



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Renata Cerruti da Costa

**Embalagens biodegradáveis de poli(hidroxibutirato-co-
hidroxivalerato)/nanopartículas de argila/óleos essenciais para aplicação como
filmes antimicrobianos em alimentos**

Florianópolis

2023

Renata Cerruti da Costa

Embalagens biodegradáveis de poli(hidroxi-butilato-co-hidroxi-valerato)/nanopartículas de argila/óleos essenciais para aplicação como filmes antimicrobianos em alimentos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais com ênfase em Polímeros.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Nardini Carli

Florianópolis

2023

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

da Costa, Renata Cerruti

Embalagens biodegradáveis de poli(hidroxibutirato-co hidroxivalerato)/nanopartículas de argila/óleos essenciais para aplicação como filmes antimicrobianos em alimentos / Renata Cerruti da Costa ; orientadora, Larissa Nardini Carli, 2023.

132 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2. poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). 3. Embalagens ativas. 4. Nanocompósitos. 5. Aditivos antimicrobianos. I. Carli, Larissa Nardini. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. III. Título.

Renata Cerruti da Costa

Embalagens biodegradáveis de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)/nanopartículas de argila/óleos essenciais para aplicação como filmes antimicrobianos em alimentos

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Camila Baldasso, Dra.
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Profa. Marília Miotto, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina – USFC

Prof. Guilherme Mariz de Oliveira Barra, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Ciência e Engenharia de Materiais

Prof. Dr. João Batista Rodrigues Neto
Coordenador do Programa

Profa. Dra. Larissa Nardini Carli
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Profa. Dra Larissa Nardini Carli, por ter acreditado na nossa parceria e em nosso trabalho desde o início das conversas. Agradeço por toda confiança, toda dedicação, pelo incentivo em minhas apresentações e pela paciência nos últimos momentos de escrita. Sua colaboração e, desde sempre, amizade, foram essenciais para que o nosso trabalho sempre tivesse sido desenvolvido com entusiasmo e curiosidade.

Agradeço aos meus pais e a minha família, por todo suporte e por acreditar nas minhas escolhas. Por todo o incentivo à minha intensa luta acadêmica.

Agradeço a todos as colegas de laboratório, que contribuíram com boas conversas e parcerias para o desenvolvimento de alguma atividade prática no laboratório: Pâmela Rosa, Ana Paula Ineichen, Daniele Malvessi, Pâmela Xavier, Fernanda Yumi, Daiane Mara Bobermim.

Agradeço aos professores, Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini, Prof. Dr. Cristiano da Silva Teixeira e Prof. Dr. Tales da Silva Daitx, por toda a ajuda com equipamentos, realização de análises e pela imediata, disponibilidade em ajudar.

Agradeço, especialmente, a Profa. Marília Miotto, do departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, por acreditar em nosso estudo e embarcar conosco numa parceria que foi iniciada em tão pouco tempo. Agradeço por toda sua disponibilidade, ajuda e ensinamento sobre microbiologia e alimentos. Agradeço a colega, Daiane Mara Bobermin, por toda a ajuda na execução dos ensaios.

À Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo, da Universidade de Caxias de Sul, à Profa Dra. Raquel S. Mauler, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e ao Prof. Dr. Guilherme Barra, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela ajuda com equipamentos para a condução de algumas análises do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de fomento (Edital 03/2017 FAPESC) e apoio financeiro para esta pesquisa.

RESUMO

Embalagens ativas são materiais associados a produtos alimentícios que permitem interação entre o material da embalagem e o meio de acondicionamento de alimentos, entregando alguma propriedade funcional ao produto, como a inibição do crescimento microbiano em alimentos, permitindo aumento do seu tempo de prateleira. O objetivo deste trabalho foi produzir filmes de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) - (PHBV) para aplicação como embalagens ativas, através da incorporação de aditivos específicos que possam agregar atividade antimicrobiana aos filmes, como óleos essenciais (OE) e, além disso, incorporar nanopartículas de argila para melhorar as propriedades físico-químicas e de barreira da matriz polimérica. As nanopartículas usadas foram haloisita, caulinita e sepiolita. Os filmes de PHBV foram produzidos por processamento no estado fundido e moldagem por compressão. Ensaio qualitativos de infravermelho e microscopia comprovaram a incorporação dos aditivos à matriz polimérica. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu identificar a homogeneidade na dispersão da sepiolita frente às demais cargas. Esse efeito influenciou diretamente as propriedades térmicas e mecânicas dos materiais, aumentando o módulo de armazenamento (E'). Ensaio de permeabilidade também foram realizados, indicando que a combinação polímero/nanopartícula reduz em 70% ou mais a permeabilidade do oxigênio nos compósitos. A nanopartícula com melhor desempenho, quando combinado ao óleo essencial de orégano, foi a sepiolita. Posteriormente à avaliação da carga inorgânica, foram usados diferentes óleos essenciais com princípios ativos distintos: óleo essencial de orégano, óleo essencial de alecrim e óleo essencial de manjeriço. Os óleos foram caracterizados usando cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG-MS), permitindo identificar o componente químico majoritário em cada um e, conseqüentemente, o coeficiente de partição de cada óleo no meio de liberação proposto. O processo de liberação de compostos ativos foi monitorado por ensaios em ácido acético 3% v/v, simulando o ambiente de alimentos lácteos segundo Regulamento da Comissão (UE) nº 10/2011. O ambiente proposto visa à aplicação dos filmes como embalagens para queijos, uma vez que as características sensoriais dos óleos usados podem ser associadas a tais alimentos salgados. O tipo de OE, a presença da argila, e o meio simulador utilizado interferiu na liberação do ativo nos filmes. Os materiais foram testados em termos de sua atividade antimicrobiana contra duas bactérias de importância em alimentos: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). Os resultados favorecem a aplicação dos filmes como agentes antimicrobianos, apresentando inibição de 99,9% na contagem microbiológica nos filmes contendo óleo de orégano, óleo de orégano e sepiolita e óleo de manjeriço. Nos filmes contendo óleo de alecrim, a redução foi de apenas 6,3% frente a *E. Coli*. Ensaio *in situ* foram propostos, a fim de confirmar a aplicação como embalagem ativa em queijo muçarela. Os filmes de PHBV/óleo de orégano/sepiolita ficaram em contato com o queijo por 30 dias em presença de uma suspensão inicial de *E. Coli* e *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). A contagem microbiológica foi menor em relação ao filme plástico usado como controle, demonstrando o potencial dos filmes de PHBV/óleo de orégano/sepiolita como materiais para aumentar o tempo de vida de prateleira de queijos.

Palavras-chave: poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato); embalagens ativas; nanocompósitos poliméricos; liberação controlada; aditivos antimicrobianos.

ABSTRACT

Active packaging are materials associated with food products that allow interaction between the packaging material and the food packaging medium, delivering some functional property to the product, such as inhibition of microbial growth in food, allowing an increase in its shelf life. The objective of this work was to produce poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) - (PHBV) films for application as active packaging, through the incorporation of specific additives that can add antimicrobial activity to the films such as essential oils (EO), in addition to incorporate clay nanoparticles to improve the physical-chemical and barrier properties of the polymeric matrix. The nanoparticles used were halloysite, kaolinite and sepiolite. PHBV films were produced by melt processing and compression molding. Qualitative infrared and microscopy tests confirmed the incorporation of additives to the polymeric matrix. Scanning electron microscopy (SEM) allowed identifying the homogeneity in the sepiolite dispersion compared to the other fillers. This effect directly influenced the thermal and mechanical properties of the materials, increasing the storage modulus (E'). Permeability tests were also performed, indicating that the polymer/nanoparticle combination reduces the oxygen permeability of the composites by 70% or more. The nanoparticle with the best performance, when combined with oregano essential oil, was sepiolite. After evaluating the inorganic nanoparticle, different essential oils with different active principles were used: oregano essential oil, rosemary essential oil and basil essential oil. The oils were characterized using gas chromatography coupled to mass spectrum (GC-MS), allowing to identify the major chemical component in each one and, consequently, the partition coefficient of each oil in the proposed release medium. The process of release of the active compounds was monitored by tests in acetic acid 3% v/v, simulating the environment of dairy foods according to Commission Regulation (EU) No. 10/2011. The proposed environment aims at the application of films as packaging for cheeses, since the sensory characteristics of used oils can be associated with such salty foods. The type of EO, the presence of clay, and the simulating medium used interfered with the release of the active in the films. The materials were tested by their antimicrobial activity against two important food bacteria: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*). The results favor the application of the films as antimicrobial agents, showing a 99.9% inhibition in the microbiological count in the films containing oregano oil, oregano oil and sepiolite and basil oil. In films containing rosemary oil, the reduction was only 6.3% against *E. Coli*. *In situ* tests were proposed in order to confirm the application as active packaging in mozzarella cheese. The PHBV/oregano oil/sepiolite films were in contact with the cheese for 30 days in the presence of an initial suspension of *E. Coli* and *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). The microbiological count was lower in relation to the plastic film used as a control, demonstrating the potential of PHBV/oregano oil/sepiolite films as materials to increase the shelf life of cheeses.

Keyword: poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate); active packaging; polymer nanocomposites; controlled release, antimicrobial additives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática genérica da produção via fermentação de polihidroxicanoatos (PHA)	19
Figura 2: Estrutura química do PHBV, representando a porção HB e HV	21
Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de PHBV após diferentes tempos de compostagem	21
Figura 4: Imagens de MEV (A) e (C) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (B) de nanopartículas de caulinita (A), haloisita (B) e sepiolita (C).....	24
Figura 5: Tipos de embalagens antimicrobianas	28
Figura 6: Aspecto visual de uvas brancas embaladas com polietileno (controle) e filmes antimicrobianos contendo óleo de citronela, nanopartículas de prata e diferentes concentrações de nanopartículas de zinco ao longo de 14 dias.....	29
Figura 7: Número de publicações anuais relacionadas a óleos essenciais e embalagens de alimentos.....	31
Figura 8: Esquema ilustrativo de uma embalagem ativa contendo agentes antimicrobianos e componentes específicos para controle da permeabilidade a gases nos filmes	34
Figura 9: Esquema ilustrativo do modo de liberação de ativos antimicrobianos em uma matriz polimérica ao longo do tempo.....	35
Figura 10: Análise qualitativa do morango, usando filme nanocompósito na embalagem (A), morangos inoculados com <i>B. cinerea</i> sem óleo na formulação dos filmes (B) e com filme de LDPE-OMt-carvacrol/timol após cinco dias de tratamento em condições ambientes (C).....	36
Figura 11: Granulometria dos materiais após moagem (A) e aparência dos filmes após prensagem a quente (B-C).	42
Figura 12: Mesas utilizadas nos ensaios de liberação: com agitação pendular (A) e agitação orbital (B)	47
Figura 13: Desenho esquemático do procedimento segundo norma JIS 2801:2000: cobertura da amostra com o inóculo (1); cobertura do inóculo com um filme inerte de dimensão menor (2); e incubação dos filmes sob atmosfera úmida por 24 h (3).	49
Figura 14: Filme de POS dimensionados em quadrados de 4 cm x 4 cm sob luz UV (A), manipulação dos queijos para corte (B), e acondicionamento dos queijos e filmes em embalagens plásticas para a condução dos ensaios (C)	50

Figura 15: Torque em função do tempo de processamento das diferentes formulações propostas	53
Figura 16: Espectro FTIR-DRIFT das nanopartículas inorgânicas	54
Figura 17: FTIR-ATR para o óleo essencial de orégano	55
Figura 18: FTIR-ATR para o filme de PHBV (A) e para os diferentes filmes de PHBV, sem e com óleo de orégano (B)	56
Figura 19: Análise comparativa das transmitâncias dos filmes de PHBV versus os filmes de PHBV puro (A) e as composições PO (B), PHal (C), POHal (D), PCau (E), POCau (F), PSep (G) e POsep (H).....	58
Figura 20: Micrografias das nanopartículas de haloisita (A-B), caulinita (C-D) e sepiolita (E-F) em 2500x e 5000x.....	60
Figura 21: Micrografias dos nanocompósitos (à esquerda) e dos respectivos filmes com óleo de orégano (à direita): P(A); PHal (B); PCau (C); PSep (D); PO (E); POHal (F); POCau (G) e POsep (H)	62
Figura 22: Curva de TGA para o filme de PHBV produzido.....	63
Figura 23: Curvas de TGA das nanopartículas de haloisita, caulinita e sepiolita (A) e respectivas curvas de dTG (B)	64
Figura 24: Curva de TGA do óleo de orégano e das diferentes formulações de filmes (A), ampliação na temperatura de volatilização do óleo (B) e ampliação na temperatura de degradação do PHBV (C)	66
Figura 25: Curvas de cristalização (A) e fusão (B) para os filmes de PHBV	69
Figura 26: Morfologia dos esferulitos obtidas por microscopia óptica com luz polarizada para P (A), PHal (B), PCau (C), PSep (D), PO (E), POHal (F), POCau (G) e POsep (H).....	70
Figura 27: Módulo de armazenamento (E') e módulo de perda (E'') obtido nos ensaios de DMA.....	72
Figura 28: Curvas de tan δ para os diferentes nanocompósitos	74
Figura 29: Resultados de permeabilidade ao oxigênio dos diferentes filmes preparados.	76
Figura 30: Espectro UV do óleo de orégano em ácido acético (A) e curva analítica construída para a quantificação do ensaio de liberação (B).....	77
Figura 31: Curva de liberação do óleo de orégano em ácido acético com ajuste cinético usando modelo de Korsmeyer-Peppas	78
Figura 32: Cromatograma do óleo de orégano (A), óleo de alecrim (B) e óleo	

