. v. 25, p. 4933-4942, 1990.

ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. *Bioresource Technology* 99 (2008) 1664–1671.

ALIGIANS, N.; KALPOUTZAKIS, MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.4168-4179, 2001.

ALLAN, P.; BILKEY, G. (2005). Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogen*. 63: 716-21.

ANDRESEN, M.; STENIUS, P. Water-in-oil Emulsions Stabilized by Hydrophobized Microfibrillated Cellulose. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 28:837–844. 2007.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 383 de 05 de agosto de 1999. "Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 7- Produtos de Panificação e Biscoitos".

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. PORTARIA Nº 540 - SVS/MS, DE 27 DE OUTUBRO DE 1997.

Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego.

A.O.A.C. - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. 16 ed., v 2, Arlington: AOAC, 1995, 559p.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3 (2002), 113-126.

ARAKI, J.; WADA, M.; KUGA, S.; OKANO, T. Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 142: 75-82. 1998.

ARANA-SÁNCHEZ, A.; ESTARRON-ESPINOSA, M.; OBLEDO-VÁSQUEZ, E.N.; PADILLA-CAMBEROS, E.; SILVA-VÁSQUEZ, R.; LUGO-CERVANTES, E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology* 50 (2010) 585–590.

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of materials. E96-80. In: *Annual book of American Standard Testing Methods*. Philadelphia: ASTM. 1989.

ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Designation D882-01. In *Annual book of ASTM standards*. Philadelphia. PA: American Society for Testing and Materials. 2002.

ATARÉS, L.; BONILLA, J.; CHIRALT, A. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, Essex, v. 100, n. 4, p. 678-687, 2010.

AVÉROUS, L.; FRINGANT, C.; MORO, L. Plasticized starch-cellulose interactions in polysaccharide composites. *Polymer*, v. 42, p. 6565-6572, 2001.

ÁVILA-SOSA, R.; PALOU, E.; JIMÉNEZ MUNGUÍA, M. T.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V.; NAVARRO CRUZ, A. R.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology* 153(1-2): 66-72, 2012.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BAERT, K.; VALERO, A.; DE MEULENAER, B.; SAMAPUNDO, S.; AHMED, M. M.; BO, L.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHIERE, F. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 118, Issue 2, 15 September 2007, Pages 139–150.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446–475.

BARCHIESI, F.; DEL POETA, M.; MORBIDUCCI, V.; ANCARANI, F.; SACLISE, G. (1993). Turbidimetric and visual criteria for determining the *in vitro* activity of six antifungal agents against *Candida spp.* and *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 124. 19-25.

BECK-CANDANEDO. S.; ROMAN. M.; GRAY. D. Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions. *Biomacromolecules* 2005. 6. 1048-1054.

BELLETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6932-6938.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *J. Food Eng.*, 2012, 110, 232–239.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, 2010.

BERENGUER, J.A., CALDERON, V., HERCE, M.D., SANCHEZ, J.J. 1991. Spoilage of a bakery product (sobao pasiego) by isoprene-producing moulds. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 31: 580- 583.

BERTOLINI, A. C.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Stability of Monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 780-785.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução à Química dos Alimentos*. 2 ed. São Paulo: Varela. 1995.

BONDESON, D.; MATHEW, A.; OKSMAN, K. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. *Cellulose*. v.13, p. 171 –180, 2006.

BOTRE, D. A.; SOARES, N. F. F.; ESPITIA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. *Rev. Ceres, Viçosa*, v. 57, n.3, p. 283-291, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. v. 28. n. 1. p. 25-30. 1995.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemists Society*, v. 60, p. 309-319, 1938.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* 94 (2004) 223– 253.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible

films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *J. Food Sci.* 2001, 66, 865–870.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*—Vol. 65, No. 6, 2000.

CAMARGO, M. Estudos preliminares sobre a produção de nanocelulose a partir de algodão “never dried” utilizando hidrólise enzimática seguida de sonicação com ultrassom. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, Brasil. 2010.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CALVIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Oxford, v. 5, n. 4, p. 420-428, 2005.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. (2001) *The Fungi*. London, UK: Academic Press.

CASTRO, H. F. *Papel e Celulose*. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, 2009.

CAUVAIN, S.P., YOUNG, L.S. 2007. Bread Spoilage and Staling. In: *Technology of Breadmaking*, 2ed. Springer International Publishing, NY. 272-292.

CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; SALGUEIRO, L. 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte. *Aspergillus* and *Candida* strains. *J Appl Microbiol* 100: 1333-1338.

CÉSAR, A. S.; MORI, C.; BATALHA, M. O. Inovações tecnológicas de embalagens nas indústrias de alimentos: estudo de caso da adoção de embalagem ativa em empresas de torrefação de café. *Revista Brasileira de Inovação*. Rio de Janeiro, 9 (2), p. 355-378, 2009.

CHEN, W.; YU, H.; LIU, Y.; CHEN, P.; ZHANG, M.; HAI, Y. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pre treatments. *Carbohydrate Polymers* 83 (2011) 1804–1811.

CHENG, Q.; WANG, S.; RIALS, T. G. (2009). Poly (vinyl alcohol) nanocomposites reinforced with cellulose fibrils isolated by high intensity ultrasonication. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 40 (2), 218–224.