essencial de manjeriço (C).....	84
Figura 33: Espectro FTIR-ATR do óleo de alecrim.....	85
Figura 34: Espectro FTIR-ATR do óleo de manjeriço.....	86
Figura 35: Espectro FTIR-ATR do PHBV e das diferentes formulações de filmes ativos.....	87
Figura 36: Torque final após 6 min de processamento para as misturas de PHBV/Sepiolita contendo diferentes óleos essenciais.....	89
Figura 37: Morfologia dos filmes: P(A); P Sep (B); PO (C); PO Sep (D); PA (E); PA Sep (F); PM (G) e PM Sep (H).....	90
Figura 38: Curva de perda massa para óleo essencial de alecrim (A) e óleo essencial de manjeriço (B).....	92
Figura 39: Termograma para os filmes preparados com diferentes óleos essenciais na faixa de 30 °C a 700 °C (A) e ampliação na faixa de 270 °C até 340 °C (B).....	93
Figura 40: Perda de massa obtida associada aos diferentes filmes até 300 °C.....	94
Figura 41: Curvas de cristalização (A) e de fusão cristalina durante o segundo aquecimento (B) para os filmes com diferentes óleos essenciais.....	97
Figura 42: Módulo de armazenamento (E') e módulo de perda (E'') obtido nos ensaios de DMA.....	99
Figura 43: Curvas de tan δ para os filmes com diferentes óleos essenciais.....	100
Figura 44: Perfil das gotas obtidas no ensaio de ângulo de contato para os filmes contendo diferentes óleos essenciais.....	101
Figura 45: Permeabilidade ao oxigênio dos filmes preparados usando diferentes óleos essenciais, com e sem nanopartículas.....	103
Figura 46: Espectro UV e respectiva curva analítica para quantificação do ensaio de liberação dos óleos de alecrim (A) e (B) e manjeriço (C) e (D)......	104
Figura 47: Curvas de liberação dos diferentes óleos essenciais nos filmes de PHBV, com e sem a presença de sepiolita.....	105
Figura 48: Atividade antimicrobiana <i>in situ</i> dos filmes, por contato direto em queijo muçarela.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos filmes produzidos durante cada etapa do trabalho	41
Tabela 2: Resultados de RMSE dos espectros após análise de FTIR/ATR.....	59
Tabela 3: Temperaturas de degradação e percentual de incorporação dos aditivos após processamento	67
Tabela 4: Resultados térmicos obtidos por DSC	71
Tabela 5: Módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e temperatura de transição vítrea (Tg) obtidos por DMA.....	73
Tabela 6: Parâmetros obtidos no DDSolver para o modelo de Korsmeyer-Peppas. .	79
Tabela 7: Contagem microbiológica em filmes de PHBV com óleo de orégano calculada por ensaio de contato direto contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	80
Tabela 8: Relação entre os espectros FTIR-ATR de PHBV e dos filmes contendo diferentes óleos essenciais	88
Tabela 9: Resultados de TGA quanto à temperatura de degradação para as diferentes formulações de filmes e estimativa de teor de aditivo incorporado.	95
Tabela 10: Transições térmicas obtidas por DSC para as diferentes formulações de filmes e grau de cristalinidade (Xc) correspondente.....	98
Tabela 11: Módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e temperatura de transição vítrea (Tg) obtidos por DMA.....	100
Tabela 12: Medidas de ângulo de contato para as diferentes formulações de filmes	101
Tabela 13: Parâmetro de solubilidade (δ) e coeficiente de partição ($K_{P/L}$) do PHBV, do meio de liberação e dos óleos utilizados no ensaio.	107
Tabela 14: Resultados de atividade antimicrobiana por ensaio de contato direto contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> para os filmes com diferentes óleos essenciais	108
Tabela 15: Contagem de suspensões bacterianas na superfície dos queijos cobertos com o filme antimicrobiano desenvolvido com PHBV/óleo de orégano/sepiolita.....	110

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS A SEREM ALCANÇADOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	MATRIZES BIODEGRADÁVEIS E USO EM EMBALAGENS.....	17
3.1.1	Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) – PHBV	18
3.2	NANOCOMPÓSITOS E A INFLUÊNCIA NAS PROPRIEDADES DE BIOPOLÍMEROS.....	22
3.2.1	Argilas e propriedades ajustadas em embalagens.....	23
3.3	EMBALAGENS ATIVAS	26
3.3.1	Óleos essenciais associados à atividade antimicrobiana	28
3.3.2	Agentes antimicrobianos e argilas: Otimização de propriedades e liberação controlada	33
3.3.3	Aplicações dos filmes em produtos lácteos	37
4	MATERIAIS E METODOLOGIA.....	40
4.1	MATERIAIS.....	40
4.2	PREPARAÇÃO DOS FILMES	41
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	43
4.3.1	Características de processamento dos materiais	43
4.3.2	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS).....	43
4.3.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	43
4.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.3.5	Análise termogravimétrica (TGA).....	44
4.3.6	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	44
4.3.7	Microscopia óptica (MO)	45
4.3.8	Análise térmica dinâmico-mecânica (DMA)	45
4.3.9	Ângulo de contato	46
4.3.10	Permeabilidade ao oxigênio	46
4.3.11	Estudo da liberação controlada dos óleos essenciais.....	46
4.3.12	Atividade antimicrobiana dos filmes contendo óleos essenciais	48
4.3.13	Aplicação dos filmes em queijo muçarela.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES CONTENDO ÓLEO DE ORÉGANO E SELEÇÃO DA NANOPARTÍCULA INORGÂNICA.....	52

5.1.1	Torque durante o processamento	52
5.1.2	FTIR.....	54
5.1.3	MEV.....	59
5.1.4	Propriedades térmicas: TGA, DSC e MO	63
5.1.5	DMA	71
5.1.6	Permeabilidade ao oxigênio	74
5.1.7	Estudo de liberação controlada do óleo de orégano	76
5.1.8	Atividade antimicrobiana segundo JIS Z 2801:2000.....	80
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES CONTENDO SEPIOLITA E ALTERANDO O ATIVO ANTIMICROBIANO.....	83
5.2.1	CG/MS.....	83
5.2.2	FTIR.....	84
5.2.3	Torque durante o processamento	88
5.2.4	MEV.....	89
5.2.5	Propriedades térmicas: TGA, DSC.....	91
5.2.6	DMA	98
5.2.7	Ângulo de contato	101
5.2.8	Permeabilidade ao oxigênio	102
5.2.9	Ensaio de liberação associado aos diferentes óleos essenciais	103
5.2.10	Atividade antimicrobiana segundo JIS2801:2006.....	108
5.2.11	Atividade antimicrobiana <i>in situ</i> avaliada em queijo muçarela	109
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
7	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	115
7.1	ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIODICOS.....	115
7.2	TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS DA ÁREA.....	116
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA	117

1 INTRODUÇÃO

A segurança de alimentos é uma grande necessidade para a indústria e para os consumidores, uma vez que há uma demanda por alimentos mais naturais, que sejam minimamente processados e com teor reduzido de conservantes químicos. A indústria de processamento de polímeros também vem enfrentando desafios para entregar ao mercado embalagens que possam ser mais favoráveis à degradação em ambiente adequado e que sejam produzidas sem a utilização de matéria prima de origem petroquímica. Pensando nisso, os estudos voltados para desenvolvimento de embalagens ativas biodegradáveis podem desempenhar um papel importante na qualidade geral e na segurança do produto alimentício.

A embalagem ativa, ao contrário da embalagem passiva convencional, envolve a interação entre o alimento, o material de embalagem e o seu ambiente interno. A pesquisa e o desenvolvimento desses materiais visam agregar propriedades funcionais às embalagens, utilizando materiais que apresentem características antimicrobianas e antioxidantes, por exemplo. O uso de filmes poliméricos como portadores e carreadores de agentes antimicrobianos permite uma liberação progressiva do composto no meio de acondicionamento do produto, conferindo à embalagem características químicas de combate à deteriorização microbiana, atrasando a proliferação de organismos patogênicos e deteriorantes na superfície do alimento, aumentando assim a segurança e a qualidade do produto ao longo do armazenamento. Por esse motivo, o ajuste da liberação do ativo antimicrobiano ao longo do armazenamento é um fator crucial para garantir eficácia antimicrobiana (FERNÁNDEZ-PAN et al., 2015).

Dentre as formas de controle de microrganismos indesejáveis em alimentos, o uso de agentes antimicrobianos naturais representa uma estratégia interessante para embalagens biodegradáveis, principalmente devido à sua origem natural e suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, permitindo o desenvolvimento de sistemas ativos com o objetivo de prolongar a vida útil e agregar valor ao produto alimentício (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). Tais agentes incluem extratos de diversas plantas, destacando o óleo de orégano, óleo de canela, cravo, tomilho e alecrim (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Nos materiais utilizados em embalagens ativas destacam-se os filmes à base de quitosana, por já possuírem intrinsecamente propriedades antimicrobianas

(SOUZA et al., 2019). Porém, quando incorporados a esses materiais compostos hidrofóbicos antimicrobianos, as propriedades mecânicas e de liberação do ativo podem ser prejudicadas devido à baixa interação entre a fase dispersa oleosa e a matriz polimérica hidrofílica. Outros polímeros biodegradáveis podem ter suas propriedades ajustadas para a aplicação de interesse, como é o caso do poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) – PHBV.

O PHBV é um poliéster biocompatível e biodegradável. É produzido preferencialmente por via metabólica, através de rota microbiana. As aplicações de PHBV em sistemas biomédicos é extensamente estudada. Porém, o uso desse material associado a agentes antimicrobianos ainda é limitado, permitindo que o desenvolvimento de novos estudos possa contribuir na obtenção de novas embalagens ativas para alimentos (FANG et al., 2017).

A incorporação de óleos essenciais em matrizes poliméricas, entretanto, pode promover alterações nas propriedades físicas destes materiais, dependendo da interação polímero-óleo. Para aumentar a eficácia das embalagens funcionais e melhorar as propriedades físicas dos filmes de PHBV, pode-se também incorporar nanopartículas de argila. As nanopartículas apresentam uma série de vantagens como atoxicidade, melhoria das propriedades mecânicas e formação de obstáculos na matriz polimérica, capazes de atuar como barreira a permeação de gases e vapor d'água, evitando assim que o alimento perca suas características sob a influência do ambiente externo (KHALAJ et al., 2016).

Muitos estudos fazem uso da incorporação de nanopartículas de argila em filmes poliméricos para agregar propriedades de barreira. No entanto, muitos destes, acabam por acrescentar uma etapa prévia de tratamento químico dessas nanopartículas para diminuir a sua aglomeração e favorecer a sua dispersão na matriz polimérica. Essa modificação acaba sendo uma etapa adicional e com o uso de solventes no desenvolvimento dos filmes poliméricos.

Assim, o presente trabalho visa desenvolver uma estratégia simplificada para a produção de embalagens ativas, evitando a utilização de solventes e modificação química dos componentes da embalagem, a fim de obter um material de embalagem com propriedades funcionais aprimoradas, tendo em vista a inclusão de óleos essenciais como aditivos antimicrobianos em filmes de PHBV contendo nanopartículas de argila.

2 OBJETIVOS A SEREM ALCANÇADOS

O objetivo geral do trabalho consiste em preparar filmes de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) – PHBV com a incorporação de nanopartículas de argila de diferentes morfologias (haloisita, caulinita e sepiolita) combinado à inclusão de diferentes óleos essenciais (óleo essencial de orégano, óleo essencial de alecrim e óleo essencial de manjeriço) para aplicação desses materiais em embalagens de alimentos com propriedades antimicrobianas. Para tanto, alguns objetivos específicos devem ser atingidos:

- Analisar o efeito de três diferentes cargas inorgânicas (haloisita, caulinita e sepiolita) nos filmes e compreender a relação entre a morfologia de cada nanopartícula nas propriedades térmicas, mecânicas e de barreira resultantes;
- Determinar o nanocompósito que melhor se ajusta às condições de processamento e características de barreira desejadas ao filme de PHBV;
- Incorporar diferentes óleos essenciais aos nanocompósitos (óleo essencial de orégano, manjeriço e alecrim), visando compreender a sinergia entre o óleo e a nanopartícula, bem como o efeito de inibição antimicrobiana dos compostos ativos;
- Acompanhar a liberação de diferentes óleos essenciais impregnados aos filmes nanocompósitos de PHBV em meio simulador de alimentos, garantindo uma cinética de liberação apropriada para a aplicação desejada;
- Avaliar a atividade antimicrobiana através de contato direto dos filmes com uma suspensão inicial de bactérias, a fim de confirmar a capacidade desses ativos naturais em reduzir e/ou inibir a contagem microbiológica, e conseqüentemente, garantir a manutenção da qualidade do alimento;
- Comprovar o desempenho dos filmes de PHBV/sepiolita/óleo essencial de orégano no ambiente real do alimento, aplicando os filmes desenvolvidos em queijo muçarela carregado com uma suspensão inicial de bactérias, avaliando a contagem microbiológica ao longo de 30 dias de ensaio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, a produção de materiais poliméricos e a grande demanda por insumos ambientalmente corretos visa substituir parcialmente os materiais de origem petroquímica, buscando a produção de materiais oriundos de recursos renováveis ou com propriedades menos agressivas ao ambiente. Especificamente no setor de embalagens e alimentos, o uso de materiais poliméricos é vantajoso pelo baixo custo de produção, baixo custo de transporte e propriedades adequadas à aplicação como proteção do alimento.

Expandindo a discussão, no cenário recente em que foi necessário priorizar a proteção individual devido à pandemia de COVID-19 (Corona Vírus Disease 2019), o uso de descartáveis e a segurança de alimentos passou a ter uma enorme importância na aquisição de novos produtos e no acesso a comestíveis, evitando a manipulação direta de alimentos e o contato do mesmo com o ambiente externo (PATRÍCIO SILVA et al., 2021). O consumo elevado e o descarte inadequado dos materiais, que já causavam diversos problemas ambientais, se tornou ainda mais preocupante após toda essa produção de descartáveis e por isso, grandes esforços devem ser destinados aos estudos de materiais biodegradáveis, ou seja, matrizes poliméricas que possam se decompor com mais facilidade quando descartados em locais apropriados.

Portanto, visando à aplicação em embalagens para alimentos, o material deve ser capaz de manter a qualidade e segurança dos produtos alimentícios durante o transporte e armazenamento, além de estender o tempo de vida útil de prateleira. Para executar tais funções, os materiais da embalagem devem fornecer proteção física e condições físico-químicas adequadas para impedir o ganho ou a perda de umidade, prevenir a contaminação microbiana e agir como uma barreira contra a permeação de vapor de água, oxigênio, dióxido de carbono e outros compostos voláteis que possam contaminar ou causar alteração no aroma e sabor do alimento (RHIM; PARK; HA, 2013).

3.1 MATRIZES BIODEGRADÁVEIS E USO EM EMBALAGENS

Os materiais convencionais que lideram o mercado de embalagens são provenientes de fontes petroquímicas, como o polietileno – PE, polipropileno – PP e poli(tereftalato de etileno) – PET. Esses materiais apresentam propriedades térmicas

e mecânicas adequadas à aplicação. Entretanto, o uso destes plásticos convencionais precisa ser repensado, uma vez que seus longos ciclos de degradação representam sérias ameaças ecológicas ao meio ambiente. Por isso, o emprego de sistemas matriciais constituídos por polímeros biodegradáveis é uma das estratégias disponíveis para o atual setor de embalagens, principalmente devido à atual demanda por descartáveis plásticos e a necessidade de desenvolver alternativas menos agressivas de descarte no meio ambiente. Esses sistemas poliméricos apresentam diversidade quanto ao caráter hidrofílico/hidrofóbico, velocidade de degradação e características físico-químicas, sendo empregados de acordo com a aplicação desejada (SIRACUSA et al., 2008).

Dentre os biopolímeros pertencentes à classe de polímeros biodegradáveis, encontram-se os poliésteres alifáticos, tais como: poli(ácido láctico) – PLA e o poli(ácido glicólico) – PGA e seus copolímeros (PLGA). Esses materiais podem ser obtidos a partir de recursos renováveis, sendo produzidos por reações químicas de policondensação entre um glicol e ácido dicarboxílico alifático. Enquanto alguns biomateriais demandam uma rota química, outros não necessitam de nenhuma demanda oriunda de fonte petroquímica. Os polihidroxialcanoatos (PHA) são uma classe de poliésteres produzidos por bactérias. Para a produção destes bioplásticos é utilizado um sistema de cultivo em dois estágios, na qual usa-se uma matéria prima orgânica como fonte de carbono, seguida pela limitação de nitrogênio e oxigênio, sob condições autotróficas, usando uma mistura gasosa de H₂, O₂ e CO₂ em um processo fermentativo. O tipo de polímero vai depender da forma de produção, da bactéria selecionada e do substrato que será utilizado como fonte de carbono, sendo produzidos polímeros e copolímeros como o poli(3-hidroxiбутирато) – PHB, poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxihexanoato) – PHBH, e o poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуalerato) – PHBV.

Visando um material com características de biocompatibilidade e biodegradabilidade aliado com boa processabilidade, os biopolímeros à base de polihidroxialcanoatos, especificamente o PHBV, são uma opção promissora no campo de embalagens (CARLI et al., 2013; SINGH; SEN; VIDYARTHI, 2017).

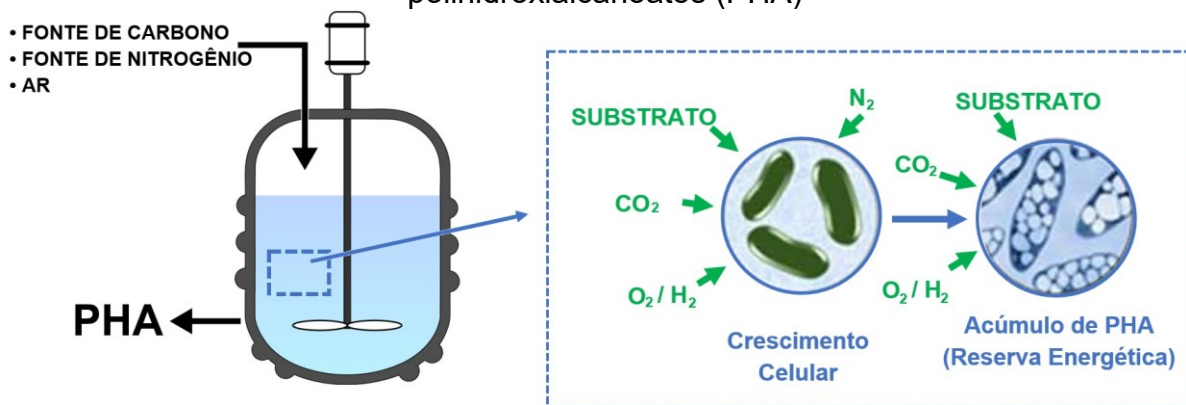
3.1.1 Poli(hidroxiбутирато-co-hidroxiуalerato) – PHBV

Como mencionado, a produção de PHBV não depende de rota petroquímica, sendo essencialmente obtido por rota microbiana. Nos últimos anos, o controle

cuidadoso das condições de fermentação e da fonte de carbono na manipulação de bactérias levou à síntese de uma variedade de copolímeros de PHA, onde o PHBV se destaca por apresentar propriedades físicas similares a polímeros *commodities* como o PP (SIRACUSA et al., 2008).

O processo de fermentação acontece em basicamente duas etapas, em um processo aeróbico (respiração celular em presença de oxigênio). Na primeira etapa, as bactérias são alimentadas com fonte de carbono e de nitrogênio, nutrientes essenciais para o crescimento de biomassa celular. O polímero passa a ser produzido em uma segunda etapa da fermentação, quando a alimentação das células se torna limitada para um nutriente, por exemplo, quando diminui a fonte de nitrogênio. Com isso, as bactérias passam a converter a fonte de carbono em monômero e posteriormente polímero, em inclusões semiesféricas no interior das células, funcionando como reserva energética (KHANNA; SRIVASTAVA, 2006). O esquema ilustrativo do processo fermentativo para a produção de PHA é apresentado na Figura 1.

Figura 1: Representação esquemática genérica da produção via fermentação de polihidroxialcanoatos (PHA)



Adaptado de GARCIA-GONZALEZ et al., 2015

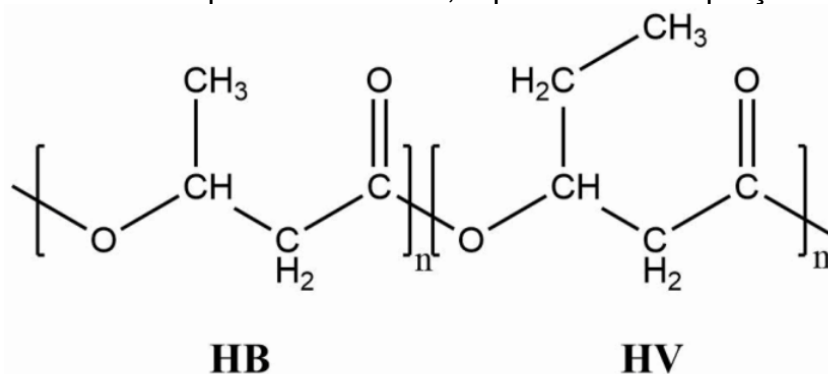
O PHBV pode ser produzido por várias espécies bacterianas, sendo a *Cupriavidus necator* (*C. necator*) a mais estudada na produção de PHA. O polímero pode se acumular em níveis em torno de 90% da massa seca da célula (GHYSELS et al., 2018). *C. necator* é uma bactéria oxidante de hidrogênio, Gram negativa, capaz de crescer e acumular PHA. É considerada um organismo metabolicamente versátil, uma vez que pode apresentar crescimento heterotrófico (utilizando compostos orgânicos como fonte de carbono e energia) e crescimento autotrófico

(utilizando substratos gasosos como CO₂ como fonte de carbono e H₂ como fonte de energia) (CHEE et al., 2019; GHYSELS et al., 2018). O método de cultivo frequentemente usado a nível industrial utiliza uma mistura gasosa de CO₂, H₂ e O₂ tanto para o crescimento da massa celular quanto para o acúmulo de PHB (GARCIA-GONZALEZ et al., 2015). Alguns estudos também abordam a produção de PHB autotrófico a partir de crescimento de massa celular heterotrófica, usando um substrato orgânico. A escolha adequada da fonte de carbono influencia na taxa de crescimento celular, no metabolismo das enzimas e no custo da matéria-prima. Normalmente é usado frutose ou ácido acético como fonte de carbono para o crescimento da massa celular seguido pela produção de PHB autotrófico. O uso de frutose, no entanto, torna-se limitada por ser uma matéria-prima de alto custo, podendo ser substituída por glicose ou glicerol residual obtida do subproduto industrial da produção de biodiesel (GARCIA-GONZALEZ et al., 2015). Embora após a morte celular o polímero passe por um processo de extração da célula e purificação, pode haver um resquício de material celular da bactéria nos grânulos de PHBV. Com isso, é importante destacar que as bactérias não são patogênicas, uma vez que para a aplicação como matéria-prima em embalagens é desejável o controle para não gerar contaminação no processo produtivo.

Quanto às características físico-químicas do material de interesse, o PHBV é um copolímero composto por frações de PHB e polihidroxivalerato – PHV, sendo o balanço de hidroxibutirato/hidroxivalerato responsável por gerar materiais com diferentes propriedades mecânicas, grau de cristalinidade e propriedades de barreira a gases e vapor de água (LI; LOH, 2017). A fração de hidroxibutirato (HB) na cadeia de PHBV agrega características de rigidez no material, enquanto a cadeia de hidroxivalerato (HV), com maior porção de -CH₂, confere flexibilidade e reduz a temperatura de processamento do material (LIGHTFOOT VIDAL et al., 2016). A Figura 2 apresenta a estrutura química da molécula de PHBV.

O material segue o comportamento de um poliéster termoplástico e de cadeia linear. Além disso, é um polímero biocompatível e apresenta ligações ésteres na cadeia susceptíveis à degradação enzimática, e conseqüente biodegradabilidade, gerando produtos de degradação atóxicos (CARLI et al., 2014).

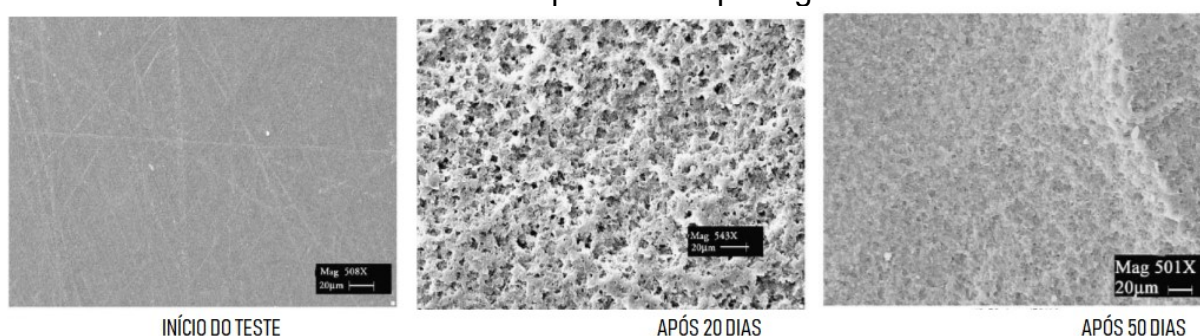
Figura 2: Estrutura química do PHBV, representando a porção HB e HV



Fonte: Próprio autor

Um estudo realizado por Luo et al. em 2003 verificou as alterações nas propriedades físicas e mecânicas do PHBV durante o processo de biodegradação por 50 dias em condições adequadas de descarte. Os autores também avaliaram a morfologia da superfície do material em diferentes tempos de compostagem, observando perda de massa e aumento na rugosidade da superfície já no período de 10 dias (LUO; NETRAVALI, 2003). A Figura 3 apresenta a ilustração do ensaio mencionado acima. Essa característica contribui para a utilização do PHBV em produtos descartáveis, visando à biodegradação do material e reduzindo o acúmulo de resíduos depositados em grandes aterros sanitários.

Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de PHBV após diferentes tempos de compostagem



Fonte LUO; NETRAVALI, 2003

Apesar de ser um polímero promissor, o uso do PHBV na indústria de embalagens é limitado devido ao seu elevado custo, a estreita janela de processamento térmico e sua natureza relativamente frágil (SHAKIL; MASOOD; YASIN, 2017). Deste modo, algumas estratégias são desenvolvidas para melhoria

destas propriedades, como a produção de misturas com outros polímeros (blendas) ou a adição de alguma carga de reforço (ARRIETA et al., 2014; DASAN; BHAT; AHMAD, 2017).

3.2 NANOCOMPÓSITOS E A INFLUÊNCIA NAS PROPRIEDADES DE BIOPOLÍMEROS

Os nanocompósitos poliméricos são definidos como materiais híbridos constituídos por uma fase em escala nanométrica (1-100 nm) dispersa em matriz polimérica. O destaque significativo nas propriedades térmicas, mecânicas e de barreira dos nanocompósitos depende da área específica e da dispersão dessas cargas, de modo que uma pequena quantidade de nanopartículas proporcione características novas ou superiores no material (CARLI et al., 2013). Além disso, ao contrário dos compósitos, esses aprimoramentos nas propriedades podem ser alcançados sem aumento na densidade, uma vez que uma quantidade muito pequena de 1 a 5% (em massa) de nanopartículas são incorporadas (PUGGAL et al., 2016).

Diversas são as possibilidades de aplicação de nanopartículas. Nanocompósitos poliméricos estão sendo usados em equipamentos esportivos para conferir leveza e flexibilidade; no setor automotivo para aumentar as propriedades mecânicas; na computação para melhorar a condutividade elétrica dos materiais; e em aplicações biomédicas para controlar o direcionamento de fármacos ou melhorar as propriedades mecânicas de implantes ósseos (ÖNER; İLHAN, 2016; SANCHEZ-GARCIA; GIMENEZ; LAGARON, 2008; SENATOV et al., 2017; WANG et al., 2007). No setor de embalagens, as nanopartículas vêm sendo frequentemente usadas como barreira a gases, visando controlar o ambiente de acondicionamento do alimento (ZABIHZADEH KHAJAVI et al., 2020).