CHO, S. Y.; RHEE, C. Sorption Characteristics of Soy Protein Films and their Relation to Mechanical Properties. *LWT Food Science and Technology* 35, 151-157, 2002.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; SALLIS, E. S.; ANTUNES, T. A.; MATTEI, A.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Toxicidade Pré-Clinica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar. *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (5): 704-9 (2008).

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; FARIA, R.O; XAVIER, M.O.; SANTIN, R.; NASCENTE P.S.; RODRIGUES, M.R.; MEIRELES, M.C.A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v, 62, p. 1291-1294, 2010.

CIOLACU, D., CIOLACU, F., POPA, V. I. (2011). Amorphous cellulose—structure and characterization. *Cellulose chemistry and technology*, v. 45(1), p. 13, 2011.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science* 78 (2008) 90–103.

CORNEA, C.P., CIUCA, M.; VOAIDES, C.; GAGIU, V.; POP, A. Incidence of fungal contamination in a Romanian bakery: A molecular approach. *Rom. Biotechnol. Lett.* 16, 5863–5871.

CORRADINI, C.; ALFIERI, I.; CAVAZZA, A.; LANTANO, C.; LORENZI, A.; ZUCCHETTO, N.; MONTENERO, A. Antimicrobial

films containing lysozyme for active packaging obtained by sol-gel technique. *Journal of Food Engineering* 119 (2013) 580–587.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.622-626, 1997.

CURVELO, A. A. S.; CARVALHO, A. J. F.; AGNELLI, J. A. M. Thermoplastic starchcellulosic fiber composites: Preliminary results. *Carbohydrate Polymer*. v.45, p. 183-188, 2001.

DAO, T.; DANTIGNY, P. Control of food spoilage fungi by ethanol. *Food Control* 22 (2011) 360-368.

DANTIGNY, P.; NANGUY, S. P-M. Significance of the physiological state of fungal spores. *International Journal of Food Microbiology* 134 (2009) 16–20.

DE BILLERBERK, V.G.; ROQUES, C.G.; BESSIERE, J.M.; FONVIELLE, J.L.; DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* v.47. p.9-17. 2001.

DELLA VALLE, G.; BULEON, A.; CARREAU, P. J.; LAVOIE, P. A.; VERGNES, B. Relationship between structure and viscoelastic behavior of plasticized starch. *Journal of Rheology*. New York. v. 42. p. 507-525. 1998.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*.75. 801–804. 2004.

DIAS, A. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAROTONDA, F. D. S.; LAURINDO, J. B. Mechanical and barrier properties of composite films

based on rice flour and cellulose fibers. *LWT - Food Science and Technology* 44 (2011) 535-542.

DONG, X. M.; REVOL, J.-F. O.; GRAY, D. G. Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. *Cellulose* 1998, 5, 19.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308-316. 2000.

DUFRESNE, A.; DUPEYRE, D.; VIGNON, M. R. Cellulose microfibrils from potato tuber cell: Processing and characterization of starch-cellulose microfibril composites. *Journal of Applied Polymer Science* 76, 2080-2092, 2000.

DUFRESNE, A.; VIGNON, M. R. Improvement of Starch Film Performances Using Cellulose Microfibrils. *Macromolecules*. 1998, 31 (8), pp. 2693-2696.

EICHHORN, S. J.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; MARCOVICH, N. E.; CAPADONA, J. R.; ROWAN, S. J.; WEDER, C.; THIELEMANS, W.; ROMAN, M.; RENNECKAR, S.; GINDL, W.; VEIGEL, S.; KECKES, J.; YANO, H.; ABE, K.; NOGI, M.; NAKAGAITO, A. N.; MANGALAM, A.; SIMONSEN, J.; BENIGHT, A. S.; BISMARCK, A.; BERGLUND, L. A.; PEJIS, T. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of material Science*, v. 45, p. 1-45, 2010.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(2):193-236.

ELLAZZOUZI - HAFRAOUI, S.; NISHIYAMA, Y.; PUTAUX, J.; HEUX, L.; DUBREUIL, F.; ROCHAS, C. The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. *Biomacromolecules*, 9, 57-65, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PFALLER, M. A.; RINALDI, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; VERWEIJ, P. E. International and multicenter comparison of EUCAST

and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol* 43: 3884-3889, 2005.

ESPITIA, P. J. P.; BOTTI, L. C. M.; SOARES, N. F. F.; SALGADO, J. J.; HOYOS, J. A.; SILVA, W. A.; MELO, N. R.; PEREIRA, O. L. Efeito da incorporação de óleos essenciais nas propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de água e caracterização estrutural de embalagens ativas celulósicas. *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – 2009.*

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. *Revista Ciência e Tecnologia Alimentar. Galicia*, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.

FÄLDT, P.; BERGENSTAHL, B. Fat Encapsulation in Spray-Dried Food Powders. *JAOCS*, Vol. 72, no. 2 (1995).

FAN, M., DAI, D., HUANG, B. (2012). Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres. *Fourier Transform - Materials Analysis* (pp. 45–68).

FAMÁ L., ROJAS, A. M.; GOYANES, S.; GERSCHENSON, L. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT*; v 38; p 631–639; 2005.

FAMÁ L.; GOYANES, S.; GERSCHENSON, L. (2007). Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, 70, 265-273.