Outra vantagem no uso de nanopartículas é a melhoria de propriedades termomecânicas. Alguns materiais orgânicos, como os polímeros, são materiais flexíveis, de baixa fragilidade e rigidez. À medida que as nanopartículas são adicionadas a uma matriz polimérica, essas partículas promovem uma alteração em sua microestrutura, promovendo melhorias nas propriedades mecânicas dos materiais (WU et al., 2020).

Existem inúmeras nanopartículas que são adicionadas em polímeros para a

melhoria de suas propriedades, como nanopartículas à base de carbono, nanofibras de celulose, e silicatos. A incorporação de nanopartículas de argila em polímeros biodegradáveis é considerada uma alternativa para melhorar o desempenho de embalagens, podendo ser usados baixos teores de carga para o aumento das propriedades (ÖNER; İLHAN, 2016). Estudos foram realizados combinando sepiolita com filmes de PHBV, sendo observado um aumento no alongamento na ruptura e na faixa de temperatura para processamento do material no estado fundido. O trabalho mostrou que a estabilidade térmica e a propriedade de barreira a gases dos filmes foram significativamente melhoradas. Além disso, estudos de biodegradação indicaram a conversão da estrutura cristalina dos nanocompósitos em filmes amorfos como resultado do efeito sinérgico dos processos de degradação abiótica e biótica. Estes resultados fornecem evidências sólidas sobre o uso de filmes nanocompósitos biodegradáveis para a indústria de embalagens de alimentos (SHAKIL; MASOOD; YASIN, 2017).

3.2.1 Argilas e propriedades ajustadas em embalagens

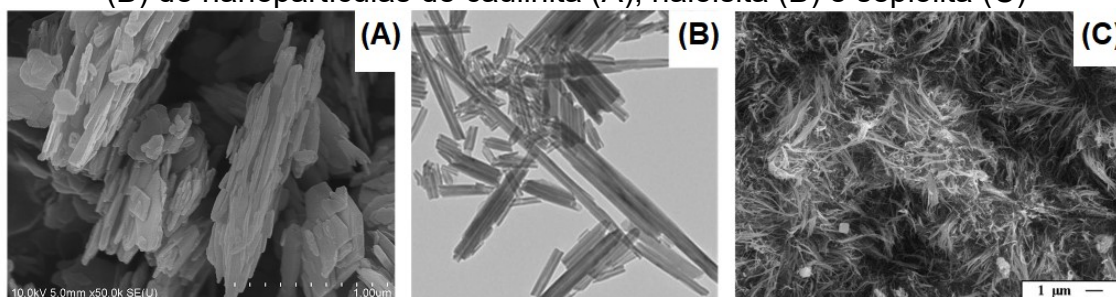
Como mencionado anteriormente, a principal carga usada em embalagens poliméricas são as argilas e a morfologia dessas nanopartículas influencia diretamente na interação polímero/carga e, conseqüentemente, nas propriedades dos materiais. De acordo com a morfologia das nanopartículas, as argilas podem ser encontradas como estruturas lamelares (como, por exemplo, montmorilonita (Mt) e caulinita (Cau)), tubulares (haloisita (Hal)) e nano-agulhas (sepiolita (Sep)). A caulinita é um mineral de silicato com características lamelares e composição química $Al_2Si_2O_5(OH)_4$. É constituída por uma folha tetraédrica de sílica (SiO_4) ligada através de átomos de oxigênio a uma folha octaédrica de alumina (AlO_6), permitindo que haja forte interação entre as lamelas. Essa argila apresenta dimensões na faixa de 150 nm, porém espessura de somente 1 nm, fator crucial para o aumento da área específica e conseqüente melhoria das propriedades mecânicas dos materiais. Entretanto, o aumento da área específica em nanopartículas lamelares acontece principalmente com a organofilização, aumentando a distância interlamelar e a compatibilidade com matrizes orgânicas poliméricas. Além disso, o aumento da distância interlamelar favorece a penetração de polímero entre as camadas de argila (POLA et al., 2016).

A haloisita é um silicato de alumínio do grupo do caulim, com composição

química semelhante à caulinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n = 0$ para a forma desidratada e $n = 2$ para a forma hidratada)) e morfologia tubular oca (JOUSSEIN et al., 2005). Na superfície externa do tubo são predominantemente encontrados grupos siloxanos (Si-O-Si) e alguns grupos silanol (Si-OH), enquanto nas bordas e no interior dos tubos são encontrados grupos aluminol (Al-OH), conferindo hidrofiliçidade a estas nanopartículas (CARLI et al., 2014).

Por último, a sepiolita é um mineral de argila, sendo um silicato de magnésio hidratado ($\text{Mg}_4\text{Si}_6\text{O}_{15}(\text{OH})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e abundantemente disponível em depósitos naturais. Exibe morfologia de nanoagulhas, apresentando alternância entre uma estrutura cristalina tetraédrica de sílica com camadas octaédricas de magnésio (GONZÁLEZ-AUSEJO et al., 2019). Apresenta um comprimento típico de fibras, cerca de 1-2 μm , e a escala nanométrica está definida na sua seção transversal. Uma das vantagens do uso de sepiolita em comparação com os silicatos em camadas é a densidade muito elevada dos grupos silanol, que estão presentes em toda a superfície externa da fibra, permitindo ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals na interface polímero-silicato (RUIZ-HITZKY et al., 2013). Além disso, o grupo silanol na superfície da nanoagulha também confere a característica de elevada hidrofiliçidade da sepiolita. A Figura 4 apresenta imagens de microscopia de alguns trabalhos para as nanopartículas de argila apresentadas nesse tópico (IŞIK et al., 2010; RUIPING; CHUNYE; XITAO, 2016; YENDLURI et al., 2017).

Figura 4: Imagens de MEV (A) e (C) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (B) de nanopartículas de caulinita (A), haloisita (B) e sepiolita (C)



Adaptado de IŞIK et al., 2010; RUIPING; CHUNYE; XITAO, 2016; YENDLURI et al., 2017

Estudos com PHBV e argilas já vem sendo extensamente desenvolvidos, sendo os resultados obtidos dependentes do tipo de argila, da quantidade em massa de carga adicionada, da compatibilidade entre a argila e a matriz e da forma de processamento (CARLI et al., 2013, 2014; DAITX et al., 2015; GONZÁLEZ-AUSEJO

et al., 2019). Vale destacar também que a dispersão homogênea de argilas em polímeros não é facilmente alcançada devido à hidrofobicidade destas e a longa cadeia hidrofóbica da matriz. Normalmente, a afinidade desses materiais é aumentada com a modificação orgânica das argilas, melhorando a interação das nanopartículas com o polímero e, conseqüentemente, as propriedades do compósito resultante. Um estudo apresentado por Wang (2005) com PHBV e de montmorilonita organicamente modificada (OMt) mostrou que a temperatura de fusão (T_m) do nanocompósito e a entalpia de fusão (ΔH_m) diminuíram, bem como a cristalinidade (X_c) do PHBV. Além disso, a biodegradabilidade dos nanocompósitos de PHBV/OMt em solo também diminuiu com o aumento da quantidade de argila (WANG et al., 2005). De modo contrário, no estudo proposto por Carli, em 2011, combinando o PHBV com OMt e Hal, os resultados de DSC indicaram comportamentos distintos dependendo do tipo de argila utilizada. No caso dos nanocompósitos PHBV/OMt, a temperatura de cristalização (T_c) apresentou um decréscimo com o aumento do teor de argila, enquanto que para a Hal, a temperatura de cristalização foi ligeiramente superior, independentemente do teor, e o material resultante apresentou melhores propriedades mecânicas (CARLI; CRESPO; MAULER, 2011).

A dispersão das cargas ao longo do polímero influencia diretamente nas propriedades de barreira em filmes, sendo a permeabilidade a gases controlada pela dispersão da argila, dificultando a difusão de moléculas de gás em toda a matriz (ZHANG et al., 2016). Estudos indicam que nos nanocompósitos onde as partículas de argila encontram-se dispersas aleatoriamente, conferindo uma estrutura esfoliada, cria-se um caminho tortuoso para a difusão de moléculas pequenas, como oxigênio e vapor de água, através do polímero.

A alta permeabilidade ao oxigênio das embalagens contribui para a vida de prateleira limitada dos alimentos embalados, levando à deterioração destes durante o armazenamento e manuseio. No caso de alimentos ricos em lipídios ou óleo, a exposição ao oxigênio leva a possíveis alterações químicas, por exemplo, oxidação lipídica, descoloração e alteração no sabor que afetam a sua qualidade. A manutenção das propriedades dos alimentos, então, pode ser alcançada por um aumento na tortuosidade no caminho de difusão gerado pelas nanopartículas impermeáveis de argila, como será discutido em detalhes nas caracterizações apresentadas neste documento.

Crétois (em 2014) preparou filmes de PHBV e argila OMt usando extrusora

dupla rosca e estudou as propriedades de barreira dos filmes frente a diferentes gases. Com a incorporação de 7,5% em massa de OMT, os valores de permeabilidade ao nitrogênio variaram de 0,033 *barrer* (no filme de PHBV puro) para 0,014 *barrer*. Já a permeabilidade ao oxigênio foi alterada de 0,031 *barrer* para 0,028 *barrer*, usando o mesmo teor de nanopartículas. O estudo proposto confirma que a presença de domínios impermeáveis de argila atua como obstáculos à passagem de moléculas, melhorando as propriedades de barreira dos filmes (CRÉTOIS et al., 2014). Outro estudo proposto por González-Ausejo (2019) incorporando Sep a blendas de PHBV/PLA demonstrou que a incorporação de Sep não apenas melhorou a compatibilidade entre os biopolímeros, mas também reduziu a permeabilidade ao oxigênio dos filmes. Uma queda de 15% no valor de permeabilidade foi observada nos filmes contendo 4% em massa de Sep quando comparado com a mistura PHBV/PLA (GONZÁLEZ-AUSEJO et al., 2019).

Em resumo, a natureza atóxica destes materiais e a redução da permeabilidade de filmes pode fornecer à matriz polimérica o ajuste adequado na liberação de agentes antimicrobianos incorporados, de modo a obter embalagens com propriedades funcionais (MEIRA et al., 2017).

3.3 EMBALAGENS ATIVAS

De acordo com o regulamento da Comissão Europeia (EC) nº 450/2009, materiais ativos são caracterizados como materiais que se destinam a prolongar o prazo de validade ou manter ou melhorar a condição de alimentos embalados, sendo projetados para incorporar componentes que liberariam ou absorveriam substâncias de ou para o alimento embalado ou o ambiente ao redor do alimento (*European Commission*, 2009).

Novas tecnologias vêm sendo estudadas para a produção de embalagens funcionais, capazes de aumentar a vida de prateleira do produto. Esses sistemas são capazes de interagir com o alimento ou o meio de acondicionamento do produto alimentício, visando impedir a oxidação ou perda de água. Além disso, a manutenção das características de coloração, umidade, odor e sabor afetam as condições sensoriais e conseqüentemente, a adequação ao consumo (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016). Nesse contexto, as embalagens funcionais são, genericamente, classificadas em embalagens inteligentes e

embalagens ativas. As embalagens inteligentes são capazes de monitorar o ambiente interno/externo da embalagem e comunicar ao consumidor através de algum dispositivo ou material. Enquanto isso, as embalagens ativas são responsáveis por alterar a condição do ambiente da embalagem, com a finalidade de melhorar a segurança e a qualidade dos alimentos, prolongando a vida de prateleira do produto (FANG et al., 2017).

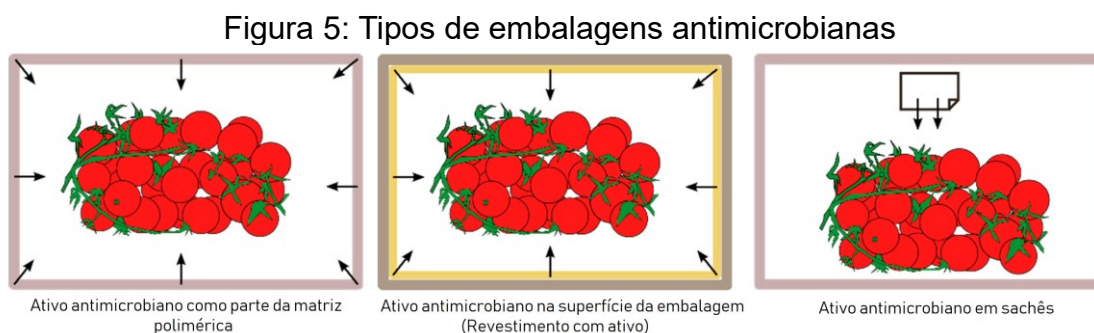
Os conceitos relacionados a embalagens ativas de alimentos incluem sistemas capazes de atuar como sequestradores de oxigênio, absorvedores de umidade, barreira ultravioleta (UV) ou mecanismos que fornecem atividade antioxidante, aromatizante ou antimicrobiana (OTONI et al., 2016).

A colonização bacteriana é iniciada num estado de suspensão (*planktonic*) e posteriormente ocorre a adesão dessas comunidades bacterianas a superfícies e interfaces bióticas ou abióticas, formando biofilmes e tornando essas superfícies suscetíveis ao crescimento de microrganismos (AIJUKA; BUYS, 2019). Os meios tradicionais de segurança de alimentos visam o contato direto entre o aditivo e o produto alimentício através da incorporação de componentes e/ou sais que atuem como antimicrobianos, a imersão do alimento diretamente no aditivo como um revestimento comestível, ou ainda através de sistemas de modificação atmosférica do meio de acondicionamento do produto (HAMID; RISIKAT; SURURAH, 2012; SILVA; LIDON, 2016).

As embalagens antimicrobianas são desenvolvidas com o objetivo de ser um obstáculo adicional para evitar a contaminação de alimentos, tendo em vista a inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, causadores de infecções, e a redução de microrganismos deteriorantes que estejam presentes na superfície de alimentos. Esta estratégia pode ser empregada através da incorporação direta do composto ativo na matriz polimérica, com o revestimento da superfície da embalagem com o agente antimicrobiano, ou imobilizando-o separadamente em sachês (SIRACUSA et al., 2008). Os diferentes designs das embalagens antimicrobianas encontram-se ilustrados na Figura 5.