FAVIER, V.; CHANZY, H.; CAVAILLE, J. Y. Polymer Nanocomposites Reinforced by Cellulose Whiskers. *Macromolecules*. 1995, 28 (18), pp 6365–6367.

FERNANDES, R. V. B. Microencapsulamento de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) através de secagem por atomização. *Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais*, 2013.

FIDELIS, J.C.F.; MONTEIRO, A.R.G.; SCAPIM, M. R. S.; MONTEIRO, C.C.F.; MORAIS, D.R.; CLAUS, T.; VISENTAINER, J.V.; YAMASHITA, F. Development of an active biodegradable film containing tocopherol and avocado peel extract. *Ital. J. Food Sci.*, vol. 27 – 2015.

FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C., THRANE, U., 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal Food Microbiology* 33, 85–102.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology* 19 (2008) 156-164.

FRASCARELI, E. C.; SILVA, V. M.; TONON, R. V.; HUBINGER, M. D. Physicochemical properties of coffee oil microcapsules produced by spray drying. III Jornadas Internacionais sobre avanços na tecnologia de filmes e coberturas funcionais em alimentos. UNICAMP. Campinas – SP. 2011.

FREIRE, F. C. O. A Deterioração Fúngica de Produtos de Panificação no Brasil. Comunicado Técnico 174. Embrapa. 2011.

FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; VIEIRA, I. J. C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, p. 887-894, 2004.

GAD-SHAYNE, C. Alternatives to *in vivo* studies in toxicology. In *General and Applied Toxicology*. Vol. 6. John Wiley & Sons Inc. (2009).

GALLO, J-A; Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science* 180 (2000) 37–46.

GARCIA, D.; RAMOS, A. J; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food microbiology*, v. 28, n. 3, p. 406-417, 2011.

GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKI, N. E. Lipid addition to improve barrier properties of starch-based films and coatings. *Food Chemistry and Toxicology*. v. 65, n. 6, p. 941-947, 2000.

GENNADIOS, A.; HANNA, M. A.; KURTH, L. B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *Lebensm-Wiss Tech* 30:337-350, 1997.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GHASEMLOU, M.; ALIHEIDARI, N.; FAHMI, R.; SHOJAEI-ALIABADI, S.; KESHAVARZ, B.; CRAN, M. J.; KHAKSAR, R. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98, 1117–1126.

GÓMEZ-ESTACA, J., LÓPEZ DE LACEY, A., LOPEZ-CABALLERO, M. E., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., MONTERO, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. *Boletim do SBCTA*, v.30, n.1, p.3-15, 1996

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizer affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, v.58, p.206-211, 1993.

GOUBET, I.; LE QUERE, J.-L.; VOILLEY, A. J. Retention of Aroma Compounds by Carbohydrates: Influence of Their Physicochemical Characteristics and of Their Physical State. A Review. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 1981-1990.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology* 15 (2004) 330–347.

GRBOVIC, F.; STANKOVIC, M. S.; CURCIC, M.; DORDEVIC, N.; SEKLIC, D.; TOPUZOVIC, M.; MARKOVIC, S. *In Vitro* Cytotoxic Activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Plants*, 2013. 2. 371-378.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L. G. M. (1996). Prolongation of the shelflife of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Food Science and Technology – LWT* 29, 10-17.

GUTIÉRREZ, L.; ESCUDERO, A.; BATLLE, R.; NERIN, C. Effect of Mixed Antimicrobial Agents and Flavors in Active Packaging Films. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 8564–8571.

GUYNOT, M. E.; MARÍN, S.; SETÚ, L.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. *Food Science and Technology International*, London, v. 11, n. 1, p. 25-32, 2005.

HAN, J. H. (2000). Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, 54(3), 56–65.

HAN, J. H. Antimicrobial packaging systems. In: *Innovations in Food Packaging*. Jung H. Han. Academic Press. Elsevier, 2005.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.53, n.8, p.2928-35, 2005.

HECHT, J. P., KING, C. J. (2000). Spray-drying: Influence of developing drop morphology on drying rates and retention of volatile substances. 1. Single-drop experiments. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 39(6), 1756–1765.

HENN, J. D.; BERTOL, T. M.; MOURA, N. F.; COLDBELLA, A.; BRUM, P. A. R.; CASAGRANDE, M. Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial and antioxidant potential. R. Bras. Zootec., v.39, n 8, p.1761-1767. 2010.

HILL, J.L., HOCKING, A.D., WHITFIELD, F.B. 1995. The role off fungi in the production of chloranisoles in general purpose freight containers. Food Chemistry 54, 161-166.

HOGAN, S. A.; McNAMEE, B. F.; O'RIORDANA, E. D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. International Dairy Journal 11 (2001) 137-144.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology 22 (2005) 273-292.

HOTZA, D. Colagem de Folhas Cerâmicas. Cerâmica. v. 43, p. 283-284, 1997.

HUBBE, M. A.; ROJAS, O. J.; LUCIA, L. A.; SAIN, M. Cellulosic nanocomposites: Properties and performance of natural-fibre composites. Florida. USA: CRC Press. 2008. p. 209-217.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; CHATHA, S. A. S.; JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P. S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology (2010a) 41: 1070-1078.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; ASHRAFD, M.; GILANIF, A. H. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. Journal of Science and Food Agriculture 90: 1827-1836. 2010b.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. Frontiers in Microbiology: Antimicrobials. Resistance and Chemotherapy. 2012, Vol 3, Article 12.

IMBERTY, A.; BULÉON, A.; TRAN, V.; PÉREZ, S. Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch/Stärke*. v.43, n.10, p.375-384, 1991.

INOUYE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *The International Journal of Aromatherapy* 2003. vol 13. n 2/3.

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 47. 565–573.

INOUYE, S.; WATANABE, M.; NISHIYAMA, Y.; TAKEO, K.; AKAO, M.; YAMAGUCHI, H. Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses* 41. 403-410 (1998).

INOUYE, S.; WATANABE, M.; NISHIYAMA, Y.; TAKEO, K.; AKAO, M.; YAMAGUCHI, H. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses* 43: 17-23.

JAFARI, S. M.; ASSADPOO, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. *Drying Technology*. 26: 816–835. 2008.

JANSSON, A.; THUVANDER, F. Influence of thickness on the mechanical properties for starch films. *Carbohydrate Polymers* 56 (2004) 499–503.

JILLAVENKATESA, A.; DAPKUNAS, S. J.; LUM, L. S. H. Particle size characterization. National Institute of Standards and Technology/Government Printing Office, Washington DC. 164 pp, 2001.

JIMÉNEZ, A. Physical properties and antioxidant capacity of starch–sodium caseinate films containing lipids. *Journal of Food Engineering*, v.116, n.3, p.695-702, 2013.

KACURAKOVA, M.; MATHLOUTHI, M. FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond. *Carbohydr Res*; v. 284, p. 145-157, 1996.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, 10, 813-829.

KIM, J.M.; MARSHALL, MR.; CORNELL, J.A.; PRESTON III, J.F.; WEI, C.I. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, v.60, 1364-8, 1995.

KIM, Y. D.; MORR, C. V.; SCHENZ, T. W. Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Liquid Orange Oil Emulsion Particles. *J. Agric. Food Chem*. 1996, 44, 1308-1313.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. *Neotropical Biology and Conservation*, v.5, p.120-132, 2010.

KAURINOVIC, B.; POPOVIC, M.; VLAISAVLJEVIC, S; TRIVIC, S. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules*. 2011;16: 7401-14.

KAVAS, N.; KAVAS, G.; SAYGILI, D. Use of ginger essential oil-fortified edible coatings in Kashar cheese and its effects on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *CyTA – Journal of Food*, 2015.

KECHICHIAN, V.; DITCHFIELD, C.;VEIGA-SANTOS, P.; TADINI, C. C. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT - Food Sci. Technol.* v. 43. n. 7. p. 1088-1094. 2010.

KEETELS, C. J. A. M.; OOSTERGETEL, G. T.; VLIET, T. V. Recrystallization of amylopectin in concentrated starch gels. *Carbohydrate Reserch*. V. 30, 61-64, 1996.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*. v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.

KIM, J.M.; MARSHALL, J.A.; CORNELL, J.F.; PRESTON, J.F.; WEI, C.I. (1995) Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science* 60, 1364–1368.

KIM, Y. D.; MORR, C. V.; SCHENZ, T. W. Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Liquid Orange Oil Emulsion Particles. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 1308-1313.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; KINK, H.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie*. v. 44, p. 3358-3393, 2005.

KLOUCEK, P.; SMID, J.; FRANKOVA, A.; KOKOSKA, L.; VALTEROVA, I.; PAVELA, R. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapour phase. *Food Research International* 47 (2012) 161–165.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M.; Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. *Neotropical Biology and Conservation* 5(2):120-132. 2010.

KOCIC-TANACKOV, S. G.; DIMIC, J. L.; TANACKOV, I.; TEPIC, A.; VUJICIC, B.; GVOZDANOVIC-VARGA, J. Effects of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) essential oils on the *Aspergillus versicolor* growth and sterigmatocystin production. *J. Food Sci.*, 77: M278-M284. 2012.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*. v. 51, n. 2, p. 60-74, 1997.

KUMAR, S.; BAHL, J. R.; BANSAL, R. P.; GUPTA, A. K.; SINGH, V.; SHARMA, S. High economic returns from companion and relay cropping of bread wheat and menthol mint in the winter-summer season in north Indian plains. *Industrial Crops and Products*, v.15, p.103-114, 2002.

KUNANOPPARAT; T.; MENUT; P.; MOREL; M.-H.; GUILBERT; S. Reinforcement of plasticized wheat gluten with natural fibers: From

mechanical improvement to deplasticizing effect . Composites: Part A; v. 39; p 777–785; 2008.

KURUP, T.R.R.; WAN, L.S.C.; CHAN, L.W. Interaction of preservatives with macromolecules. Part II. Cellulose Derivatives. *Pharmaceutics Acta Helvetiae* 70 (1995) 187-193.

LABUZA, T.P. Sorption phenomena in foods. *Food Technology*, v. 22, n. 3, p. 15-24, 1968.

LABUZA, T. P.; BREENE, W. M. (1989). Applications of active packaging for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13, 1-69.