Filmes poliméricos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas tornaram-se populares pois a oxidação e a contaminação microbiana são grandes problemas que afetam a qualidade e a segurança dos alimentos. Além disso, as embalagens antimicrobianas têm recebido maior atenção das indústrias de alimentos devido à crescente demanda dos consumidores por produtos

minimamente processados, sem conservantes e com a utilização de produtos mais naturais (RAMOS et al., 2012). Especificamente, filmes contendo agentes antimicrobianos em relação a outros processos de conservação de alimentos apresentam a vantagem de não influenciar no sabor indesejável causado pela adição direta desses aditivos diretamente sobre estes (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016).



Fonte MARTURANO et al., 2019

3.3.1 Óleos essenciais associados à atividade antimicrobiana

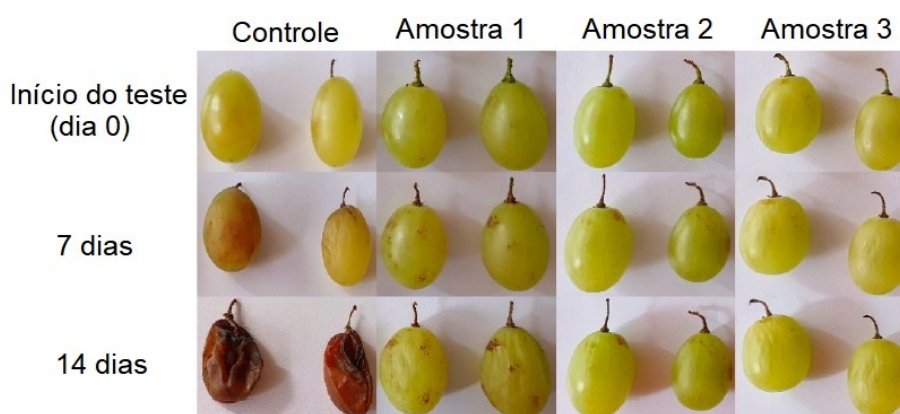
Os agentes antimicrobianos capazes de controlar e evitar a deterioração de alimentos por microrganismos são apresentados como compostos de natureza não volátil ou ativos voláteis. Antimicrobianos não voláteis incluem bactericidas, enzimas e óxidos metálicos nanométricos, enquanto que os compostos voláteis encontrados podem ser óxidos de etileno, normalmente usados em sachês, ou óleos essenciais.

Quando o tema se refere a antimicrobianos não voláteis, as nanopartículas de óxidos metálicos levam destaque pois apresentam excelentes resultados diante de uma ampla diversidade de bactérias e fungos, além de agregarem outras propriedades nos materiais poliméricos, atuando também como carga de reforço (ABDOLLAHI; REZAEI; FARZI, 2012). Díez-Pascual, A. M e Díez-Vicente, A. L. (2014) avaliaram matrizes de PHBV para embalagens contendo nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) como agentes antimicrobianos. Os estudos demonstraram que as nanopartículas de ZnO são muito eficazes para melhorar o desempenho mecânico dos filmes, aumentando 44% o módulo de armazenamento com a incorporação de 4% em massa de ZnO. Os materiais também foram eficazes contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*S. aureus*) (DÍEZ-PASCUAL; DÍEZ-VICENTE, 2014). Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) foram

incorporadas em embalagens ativas para aplicação em pães (MIHALY-COZMUTA et al., 2017) ou combinadas com nanopartículas de prata para aplicação em manteiga clarificada (APJOK et al., 2019).

Nanopartículas metálicas também são conhecidas por suas características antimicrobianas. Segundo Motelica (2020), a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata é documentada para mais de 650 microrganismos (bactérias, fungos e vírus), sendo dependente do tamanho e da forma das nanopartículas (MOTELICA et al., 2020). O autor desenvolveu filmes à base de quitosana incorporando uma mistura de nanopartículas de prata, nanopartículas de zinco e um agente antimicrobiano natural – óleo essencial de citronela – a fim de observar a ação sinérgica desses agentes. Os filmes foram usados no acondicionamento de uvas brancas por 14 dias, em condições controladas. Uma embalagem de polietileno atuou como controle. Os demais filmes continham a mesma proporção de nanopartículas de prata e óleo essencial de citronela, com o aumento da concentração de nanopartículas de zinco da amostra 1 para a amostra 3. A Figura 6 apresenta a qualidade visual das uvas ao longo do teste, sendo possível confirmar a eficiência de filmes ativos na preservação das características da uva branca (MOTELICA et al., 2020).

Figura 6: Aspecto visual de uvas brancas embaladas com polietileno (controle) e filmes antimicrobianos contendo óleo de citronela, nanopartículas de prata e diferentes concentrações de nanopartículas de zinco ao longo de 14 dias.



Adaptado de MOTELICA et al., 2020

Nanopartículas de zinco também foram estudadas em filmes de revestimento para uvas verdes (KUMAR et al., 2019) e em filmes aplicados em carne de aves (SOUZA et al., 2020). Embora os antimicrobianos não voláteis citados sejam

extensamente aplicados em diversas pesquisas, mais estudos precisam ser realizados a fim de avaliar sua segurança. Embora alguns destes metais possam ser assimilados pelo organismo como minerais, nanopartículas de prata podem apresentar toxicidade dependendo da concentração (CHAUDHARY et al., 2019).

A fim de atender às demandas dos consumidores por produtos mais seguros e mais naturais, pesquisas atuais têm sido desenvolvidas visando à incorporação de extratos de plantas nos filmes, causando menor impacto ambiental que as nanopartículas inorgânicas (BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2012). Esses compostos, que são voláteis, apresentam limitações mais operacionais relacionadas à estabilidade durante o armazenamento e à percepção sensorial do óleo no consumo do produto (OTONI et al., 2016).

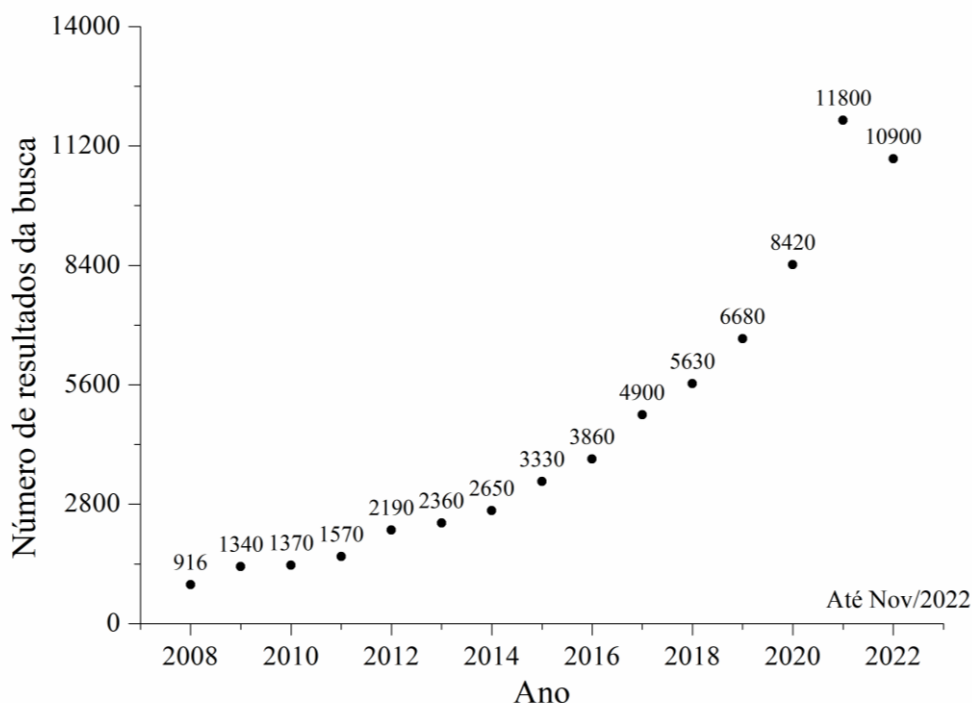
Óleos essenciais (OE) ganharam destaque em diversos setores nos últimos anos. Os óleos essenciais são substâncias sintetizadas, armazenadas e liberadas pelas plantas. São extratos naturais concentrados, que de acordo com os compostos bioativos presentes, podem ser responsáveis por atividades biológicas como: (i) atividades biocidas; (ii) propriedades medicinais; (iii) usado como líquido de limpeza para desinfecção de equipamentos médicos e superfícies; (iv) como purificador de ar; (v) associados a aromaterapia pessoal e (vi) atividade antimicrobiana e/ou antioxidante.

Por estar presente em diversas aplicações, os óleos essenciais são facilmente comercializados, obtidos através da extração do componente vegetal no qual estava associado como flores (jasmim, lavanda), botões (cravo), folhas (eucalipto, orégano, alecrim, manjerição), frutas (anis estrelado, bergamota), casca (canela), raspas (cítricos), sementes (cardamomo), madeira (sândalo) e raízes (gengibre) (ASBAHANI et al., 2015). Essa extração é feita principalmente por destilação e prensagem a frio. Uma vez extraídos, esses óleos podem ser utilizados como agentes antimicrobianos na indústria de alimentos, sendo classificados pela *Food and Drug Administration* (FDA) na categoria “substâncias alimentares indiretas afirmadas como geralmente reconhecidas como seguras” (Código de Regulamentações Federais, Título 21 – parte 182) (FDA, 2013; RAMOS et al., 2012).

Por se tratarem de aditivos naturais para a aplicação em alimentos, há um crescente interesse destes compostos para aplicações em embalagens durante a última década. Conforme Figura 7, é possível observar uma tendência do aumento do número de publicações com os termos associados a óleos essenciais e

embalagem para alimentos ao longo dos últimos 15 anos. A busca foi feita usando a ferramenta do *Google Scholar* em 13 de novembro de 2022, através do acessório de busca avançada para filtrar as palavras-chave *essential oil* e *food packaging* e organizar os dados coletados em função de cada ano. Em 2008, o número de trabalhos associados a este tema era limitado a 916 publicações. O número de trabalhos publicados cresce anualmente, evidenciando o interesse tecnológico no desenvolvimento de novos sistemas para aplicação em embalagens de alimentos e com propriedades ajustadas usando óleos essenciais.

Figura 7: Número de publicações anuais relacionadas a óleos essenciais e embalagens de alimentos



- Busca contendo "essential oil"; "food packaging"

Fonte: Próprio autor

O alto teor em compostos fenólicos e terpenos não só definem a natureza volátil e aromática, como também confere notável bioatividade aos óleos, agregando propriedades antimicrobianas contra agentes patogênicos e atividade antioxidante (estabilizando radicais livres, espécies reativas de oxigênio – ROS e metais quelantes e bloqueando a luz UV). A eficiência dos OE irá depender do tipo de óleo usado frente a determinado microrganismo e carga alimentícia, uma vez que cada óleo pode conter um componente majoritário específico, que atua de maneira única

na eventual aplicação.

Os ativos antimicrobianos que recebem destaque nesse trabalho são os óleos essenciais de orégano, alecrim e manjerição. Por serem compostos com aromas similares, os óleos foram selecionados para que a mesma aplicação fosse atingida. Embora a composição dos óleos dependa de fatores externos como tipo de extração, modo de extração e região de cultivo da planta, buscou-se a seleção de três óleos onde a composição pudesse ser majoritariamente diferente entre si. Diversos estudos relatam que o carvacrol é encontrado como ativo predominante em óleo essencial de orégano (ARFA et al., 2006; KARADAYI; YILDIRIM; GÜLLÜCE, 2020; STOILOVA et al., 2008). Essa observação não foi validada por outro estudo, no qual o 4-terpineol foi o composto mais abundante no óleo de orégano (RADÜNZ et al., 2021). Já no óleo essencial de alecrim, geralmente são encontrados compostos ricos em monoterpenos oxigenados (cânfora e eucaliptol) ou 1,8-cineol (SOUZA et al., 2019). No óleo de manjerição, linalol, estragol e mentol são as estruturas comumente atribuídas à planta (AMOR et al., 2021; DA SILVA et al., 2022). Essa variedade de princípios ativos ampliará o estudo desenvolvido nesse trabalho e trará entendimentos de como os óleos podem vir a interagir com a carga inorgânica avaliada e a matriz de PHBV.

Os efeitos antimicrobianos dos óleos já foram avaliados contra uma ampla gama de microrganismos ao longo dos anos, mas seu mecanismo de ação ainda não é completamente compreendido. Os mecanismos propostos para explicar a ação dos compostos químicos contidos nos OE podem ser atribuídos aos compostos fenólicos, capazes de desestabilizar a bicamada fosfolipídica da membrana celular e permear através dela, resultando na inibição de propriedades funcionais da célula e, eventualmente, interferindo no sistema de geração de energia celular (ATP), levando à morte celular (ASBAHANI et al., 2015).

Uma importante observação a ser considerada durante a aplicação de óleos essenciais como antimicrobianos é a sua natureza hidrofóbica. Em aplicações onde o ativo é inserido em matrizes hidrofílicas, são frequentemente preparados por métodos de encapsulamento. Muitos trabalhos utilizam quitosana como matriz polimérica (ABDOLLAHI; REZAEI; FARZI, 2012; MOTELICA et al., 2020; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016; SOTELO-BOYÁS et al., 2017). Esse material, além de ser um biopolímero, apresenta propriedades antimicrobianas intrínsecas. Entretanto, por se tratar de uma matriz polimérica altamente hidrofílica, a

interação entre o material da embalagem e o agente antimicrobiano é reduzida, influenciando na liberação do óleo essencial nos filmes produzidos (SOTELO-BOYÁS et al., 2017).

No caso de matrizes lipofílicas, como poliésteres biodegradáveis, os antimicrobianos podem ser incorporados diretamente ao polímero. Estudos são realizados com a incorporação destes óleos em matrizes comerciais, incorporando o óleo de orégano em polietileno de baixa densidade (LDPE) (CAMPOS-REQUENA et al., 2015b) ou em PP e PET (OTERO et al., 2014). No caso do polímero deste estudo, o PHBV também apresenta publicações usando a matriz biodegradável associada a óleos como: óleo de orégano (TORRES-GINER et al., 2018), óleo de orégano e óleo essencial de cravo (REQUENA; VARGAS; CHIRALT, 2017), óleo de alecrim e extrato de chá verde (FIGUEROA-LOPEZ et al., 2019). Além disso, a natureza hidrofóbica dos óleos essenciais também pode favorecer na melhoria das propriedades de barreira a moléculas gasosas, variável importante na indústria de alimentos para o controle do crescimento de microrganismos.