LACOSTE, A.; SCHAICH, K. M.; ZUMBRUNNEN, D.; YAM, K. L. Advancing controlled release packaging through smart blending. *Packaging Technology and Science*, v. 18, n. 2, p. 77-87, 2005.

LAIRD, K.; PHILLIPS, C. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology* 54. 169–174. 2011.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Applied Microbiol.* v.91. p.453-462. 2001.

LAROTONDA, F. D. S.; MATSUI, K. N.; SOLDI, V.; LAURINDO, J. B. Biodegradable Films Made from Raw and Acetylated Cassava Starch. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol.47, n. 3: pp. 477- 484. 2004.

LAVOINE, N; DESLOGES, I; DUFRESNE, A; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers* 90 (2012) 735–764.

- LEGAN, J. D. Mould Spoilage of Bread: the Problem and Some Solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 32 (1993) 33-53.
- LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H.; MACHADO, R. A. F.; BOLZAN, A. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 430–436.
- LENGOWSKI, E.C.; MUNIZ, G.I.B.; NISGOSKI, S.; MAGALHÃES, W.L.E. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. *Scientia Forestalis*, v. 41, p. 185-194, 2013.
- LEWIS, T.; NIELSEN, L. Dynamic mechanical properties of particulate-filled composites. *J. Appl. Polym. Sci.* 14 (1970) 1449.
- LIEBERMAN, H. A.; REIGER, M. M.; BANKER, G. S. *Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems. Volume 2.* Marcel Dekker: New York. 1989.
- LIMPISOPHON, K.; TANAKA, M.; OSAKO, K. (2010) Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. *Food Chem* 122:1095–1101.
- LIU, H.; XIE, F.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L. Thermal processing of starch-based polymers. *Progr. Polym. Sci.* v.34, p.1348–1368, 2009.
- LIU, Y. Recent progress in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy study of compositional, structural and physical attributes of developmental cotton fibers. *Materials*, v. 6(1), p. 299-313, 2013.
- LÓPEZ, O. V.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. E.; GARCIA, M. A. Potassium sorbate controlled release from corn starch films. *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 1583–1591.
- LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERÍN, C. Solid and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n.17, p. 6939-6946, 2005.

LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERÍN, C. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington, v. 55, n. 21, p. 8814-8824, 2007.

LU, Y.; WENG, L.; CAO, X. Morphological, thermal and mechanical properties of ramie crystallites-reinforced plasticized starch biocomposites. *Carbohydrate Polymer*. v 63, p. 198-204, 2006.

MA, H.; FORSSELL, P.; KYLLI, P.; LAMPI, A. M.; BUCHERT, J.; BOER, H.; PARTANEN, R. Tansglutaminase catalyzed cross-linking of sodium caseinate improves oxidative stability of flaxseed oil emulsion. *J Agric Food Chem*. 2012; 60:6223–6229.

MA, X.; YU, J.; KENNEDY, J. F.; Studies on the properties of natural fibers-reinforced thermoplastics starch composites. *Carbohydrates Polymer*, v. 62, p. 19-24; 2005.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 41, p. 1–21, 2006.

MALI, S. (2002) Produção, caracterização e aplicação de filmes plásticos biodegradáveis a base de amido de cará. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina (UEL).

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering* 75 (2006) 453–460.

MALI, S.; SAKANAKA, L. S.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydr. Polym.*, v. 60, 283–289, 2005.

MANSOUR, Z.; GUTH, E. P. Complexing Behavior of Starches with Certain Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 57, No. 3, March 1968.

MARIANO, M. Obtenção, caracterização e aplicação de nanocristais de celulose obtidos a partir do sisal. Dissertação. Pós-graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MARQUES, P. T.; LIMA, A. M. F.; BIANCO, G.; LAURINDO, J. B.; BORSALI, R.; LE MEINS, J. F.; SOLDI, V. Thermal properties and stability of cassava starch films cross-linked with tetraethylene glycol diacrylate. *Polymer degradation and stability*, v. 91(4), p. 726-732, 2006.

McHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Milk-protein-based edible films and coatings. *Food Technology*. 48(1): 97-103. 1994.

MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A.J.; CHOMPREEA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology* 107 (2006) 180 – 185.

McNAMEE, B. F.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4551-4555.

MELO, A. A. M. Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango resfriada. Dissertação de Mestrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Goiás. Goiânia – GO, 2010.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; LERKIVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*, v. 71, p.79-83, 2000.

MOLINA, F. M. P. Production and characterization of biodegradable films of banana starch reinforced with cellulose nanofibers. Tese de Doutorado. Unicamp - Universidade de Campinas, 2013.

MONGENOT, N.; CHARRIER, S.; CHALIER, P. Effect of Ultrasound Emulsification on Cheese Aroma Encapsulation by Carbohydrates. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 861-867.

MORAES, J. O.; MÜLLER, C.M.O.; LAURINDO, J.B. Influence of the simultaneous addition of bentonite and cellulose fibers on the mechanical and barrier properties of starch composite-films. *Food Science and Technology International* 18(1) 35–45, 2012.

MORAES, J. O.; RESZKA, A.; LAURINDO, J. B. Espalhamento e secagem de filme de amido-glicerol-fibra preparado por “tape-casting”. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v.49. n.2, p.136-143, fev, 2014.

MORAES, J. O.; SCHEIBE, A. S.; CARCIOFI, B. A. M.; LAURINDO, J. B. Conductive drying of starch-fiber films prepared by tape casting: Drying rates and film properties. *LWT - Food Science and Technology* 64 (2015) 356-366.

MORAES, J. O.; SCHEIBE, A. S.; SERENO, A.; LAURINDO, J. B. (2013). Scale-up of the production of cassava starch-based films using tape-casting. *Journal of Food Engineering*. 119. 800-808.

MORÁN, J. I.; ALVAREZ, V. A.; CYRAS, V. P.; VÁSQUEZ, A. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. *Cellulose* (2008) 15:149–159.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65:55–63.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values. *Carbohydrate Polymers* 77 (2009a) 293–299.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. *Food Hydrocolloids*. v.23, n.5, p. 1328-1333, 2009b.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier

properties of starch-based films. *Industrial Crops and Products* 33 (2011) 605–610.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers* 72 (2008) 82–87.

NASRI-NASRABADI, B.; BEHZAD, T.; BAGHERI, R. Extraction and characterization of rice straw cellulose nanofibers by an optimized chemomechanical method. *Journal of Applied Polymer Science*. Volume 131, Issue 7, 2014.

NCCLS - National Committee Clinical Laboratory Standards. M38A - Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Wayne, PA; USA: vol. 22. 2002.

NCCLS - National Committee Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2012.

NEWMAN, R. H.; STAIGER, M. P. Cellulose nanocomposites. In: PICKERING KL (ed) *Properties and performance of natural-fibre composites*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 2008.

NIELSEN, P. V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology* 60 (2000) 219–229.

NWEZE, E. I; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Agar-based disk diffusion assay for susceptibility testing of dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 48. n.10. p. 3750-3752. 2010.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18(2): 301-307. 2008.

OUSSALLAH, M.; CAILLET, S.; SALMIERI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. (2004) Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52:5598-5605.

PELLISSARI, F. M.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. Extrusion parameters related to starch/chitosan active films properties. *International Journal of Food Science and Technology* 2011, 46, 702–710.

PANDEY, A. K.; RAI, M. K.; ACHARYA, D. 2003. Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against human pathogenic fungi. *Pharm. Biol.* 41. 421–425.

PEREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science*, v.66, p.705-710, 2001.

PÉREZ-PÉREZ, C; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. A.; BARBOSA-RODRÍGUEZ, J. R.; VILLASEÑOR-ORTEGA, F. Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. 2006: 193-216.

PERSICO, P.; AMBROGI, V.; CARFAGNA, C.; CERRUTI, P.; FERROCINO, I.; MAURIELLO, G. Nanocomposite Polymer Films Containing Carvacrol for Antimicrobial Active Packaging. *Polymer Engineering and Science* – 2009, 49(7):1447 – 1455.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos. Correlatos e Cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora. 325 p. 2003.

PITT, J. I.; CRUICKSHANKZ, R. H.; LEISTNERS, L. *Penicillium commune*, *P. camembertii* - the origin of white cheese moulds and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiology*. 1986, 3, 363-371.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. Second edition. Aspen Publishers, 1999.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. Cadernos de Saúde Pública. Rio de Janeiro. 25(8): 1653-1666. 2009.

PONCE, A. G.; ROURA, S. I.; DEL VALLE, C. E.; MOREIRA, M. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plants extracts: *in vitro* and *in vivo* studies. Postharvest Biology and Technology. Auckland, v. 49, p. 294-300, 2008.

PORTARIA Nº 451, DE 19 DE SETEMBRO DE 1997. Regulamento Técnico - Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.

QUESADA, J.; SENDRA, E.; NAVARRO, C.; SAYAS-BARBERÁ, E. Estrella Sayas-Barberá. Antimicrobial Active Packaging including Chitosan Films with *Thymus vulgaris* L. Essential Oil for Ready-to-Eat Meat. Foods 2016, 5, 57.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. Meat Science 62 (2002) 373–380.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M.R. Inhibition effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Cont. v.15. p.479-483. 2004.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. Drying technology. 16 (6), 1195-1236 (1998).

REINECCIUS, G. A. 2004. Multiple-core encapsulation: The spray drying of food ingredients. p. 151-185. In P.Vilstrup (ed.) Microencapsulation of food ingredients. Leatherhead International Limited, Leatherhead, United Kingdom.

REINECCIUS, G. A.; RISCH, S. I. 1986. Encapsulation of Artificial Flavors by  $\beta$ -cyclodextrin. Perf Flav. 11(4), 1, 3-6.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 23, p. 127-149, 1988.

ROONEY, M. L. Introduction to active food packaging technologies. In: *Innovations in Food Packaging*. Jung H. Han. Academic Press. Elsevier. 2005.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Factors Affecting Retention in Spray-Drying Microencapsulation of Volatile Materials. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 1288-1294.

ROYO, M.; FERNANDEZ-PAN, I.; MATÉ, J. I. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. *J Sci Food Agric* 2010; 90: 1513–1519.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem* 91: 621-632. 2005.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, v.15, n.7, p.549-557, 2004.