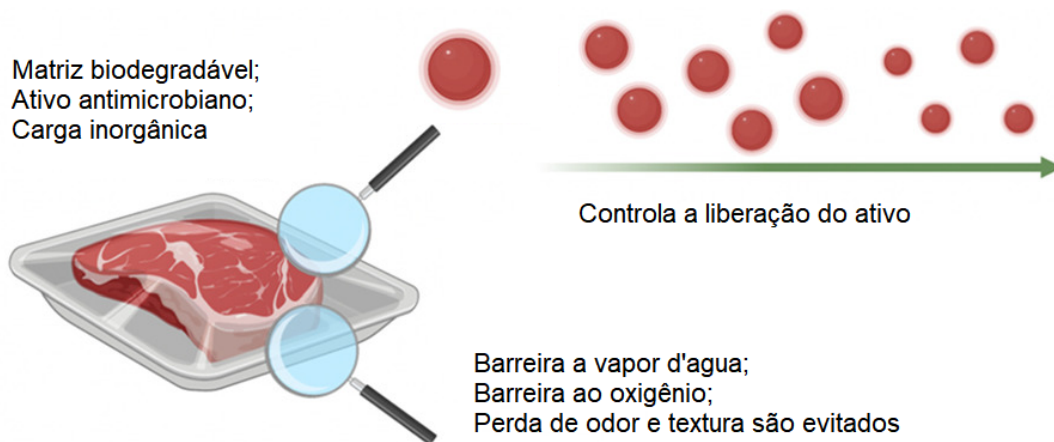
3.3.2 Agentes antimicrobianos e argilas: Otimização de propriedades e liberação controlada

É importante lembrar que o controle do ambiente no interior da embalagem é uma alternativa que aumenta a vida de prateleira do alimento, impedindo oxidação ou perda de água do alimento. Da mesma forma que as nanopartículas citadas anteriormente se comportam como barreira para moléculas do exterior entrarem em contato com o alimento, também são barreiras limitantes para a difusão de compostos inseridos na matriz polimérica, como é o caso de ativos antimicrobianos (Figura 8) (FARMAHINI-FARAHANI et al., 2017; MALMIR et al., 2017; SANCHEZ-GARCIA; GIMENEZ; LAGARON, 2008).

A incorporação de antimicrobianos em materiais de embalagens apresenta vantagens em relação à aplicação direta desses ativos sobre a superfície do alimento, preservando a composição natural e evitando alteração nas características sensoriais dos mesmos. Entretanto, para que os agentes antimicrobianos possam se difundir na matriz dos filmes e chegar à superfície do produto, as características de embalagem, a cinética de difusão do agente na embalagem e o meio de acondicionamento do alimento tornam-se fatores cruciais durante a aplicação (NGUYEN VAN LONG; JOLY; DANTIGNY, 2016). A liberação controlada deve

permitir que a atividade antimicrobiana seja mantida por longos períodos de tempo, evitando que a liberação ocorra muito rapidamente, e que o alimento sofra deterioração/apodrecimento em algum estágio anterior ao prazo estabelecido na validade. Além disso, não deve ocorrer tão lentamente, para que seja alcançada uma concentração inibitória mínima suficiente do agente antimicrobiano nos estágios iniciais, e o crescimento de patógenos seja controlada (UZ; ALTINKAYA, 2011).

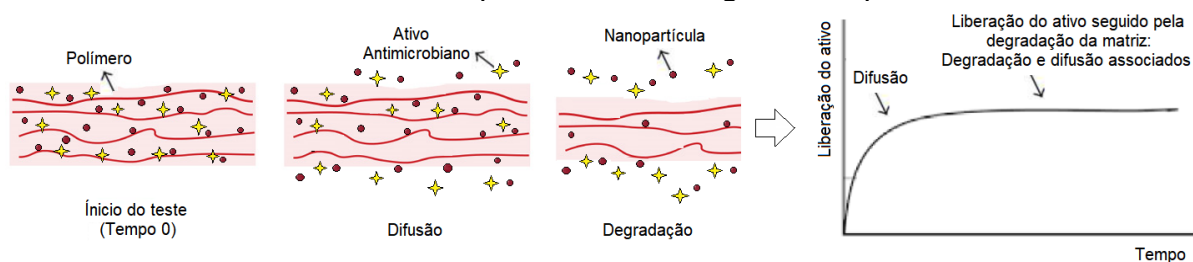
Figura 8: Esquema ilustrativo de uma embalagem ativa contendo agentes antimicrobianos e componentes específicos para controle da permeabilidade a gases nos filmes



Fonte WESTLAKE J. R. et al. 2022

A liberação de ativos utilizando carreadores poliméricos pode ocorrer concomitantemente com a erosão da superfície e degradação em massa. O estágio inicial da liberação é conduzido pela liberação dos ativos mais próximos à superfície para o meio externo. Posteriormente, um segundo estágio de liberação acontece com a difusão do ativo pela rede polimérica combinado ao mecanismo de degradação/erosão da matriz polimérica (VERGARO; LVOV; LEPORATTI, 2012). Um esquema ilustrativo do perfil de liberação é apresentado na Figura 9. De acordo com as características físico-químicas do polímero, da afinidade entre o polímero e as partículas adicionadas na matriz, bem como a dispersão destas no meio polimérico, essa entrega é facilitada ou dificultada (ASMATULU et al., 2009). Portanto, o tipo de material usado para transportar esses compostos antimicrobianos afeta a liberação e, conseqüentemente, a atividade antimicrobiana dos filmes.

Figura 9: Esquema ilustrativo do modo de liberação de ativos antimicrobianos em uma matriz polimérica ao longo do tempo



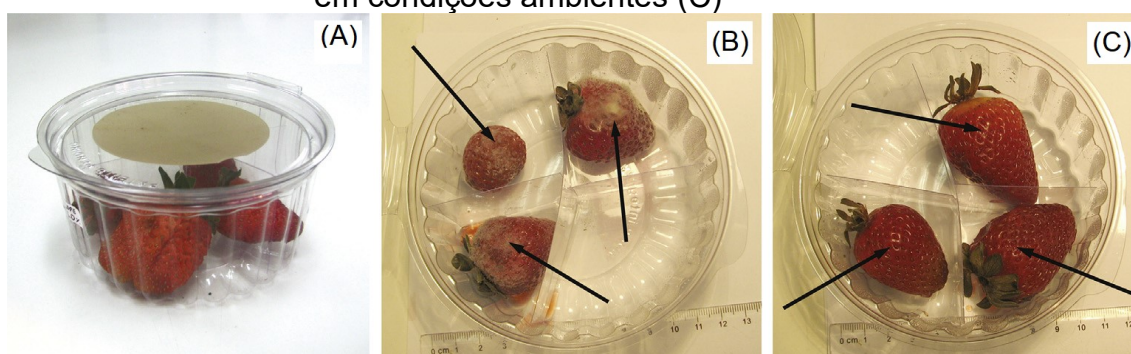
Adaptado de ASMATULU et al., 2009

A melhoria das propriedades de barreira com adição de argila é bem documentada e está convictamente relacionada com a tortuosidade originada pelas nanopartículas de argila. No entanto, a incorporação de argila como parâmetro de controle na liberação de ativos vem sendo recentemente estudada em pesquisas farmacêuticas, onde formulações em nanoescala permitem aumentar a biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos, além de também funcionar como sistemas sítio-específicos, direcionando o ativo para determinado órgão receptor (VERGARO; LVOV; LEPORATTI, 2012). Seguindo o raciocínio, estudos sobre a liberação de agentes antimicrobianos em embalagens devem ser aprofundados para que o ativo permaneça atuando no meio de acondicionamento do alimento de acordo com o tempo pretendido e otimizando as propriedades funcionais dos materiais.

Matrizes de polietileno também são frequentemente associadas à utilização com embalagem ativas. Campos-Requena et al. (2015) produziu filmes de LDPE incorporando carvacrol e três diferentes modificações em argilas montmorilonita. Os filmes foram processados por fusão em misturador interno e posteriormente moldados por compressão. As diferentes formulações foram estudadas quanto à liberação de carvacrol em ácido acético 3%, observando que cada nanocompósito apresenta uma cinética de liberação do carvacrol, efeito relacionado à criação de caminhos tortuosos nos filmes, que controlam a liberação do ativo (CAMPOS-REQUENA et al., 2015a). Em outra publicação, os mesmos autores ainda propuseram o desenvolvimento de filmes de LDPE-OMt usando simultaneamente óleo de carvacrol e timol. O trabalho avaliou o efeito antimicrobiano *in vivo* em morangos inoculados com *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) após cinco dias de contato com os vapores do filme sem os óleos e contendo 50:50 v:v de cada óleo na formulação. A Figura 10 ilustra o resultado atingido, demonstrando que os morangos

da embalagem sem nanocompósito mostram um desenvolvimento fúngico evidente no quinto dia de incubação. Quando os morangos inoculados foram tratados com nanocompósitos contendo uma combinação de carvacrol e timol, o efeito antimicrobiano foi visualmente observado com a inibição dos patógenos presentes no alimento (CAMPOS-REQUENA et al., 2015b).

Figura 10: Análise qualitativa do morango, usando filme nanocompósito na embalagem (A), morangos inoculados com *B. cinerea* sem óleo na formulação dos filmes (B) e com filme de LDPE-OMt-carvacrol/timol após cinco dias de tratamento em condições ambientes (C)



Fonte: CAMPOS-REQUENA et al., 2015b

Requena R.; Vargas M. e Chiralt A. (2017) estudaram a cinética de liberação dos componentes principais do óleo de cravo e óleo de orégano em filmes de PHBV. A liberação foi estudada simulando o ambiente de diferentes tipos de alimentos. Os autores concluíram que a cinética de liberação destes óleos é diretamente relacionada com a polaridade do ambiente externo, permitindo uma liberação mais rápida em ambientes com baixa polaridade (50% etanol) comparados à liberação em meios aquosos. Já em ambientes que simulam alimentos gordurosos a liberação é lenta (REQUENA; VARGAS; CHIRALT, 2017a).

Melendez-Rodriguez (2019) também utilizou a matriz de PHBV para incorporação de eugenol combinado com nanopartículas mesoporosas de sílica. O trabalho avaliou a atividade antimicrobiana dos filmes contendo eugenol em condições abertas e fechadas e, ainda, a capacidade de liberação prolongada do óleo ao longo de 15 dias. Os autores perceberam que os filmes de PHBV/eugenol/sílica inibiram o crescimento bacteriano em condições abertas. Entretanto, o desempenho dos filmes ativos foi aumentado quando armazenados em sistemas hermeticamente fechados, aumentando a atividade antimicrobiana no período de análise. Esse comportamento foi atribuído à porção volátil acumulada no

meio de acondicionamento do sistema e à capacidade de liberação sustentada dos filmes (MELENDEZ-RODRIGUEZ et al., 2019).

Por fim, é importante destacar que a incorporação de materiais inorgânicos a matrizes poliméricas sustentáveis deve estar associada à melhoria das propriedades dos materiais sem prejudicar as características intrínsecas de biodegradabilidade do polímero. Além disso, como visto ao longo deste trabalho, a formulação de sistemas agregando agentes antimicrobianos é uma alternativa atual e promissora para o ajuste das propriedades de embalagens ativas.

Como apresentado, diversos estudos já são direcionados para a utilização de matrizes poliméricas e a combinação com cargas inorgânicas e óleos essenciais. Em particular, o desenvolvimento de filmes utilizando PHBV com nanopartículas de haloisita, caulinita ou sepiolita – sem o uso de modificações químicas prévias para aumentar a dispersão das cargas em matrizes poliméricas orgânicas ainda é recente e não foram encontradas publicações anteriores. Portanto, a influência das diferentes argilas, com distintas morfologias, e a interação adequada entre esta carga, o ativo antimicrobiano incorporado e a matriz de PHBV pode ajudar a alcançar propriedades únicas nos materiais, permitindo que este estudo seja inovador e possa contribuir para a ampliação dos estudos de polímeros voltados para a aplicação em embalagens ativas.

3.3.3 Aplicações dos filmes em produtos lácteos

Além de atribuir características antimicrobianas aos filmes, os óleos essenciais podem alterar a coloração e o aroma dos filmes poliméricos. Devido a isso, é importante que a escolha do óleo essencial esteja adequada ao alimento destinado à aplicação, evitando que as características sensoriais do produto atrapalhem a aceitação do consumidor. Pensando nisso, os filmes produzidos ao longo deste estudo têm o enfoque para embalagens de produtos lácteos, onde se destacam os queijos, nos quais o aroma característico dos óleos essenciais de orégano, alecrim e manjerição não prejudicará as características sensoriais deste produto alimentício.

O queijo é um produto lácteo vastamente consumido no mundo, sendo extremamente versátil em termos de quantidade e de diversidade. Pode ser encontrado em uma vasta gama de variações quanto a seu sabor, textura, odor, cores, sendo estas características dependentes da composição bioquímica de cada

queijo, do processo de preparo e das condições de envelhecimento (MOULA ALI; SANT'ANA; BAVISETTY, 2022). Um queijo fresco é considerado extremamente perecível e suscetível à oxidação e a microrganismos deteriorantes devido a seu alto teor de umidade e gordura (MAHCENE et al., 2020). A microflora encontrada nos queijos já é considerada bastante rica, principalmente em queijos frescos ou em queijos que passaram por um processo de envelhecimento. Além da característica natural desse produto alimentício, fatores físico-químicos como pH, temperatura, natureza proteica e composição de gordura podem favorecer a deterioração e a comprometer a segurança do queijo. Vários surtos foram relatados nos últimos dez anos (2011-2021) pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (FDA, 2021). A maioria desses surtos foi específica para *Listeria monocytogenes* (MOULA ALI; SANT'ANA; BAVISETTY, 2022).