SALMIERI, S.; ISLAM, F.; KHAN, R. A.; HOSSAIN, F. M.; IBRAHIM, H. M. M.; MIAO, C.; HAMAD, W. Y.; LACROIX, M. Antimicrobial nanocomposite films made of poly(lactic acid)–cellulose nanocrystals (PLA–CNC) in food applications—part B: effect of oregano essential oil release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in mixed vegetables. *Cellulose* (2014) 21:4271–4285.

SAMIR, M. A. S.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A.; Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules* 2005, 6, 612.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C.; Embalagens Plásticas Flexíveis - Principais Polímeros e Avaliação de Propriedades. 1. Ed. Campinas: CETEA/ITAL; 2002; 267 p.

SARKAR, S.; GUPTA, S.; VARIYAR, P. S.; SHARMA, A.; SINGHAL, R. S. Hydrophobic derivatives of guar gum hydrolyzate and gum Arabic as matrices for microencapsulation of mint oil. *Carbohydrate Polymers* 95 (2013) 177– 182.

SCHEIBE, A. S.; MORAES, J. O.; LAURINDO, J. B. Production and characterization of bags from biocomposite films of starch-vegetal fibers prepared by *tape casting*. *Journal of Food Process Engineering* 37 (2014) 482–492.

SCHEIDEGGER, K. A., PAYNE, G. A. (2003). Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Toxin Rev.* 22, 423–459.

SCHELZ, Z.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*. v. 77. n. 4. p. 279-285. 2006.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Res. J.* 29: 786 –794.

SEKIYAMA, Y.; MIZUKAMI, Y.; TAKADA, A.; OOSONO, M.; NISHIMURA, T. (1996) Effect of mustard extract vapor on fungi and spore forming bacteria. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* 24, 171–178.

SHEU, T-Y.; ROSENBERG, M. Microencapsulation by Spray Drying Ethyl Caprylate in Whey Protein and Carbohydrate Wall Systems. *Journal of Food Science*. V. 60, N. 1, 1995.

SILVA, D. J.; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. Cellulose whiskers. O Papel. vol. 70, num. 07, pp. 34 – 52, 2009.

SILVA, J. O.; CÂNDIDO, L. M. B.; NOVELLO, D; MACHADO. C. Ocorrência de aflatoxinas em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. Ciência e Agrotecnologia, v. 32, n.4, p. 1238-1244. 2008 (a).

SILVA, R.; KUNITA, M. H.; GIROTTO, E. M.; RADOVANOVIC, E.; MUNIZ, E. C.; CARVALHO, G. M.; RUBIRA, A. F.; J. Synthesis of Ag-PVA and Ag-PVA/PET-s20 Composites by Supercritical CO<sub>2</sub> Method and Study of Silver Nanoparticle Growth Braz. Chem. Soc. 2008 (b), 19, 1224.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. Quim. Nova. Vol. 32, No. 3, 661-671, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC. 2003, p. 467-495.

SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activity of *Mentha piperita* L. Arabian Journal of Chemistry. v.4. n.1. p.1-20. 2011.

SIVROPOULOU, A.; PAPANILOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and citotoxic activities of *Origanum vulgare* essential oil. Journal of Agriculture and Food Chemistry. v.44, p.1202-1205, 1996.

SOOTTITANTAWAT, A.; TAKAYAMA, K.; OKAMURA, K.; MURANAKA, D.; YOSHII, H.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics. Innovative Food Science and Emerging Technologies 6 (2005) 163– 170.

SOOTTITANTAWAT, A.; YOSHII, H.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. Microencapsulation by Spray Drying: Influence of Emulsion Size on the Retention of Volatile Compounds. *Journal of Food Science*—Vol. 68, Nr. 7, 2003.

SOUZA, A. C.; GOTO, G.E.O.; MAINARDI, J.A.; COELHO, A.C.V.; TADINI, C.C. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT - Food Science and Technology* (2013).

SOUZA, N. A. B. Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências da Saúde. 2010.

SOUZA, N. A. B.; LIMA, E. O.; GUEDES, D. N.; PEREIRA, F. O.; SOUZA, E. L.; SOUSA, F. B. Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 46. n. 3. jul./set.. 2010.

SRINIVASA, P. C.; RAMESH, M. N.; THARANATHAN, R. N. (2007). Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*. 21, 1113-1122.

STURCOVA, A.; DAVIES, G. R.; EICHHORN, S. J. Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers. *Biomacromolecules* 2005, 6, 1055.

SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W, 2003. Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *Concise Reviews and Hypotheses in Food Science* 68(2):408.

SUPPAKUL, P.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W.; MILTZ, J. Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT* 41 (2008) 779–788.

SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W. Antimicrobial Properties of Basil and Its Possible Application in Food Packaging. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 3197-3207.

SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W. Characterization of Antimicrobial Films Containing Basil Extracts. *Packag. Technol. Sci.* 2006; 19: 259–268.

SUPPAKUL, P.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W. Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. *Journal of Food Engineering.* 105 (2011). pp. 270–276.

SUPUT, D.; LAZIC, V.; PEZO, L.; MARKOV, S.; VASTAG, Z.; POPOVIC, L.; RADULOVIC, A.; OSTOJIC, S.; ZLATANOVIC, S.; POPOVIC, S. Characterization of Starch Edible Films with Different Essential Oils Addition. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2016, Vol. 66, No. 4, pp. 277–285.