Para garantir a preservação e a segurança na comercialização de alimentos, aditivos são amplamente utilizados na indústria. No entanto, nos últimos anos, os aditivos sintéticos tendem a ser substituídos por aditivos mais naturais devido aos efeitos colaterais, a longo prazo, associados a certos compostos químicos e a busca dos consumidores por produtos alimentícios naturais, ecologicamente corretos e minimamente processados. Algumas tecnologias são usadas como alternativas na preservação de queijos, incluindo o processamento não térmico do alimento (como alta pressão, plasma frio ou tratamento com luz pulsada), a incorporação direta de agentes antimicrobianos naturais (como micocinas, endolisinas ou bactérias lácticas) e tecnologias de embalagens, usando atmosfera modificada ou filmes bioativos (TARIQ et al., 2019). Essa última, combinada a óleos essenciais e extratos de plantas aromáticas, apresenta notável atividade antimicrobiana e antioxidante em queijos, além de baixa toxicidade. A incorporação de óleos essenciais que atuem como antimicrobianos ou antioxidantes em materiais de embalagem de queijos pode ser observado em estudos usando o óleo essencial de orégano em queijo de corte com baixo teor de gordura e queijo cottage (ARTIGA-ARTIGAS; ACEVEDO-FANI; MARTÍN-BELLOSO, 2017; ASENSIO; GROSSO; RODOLFO JULIANI, 2015), óleo de manjeriço em queijo de soro de leite grego (TSIRAKI; SAVVAIDIS, 2013), óleo de pimpinella saxifraga em queijos frescos, (KSOUDA et al., 2019), extrato de limão em muçarela (CONTE et al., 2007).

Estudos sobre filmes biodegradáveis e o uso de óleos essenciais parece ser

uma alternativa consolidada e promissora para o mercado de embalagens ativas. Além disso, óleos essenciais não afetam seriamente as características organolépticas de queijos, promovendo principalmente a preservação da qualidade do produto lácteo. Entretanto, o ajuste dos sistemas de entrega de agentes antimicrobianos e a sinergia com a inclusão de nanopartículas de argila na formulação ainda é recente, sendo uma opção promissora para estudos de embalagens ativas, podendo ser produzidos materiais inovadores.

4 MATERIAIS E METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados neste trabalho e suas propriedades principais estão descritos a seguir. Para a preparação dos filmes poliméricos foram utilizados:

- Poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) (PHBV) – ENMAT Y1000, com densidade de 1,25 g/cm³ e índice de fluidez de 5,2 g/10 min a 180 °C (utilizando massa de 2,16 kg - informações do fabricante), teor de valerato de 3,4 mol% e massa molar viscosimétrica média de 450000 g/mol, determinados experimentalmente (BRANDOLT et al., 2019).

- Nanopartículas de argila (Sigma Aldrich): (a) Halosita (Hal) – nanotubos com capacidade de troca catiônica (CEC) igual a 16 mmol/100g (determinada experimentalmente (ASTM C837-09)) e densidade de 2,53 g/cm³; (b) Caulinita (Cau) – formato lamelar, com CEC igual a 12 mmol/100g (determinada experimentalmente) e densidade de 2,2 g/cm³; (c) Sepiolita (Sep) – nanoagulhas com CEC igual a 30 mmol/100g (determinada experimentalmente) e densidade 2,0 g/cm³.

- Óleos essenciais (Sigma Aldrich): (a) Óleo essencial de orégano (O) – temperatura de ebulição em 239 °C e densidade de 0,939 g/ml a 25 °C; (b) Óleo essencial de alecrim (A) – temperatura de ebulição de 176 °C e densidade de 0,908 g/ml a 25 °C; (c) Óleo essencial de manjeriço (M) – temperatura de ebulição de 215 °C e 0,956 g/mL de densidade a 25 °C. Todos os óleos apresentam conformidade segundo FDA 21 CFR 182.20 (FDA, 2013)

Além disso, foram utilizados os seguintes materiais na etapa de caracterização das composições, conforme recebidos:

- Ácido acético glacial – Sigma Aldrich
- Agar contagem de placas (PCA) – Kasvi
- Caldo BHI (*brain heart infusion*) – Kasvi
- Peptona bacteriológica – Kasvi
- Suplemento Tween 80 – Kasvi
- Agar TBX (Tryptona Bile Glucuronico) – Himedia
- Placa de Petri contendo Agar Listeria Ottaviani and Agosti (ALOA) – Kitlabor

4.2 PREPARAÇÃO DOS FILMES

O trabalho experimental desta tese foi dividido em duas etapas principais: na etapa 1 foram preparados filmes de PHBV com três diferentes nanopartículas de argila – Haloisita (Hal), Caulinita (Cau) e Sepiolita (Sep) – e incorporado óleo essencial de orégano, a fim de selecionar a formulação que agrega as melhores propriedades tecnológicas combinadas à atividade antimicrobiana; na etapa 2 foram produzidos filmes de PHBV mantendo uma das argilas como variável fixa e incorporando ativos antimicrobianos quimicamente diferentes (óleo de orégano, óleo de alecrim e óleo de manjeriço), de modo a compreender a interação de cada óleo com os demais componentes dos filmes e o efeito de cada formulação nas propriedades dos materiais, na liberação do ativo para o meio e na característica de inibição de bactérias patogênicas.

Os materiais produzidos em cada etapa foram caracterizados por diferentes técnicas, que serão detalhadas adiante. A Tabela 1 apresenta a composição de cada filme e a legenda de cada condição, que será utilizada ao longo do trabalho.

Tabela 1: Composição dos filmes produzidos durante cada etapa do trabalho

Legenda	Teor de PHBV (%m/m)	Tipo de argila	Teor de argila (%m/m)	Tipo de óleo essencial	Teor de óleo (%m/m)	Etapa de produção e caracterização
P	100	-	-	-	-	1, 2
PHal	97	Haloisita	3	-	-	1
PCau	97	Caulinita	3	-	-	1
PSep	97	Sepiolita	3	-	-	1
PO	92	-	-	Orégano	8	1, 2
POHal	89	Haloisita	3	Orégano	8	1
POCau	89	Caulinita	3	Orégano	8	1
POSep	89	Sepiolita	3	Orégano	8	1, 2
PA	92	-	-	Alecrim	8	2
PASep	89	Sepiolita	3	Alecrim	8	2
PM	92	-	-	Manjeriço	8	2
PMSep	89	Sepiolita	3	Manjeriço	8	2

O percentual de carga inorgânica foi mantido fixo em 3%*m/m*, conforme trabalho anterior do grupo (CARLI et al., 2014). Para as formulações contendo óleos

essenciais, foram utilizados 8% em massa do ativo antimicrobiano (OTERO et al., 2014a; XU et al., 2018). Para fins de comparação, foram processados filmes controle contendo somente PHBV em ambas as etapas.

Os filmes de PHBV e suas composições foram preparados através de mistura no estado fundido. Para isso, o polímero em pó e as argilas foram previamente secos em estufa com circulação de ar a 80 °C por 4 h. Todos os componentes foram manualmente misturados e então, adicionados simultaneamente em um misturador interno (Roller-Rotors R600 - Rheomix 6002C). O processamento foi realizado a 170 °C (para as composições sem óleo) e a 165 °C (para as composições com óleo), mantendo velocidade de rotação de 100 rpm por 6 min (CARLI et al., 2015). Após a etapa de mistura, os materiais foram fragmentados utilizando um moinho de facas (Modelo SL-32, Solab) visando a redução de tamanho das partículas. As amostras foram moídas por, aproximadamente, 1 min a 1150 rpm.

Finalmente, os filmes foram produzidos por moldagem por compressão (SL-11 Solab Equipamentos). Cerca de 3,5 g de cada composição foram colocados entre filmes de poliéster Filipaper, usado como desmoldante. Os materiais foram pré-aquecidos a 190 °C durante 90 s sem aplicação de pressão, até a fusão do material. Em seguida, mantendo a mesma temperatura, foi aplicada uma pressão de 1 ton durante 30 s. Os filmes moldados por compressão apresentaram superfície homogênea e translúcida, conforme Figura 11. O diâmetro médio foi de 15 cm \pm 1 cm e espessura média de 0,23 mm \pm 0,03 mm.

Figura 11: Granulometria dos materiais após moagem (A) e aparência dos filmes após prensagem a quente (B-C).



Fonte: Próprio autor

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

As técnicas de caracterização empregadas em todas as etapas de produção dos filmes poliméricos, assim como os equipamentos utilizados, são descritas neste capítulo.

4.3.1 Características de processamento dos materiais

Os resultados de torque para as diferentes misturas foram obtidos durante a etapa de homogeneização/processamento no misturador interno Roller-Rotors R600, Rheomix. O comportamento do torque (Nm) em relação ao tempo (min) permite avaliar a viscosidade dos sistemas preparados, de acordo com a formulação proposta. Os dados foram coletados após torque mínimo de 0,5 Nm.

4.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS)

O ensaio de CG/MS foi conduzido apenas para os três óleos essenciais, de modo a confirmar as estruturas químicas presentes em cada formulação do óleo essencial e verificar o componente majoritário de cada ativo antimicrobiano. A análise foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent CG 7890A acoplado a um espectro de massas Agilent 5975C. O equipamento possui coluna capilar de sílica HP-5MS (30 m x 0,25 mm e espessura de 0,25 μm) conectada a um detector quadrupolo operando no modo impacto de elétrons a 70 eV e intervalo de massa de 50 a 300 m/z. Hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi ajustada de 40 °C até 145 °C por 3 °C/min, mantido por 1 min, e novamente aquecido até 280 °C a 10 °C/min, mantida por 10 min. A velocidade de injeção foi de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$, proporção de divisão de 1:50. A identificação dos compostos foi realizada através da biblioteca NIST 11, banco de dados de índice de retenção/método CG associado à análise.

4.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização das nanopartículas inorgânicas foi realizada através de FTIR por reflectância difusa (FTIR-DRIFT) no equipamento FTIR Nicolet 6700 - Thermo Scientific, com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras, na faixa de 4000 a 800 cm^{-1} .

A caracterização dos filmes de PHBV (etapas 1 e 2) foi realizado através da análise de FTIR por reflectância total atenuada (FTIR-ATR). A análise foi feita em equipamento PerkinElmer Frontier, com resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras, na faixa de 4000 a 450 cm^{-1} .

Para analisar a diferença entre cada espectro, os resultados da transmitância foram normalizados em uma faixa de 1% a 100%. O espectro de cada composição preparada foi comparado ao espectro do filme de PHBV puro por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se os valores de correlação de erro médio quadrático (RMSE) (PEREIRA et al., 2016).

4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos nanocompósitos foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um equipamento JEOL JSM-6390LV operando a uma tensão de 15 kV com ampliação de 400x a 5000x. Os filmes de PHBV puro e demais composições foram fraturados por imersão em N₂ líquido e posteriormente depositados sobre fita de carbono e recobertos por uma fina camada de ouro, para visualização da microestrutura da seção transversal das amostras.

4.3.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise de termogravimetria permite a verificação da estabilidade térmica dos materiais, bem como a temperatura de máxima taxa de degradação (Td) dos filmes preparados. As análises foram conduzidas utilizando equipamento PerkinElmer TGA 8000. As amostras foram aquecidas de 30 °C a 700 °C com taxa de aquecimento igual a 20 °C/min, sob atmosfera de argônio, com vazão igual a 20 mL/min.

Com os resultados de TGA também foi possível estimar a quantidade de nanopartícula e de óleo essencial presente nos filmes após o processamento. A quantificação das argilas foi avaliada através da massa residual dos nanocompósitos a 690 °C. Já o teor de ativo antimicrobiano foi determinado através da perda de massa dos filmes até 255 °C, associada à volatilização dos óleos. A porcentagem de incorporação foi calculada a partir da Equação 1.

$$\text{Eficiência de incorporação (\%)} = \frac{\text{Percentual de resíduo medido}}{\text{Percentual de resíduo incorporado}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

4.3.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A análise de calorimetria diferencial de varredura foi realizada em equipamento TA Instruments DSC Q20. As amostras foram aquecidas sob atmosfera inerte (50 mL/min de N₂). Os materiais foram submetidos a dois ciclos de

aquecimento e um ciclo de resfriamento na faixa entre 40 °C a 200 °C a uma taxa de 10 °C/min. As medições foram feitas no primeiro ciclo de resfriamento e no segundo ciclo de aquecimento.

Com as curvas de DSC obtidas foi possível determinar o valor da temperatura de fusão cristalina (T_m) do polímero, temperatura de cristalização (T_c) e a entalpia de fusão do polímero (ΔH_f) sendo, através dela, possível calcular o grau de cristalinidade (X_c) da matriz de PHBV e das composições por meio da Equação 2.

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{f_p \times \Delta H^{\circ}f} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Sendo ΔH_f a entalpia de fusão da amostra de estudo em J/g, f_p a fração em massa do polímero (PHBV) na amostra e $\Delta H^{\circ}f$ o valor da entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina de PHBV, igual a 146 J/g (GOGOLEWSKI et al., 1993).

4.3.7 Microscopia óptica (MO)

As características microestruturais durante o processo de cristalização não isotérmica a partir do estado fundido foram analisadas por microscopia óptica (MO) usando um microscópio óptico de luz polarizada Zeiss AxioLab A1. A caracterização foi conduzida para os filmes obtidos na etapa 1. Os filmes foram submetidos a um ciclo de aquecimento até 200 °C por 2 min, e então resfriados, a uma taxa de 10 °C/min, até a temperatura ambiente em equipamento de ponto de fusão Microquímica Equipamentos Ltda.

4.3.8 Análise térmica dinâmico-mecânica (DMA)

Os filmes foram caracterizados por análise térmica dinâmico-mecânica (DMA), a fim de obter informações referentes ao módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e temperatura de transição vítrea (T_g). Os filmes foram avaliados por DMA na Etapa 1 e na Etapa 2, entretanto, devido a disponibilidade do equipamento, fez-se necessário o uso de equipamentos distintos para a medição das propriedades mecânicas de cada etapa.