TAN, L. H.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Effect of oil loading on microspheres produced by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, May 2005; 22(3): 253–259.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: Núcleo de Microbiologia do ITAL, 2001. 82p.

TEODORO, R. A. R.; FERNANDES, R. V. B.; BOTREL, D. A.; BORGES, S. V.; SOUZA, A. U. S. Characterization of Microencapsulated Rosemary Essential Oil and Its Antimicrobial Effect on Fresh Dough. *Food Bioprocess Technol* (2014) 7:2560–2569.

THARANATHAN, R. N. Food-derived carbohydrates: Structural complexity and functional diversity. *Critical Reviews in Biotechnology.* v.22, p.65-84, 2002.

THIJSSSEN, H.A.C.; RULKENS, W.H. (1968). Retention on aromas in drying food liquids. *De Ingenieur*, 47, 45–56.

THOMAS, S.; PAUL, S. A.; POTHAN, L. A.; DEEPA, B. Natural Fibers: Structure, Properties and Applications. In: Kalia, S.; Kaith, B. S;

Kaur, I. Cellulose Fibers: Bio- and Nano- Polymer Composites, Springer-Verlang Berlin Heidelberg, 2011.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol. Journal of Food Science- Vol. 70. Nr. 3. 2005.

THYGESEN, A.; ODDERSHEDE, J.; LILHOLT, H.; THOMSEN, A. B.; STAHL, K. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. Cellulose (2005) 12:563–576.

TISCHER, P. C. S. F.; SIERAKOWSKI, M. R.; WESTFAHL, H.; TISCHER, C. A. Nanostructural reorganization of bacterial cellulose by ultrasonic treatment. Biomacromolecules. v. 11, p. 1217– 1224, 2010.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 29, n. 2, p. 444-450, 2009.

TURINA, A. D. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. Biophys. Chem. 122. 101–113.

ULTEE, A.; KETS, E. P.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology. 65(10). 4606-4610. 1999.

VALENCIA-CHAMORRO, S. A.; PALOU, L.; DEL RIO, M. A.; PEREZ-GAGO, M. B. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by Hydroxypropyl Methylcellulose-Lipid Edible Composite Films Containing Food Additives with Antifungal Properties. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 11270–11278.

VANDEPUTTE, G. E.; DELCOUR, J. A. From sucrose to starch granule physical behavior: a focus on rice starch. Carbohydrate Polymers. v.58, p.245-266, 2004.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova, n.3, v.28, p. 519-528, 2005.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; MARIN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*. v. 89. p. 145-154. 2003.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; VAN BEEST, M.; KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology*. Cambridge, v.10, n.3, p.77-86, 1999.

VICENTINI, N. M. Elaboração e caracterização de filmes comestíveis a base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2003.

VIMALANATHAN, S.; HUDSON, J. Anti-influenza virus activities of commercial oregano oils and their carriers. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (07); 2012: 214-218.

WANG, B.; SAIN, M. Isolation of nanofibers from soybean source and their reinforcing capability on synthetic polymers. *Composites Science and Technology*. 67 (2007), pp. 2521–2527.

WANG, S.; CHENG, Q. A novel process to isolate fibrils from cellulose fibers by high-intensity ultrasonication. Part 1: Process optimization. *Journal of Applied Polym. Sci.* v. 113, p. 1270–1275 2009.

WEBER, F. J.; DE BONT, J. A. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochima Biophysica Acta*. 1996, 1286 (3) :225-45.

WEECHARANGSAN, W.; SITHITHAWORN, W.; SIRIPONG, P. Citotoxic activity of essential oils of *Mentha* spp. on human carcinoma cells. *J Health Res*. 2014: 28(1); 9-12.

WOLLERDORFER, M.; BADER, H. Influence of natural fibers on the mechanical properties of biodegradable polymers. *Industrial Crops and Products*, v. 8, p. 105-112, 1998.

YAMAGUCHI, K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; PEDROSA, T. N.; VASCONCELLOS, M. C.; LIMA, E. S. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma Lauraceae rica em geranato de metila. Quím. Nova vol.36 no.6 São Paulo, 2013.

YANG, L.; PAULSON, A. T. Mechanical and water vapor properties of edible gellan films. Food Research International, v. 33, p. 563-570, 2000.

YANG, J. H.; YU, J. G.; MA, X. F. Preparation and properties of ethylenebisformamide plasticized potato starch (EPTPS). Carbohydr Polym 2006; 63:218–23.

YOUSEFI, S.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOUSAVI, S. M. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum* L.). Journal of Food Science and Technology, v. 48, n. 6, p. 677-684, 2011.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. Prog. Polym. Sci. 3, 576–602, 2006.

ZAVALA, J. F. A.; VALDEZ, H. S; LEON, A. G.; PARRILLA, E. A.; BELLOSO, O. M.; AGUILAR, G. A. G. Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in *b*-cyclodextrin. J Incl Phenom Macrocycl Chem (2008) 60:359–368.

ZHAO, H-P.; FENG, X-Q.; GAO, H. Ultrasonic technique for extracting nanofibers from nature materials. Applied Physics Letters 90, (2007).

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. Meat Science 82 (2009) 338–345.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. Journal of Food Science. Vol. 70, Nr. 1, 2005.