Nos filmes produzidos com diferentes argilas (Etapa 1), os testes foram realizados no modo *tension film* usando um equipamento Netzsch 242 E Artemis, no intervalo de temperatura entre -30 °C e 120 °C, a uma taxa de 3 °C/min e frequência de 1 Hz. A força aplicada foi ajustada em 4 N e a amplitude de deformação mantida constante em 0,1%. Para os materiais obtidos na Etapa 2, alterando a composição de óleo essencial, os testes foram conduzidos no equipamento TA Instruments

Discovery DMA 850 no intervalo de temperatura entre -30 °C e 120 °C, a uma taxa de 3 °C/min e frequência de 1 Hz. A força aplicada foi ajustada em 4 N e a amplitude de 10 µm.

4.3.9 Ângulo de contato

O ensaio de ângulo de contato foi realizado para as formulações da etapa 2, de modo a entender o comportamento superficial quanto à hidrofobicidade das composições contendo os diferentes óleos. A medida do ângulo de contato foi determinada em um goniômetro ramé-Hart 250 equipado com software Drop Image. As medidas foram obtidas após deposição direta de uma gota de água na superfície de cada filme, com dimensão de 1,0 cm x 3,0 cm. O ensaio foi conduzido em triplicata.

4.3.10 Permeabilidade ao oxigênio

A permeabilidade ao oxigênio foi determinada a fim de verificar a influência das diferentes argilas nas propriedades de barreira nos filmes de PHBV preparados. O ensaio foi aplicado para as amostras das etapas 1 e 2. O ensaio foi conduzido a 23 °C com fluxo de oxigênio de 100 cm³/min, de acordo com a norma ASTM D1434-15, em um equipamento Systech Illinois L100-5000. Os dados coletados são referentes à permeabilidade ao oxigênio (PO₂) em mL/m²d. Os resultados para cada filme foram obtidos após a medida de espessura média dos filmes (l), em mm, conforme a Equação 3, obtendo-se o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (P'O₂), em mLmm/m²d.

$$P' O_2 = PO_2 \times l \quad \text{Eq. 3}$$

Os ensaios de permeabilidade ao oxigênio foram estudados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey. Um valor de $p \leq 0,05$ é considerado estatisticamente significativo.

4.3.11 Estudo da liberação controlada dos óleos essenciais

Estudos de liberação de ativos são propostos quando se deseja obter informações acerca da taxa de difusão do agente antimicrobiano no sistema polimérico proposto e em meio que simule o ambiente de acondicionamento do alimento. O ensaio foi conduzido nas etapas 1 e 2. Os testes de liberação foram conduzidos em meio de ácido acético 3% (v/v), de modo a simular o meio de acondicionamento de queijos. A escolha do meio simulador seguiu o Regulamento

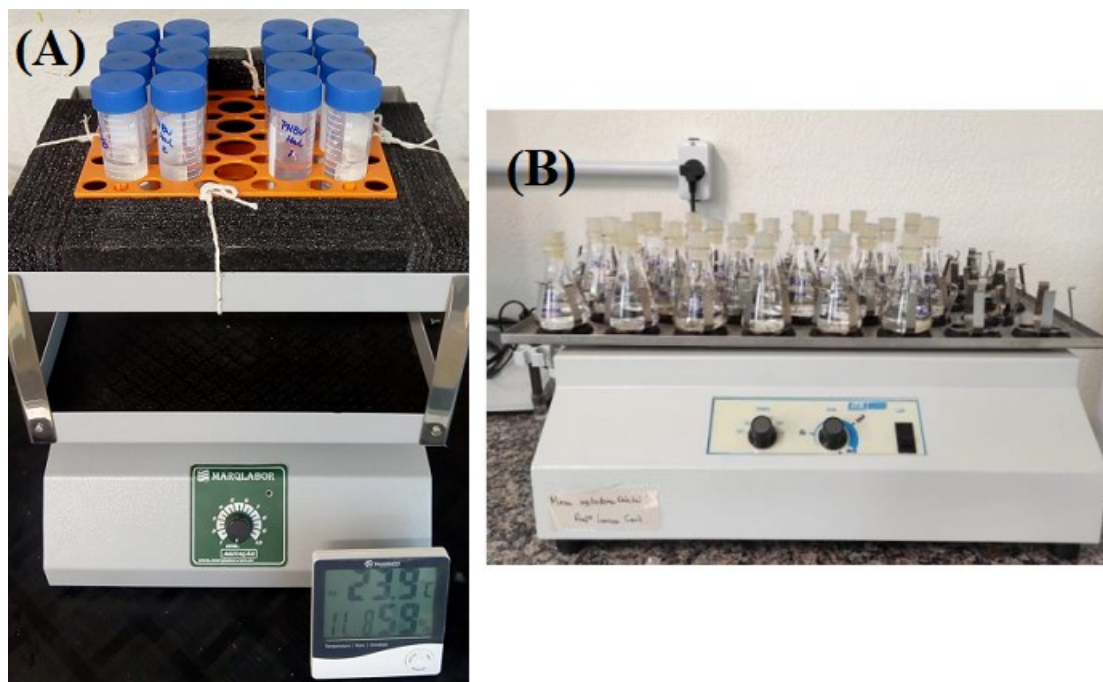
da Comissão (UE) nº 10/2011 relativo aos materiais de matéria plástica destinados a entrar em contato com os alimentos (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION, 2011, p. 20). A aplicação desses filmes em embalagens de produtos lácteos, especialmente queijos, torna-se favorável devido ao aroma dos óleos e à susceptibilidade de queijos à multiplicação microbiana ao longo do tempo de prateleira, devido a sua microbiota natural e à facilidade de sofrer deteriorização.

Previamente ao ensaio, foi construída uma curva de calibração para o óleo essencial de orégano na faixa de concentração de 0,016 mg/mL – 0,2 mg/mL e comprimento de onda máximo em 273 nm. Para o óleo de alecrim, as concentrações foram medidas entre 0,016 mg/mL – 0,15 mg/mL a 260 nm e, por fim, na faixa de 0,05 mg/mL - 0,15 mg/mL para o óleo de manjerição, medidas em 275 nm. A quantificação dos óleos foi analisada por medidas de absorbância em espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1800.

Para os ensaios de liberação dos filmes da etapa 1, cerca de 150 mg de cada filme (área aproximada de 17,1 cm²) foram imersos em 30 mL de solução de ácido acético 3% (v/v), mantidos em agitação contínua de 100 rpm a 24 °C, em um agitador pendular Marqlabor, conforme Figura 12 (A). As mesmas condições de análise foram mantidas com os filmes da etapa 2, entretanto foi usado agitador orbital MK1210 – TR (Figura 12 (B)). Periodicamente, alíquotas de 2 mL foram retiradas em intervalos de tempo específicos durante 48 h de ensaio, sendo substituídas com volume igual de meio e os dados posteriormente corrigidos. Para a determinação do percentual de óleo liberado, foi considerada a concentração de óleo medida em cada formulação a partir dos resultados obtidos na análise de TGA. Cada formulação foi ensaiada em triplicata e calculada a média e o desvio padrão.

Além do perfil de liberação, a cinética de liberação do óleo em cada formulação também foi calculada através do *DDSo/ver*, um plug-in de extensão do Microsoft Excel, onde os dados obtidos experimentalmente foram ajustados a diferentes modelos cinéticos disponíveis para uso (ZHANG et al., 2010). O *DDSo/ver* foi utilizado para encurtar o tempo de cálculo, eliminar erros de cálculo e determinar o perfil de liberação ideal para as matrizes desenvolvidas. Dentre os modelos avaliados, o de Korsmeyer-Peppas foi selecionado por melhor associar os dados experimentais obtidos com os dados gerados pelo modelo. Os principais parâmetros avaliados neste estudo foram: coeficiente de determinação (Rsqr), Critério de Informação de Akaike (AIC), Critério de Seleção de Modelo (MSC).

Figura 12: Mesas utilizadas nos ensaios de liberação: com agitação pendular (A) e agitação orbital (B)



Fonte: Próprio autor

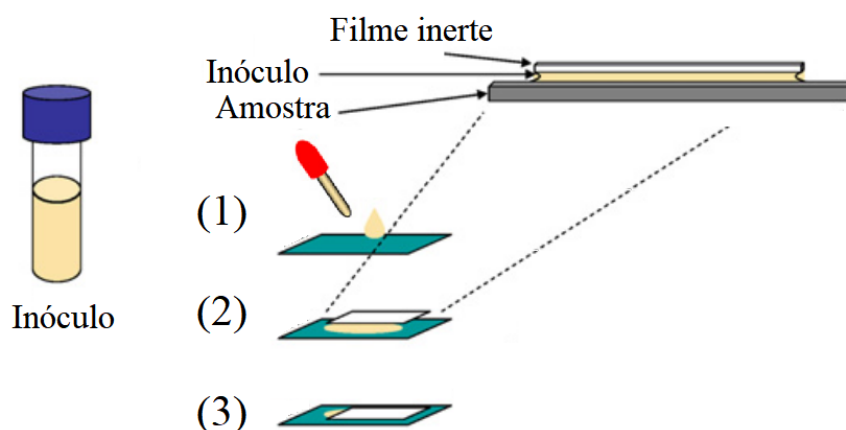
4.3.12 Atividade antimicrobiana dos filmes contendo óleos essenciais

A avaliação da atividade antimicrobiana associada aos diferentes óleos essenciais foi realizada tanto na etapa 1 quanto na etapa 2 deste trabalho. A atividade antimicrobiana dos filmes ativos de PHBV foi avaliada usando norma padrão para filmes plásticos (Japanese Industrial Standard - JIS Z 2801:2000). Os testes foram conduzidos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas - *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, respectivamente, de modo a estimar quantitativamente a redução/inibição de microrganismos dentro de 24 h de contato com a superfície (OTERO et al., 2014). As bactérias foram reativadas separadamente em Caldo BHI (*brain heart infusion*), incubadas a 35 °C (± 1 °C) por 24 h e a suspensão ajustada para o padrão de McFarland 0,5 contendo aproximadamente $1,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Os filmes de cada formulação foram cortados em pedaços de 5 x 5 cm, e filmes plásticos inertes usados foram de 4 x 4 cm. Todas as amostras foram previamente expostas à luz ultravioleta para esterilização. Em seguida, 0,4 mL de inóculo microbiano ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL) foi colocado na superfície dos filmes e imediatamente coberto com o filme inerte, garantindo contato próximo com a

superfície antimicrobiana. O desenho ilustrativo do procedimento descrito encontra-se na Figura 13. Os filmes foram incubados a 35 °C e 90% de umidade relativa por 24 h. Após a incubação, os filmes foram cuidadosamente lavados com 10 mL de solução de peptona 0,1% e Tween 80 a 0,7%. Para a contagem de células viáveis, 1 mL foi transferido para um tubo contendo 9 mL de peptona 0,1% e diluído em série. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 13: Desenho esquemático do procedimento segundo norma JIS 2801:2000: cobertura da amostra com o inóculo (1); cobertura do inóculo com um filme inerte de dimensão menor (2); e incubação dos filmes sob atmosfera úmida por 24 h (3).



Fonte: Adaptado de SUN et al., 2016

As contagens microbiológicas foram realizadas após 24 h de incubação a 35 °C em ágar de contagem em placa (PCA). A atividade antimicrobiana foi calculada em função do valor de redução (R), em log UFC/mL, usando a Eq. 4:

$$R = (\log A - \log B) \quad \text{Eq. 4}$$

onde log A é a média das contagens bacterianas do controle após 24 h (inóculo) e log B é a média das contagens bacterianas da amostra teste após 24 h.

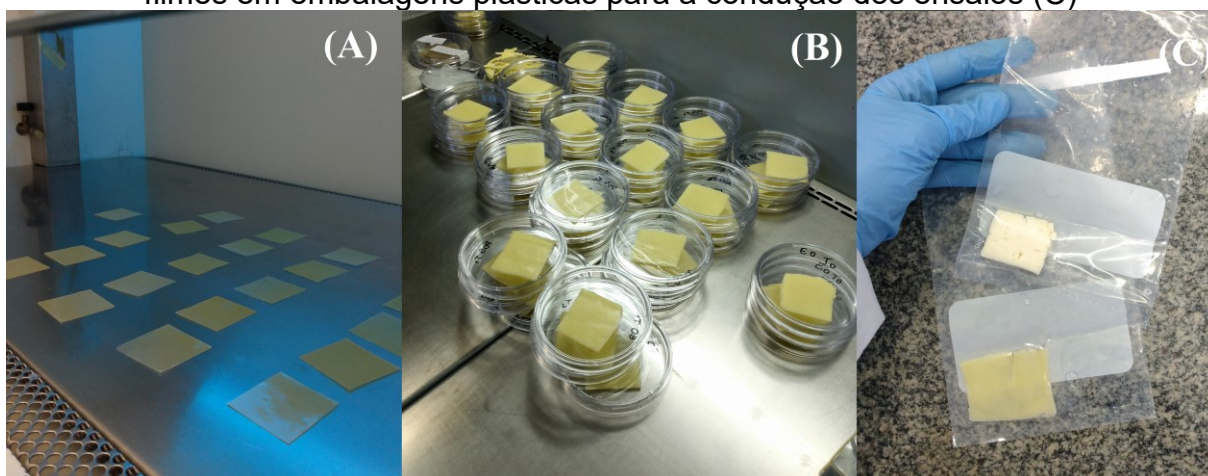
4.3.13 Aplicação dos filmes em queijo muçarela

Após a conclusão das diversas caracterizações tanto nos sistemas com diferentes argilas, quanto nos sistemas com diferentes óleos essenciais, a formulação que melhor atendeu os resultados esperados foi selecionada para a conclusão dos ensaios visando à aplicação dos filmes. O produto alimentício selecionado foi o queijo muçarela.

O queijo muçarela testado foi adquirido no comércio local, em uma embalagem a vácuo com 400 g de queijo, com fatias separadas por interfolhas plásticas. O ensaio foi conduzido entre janeiro e fevereiro de 2022. As fatias de queijo e as respectivas interfolhas foram cortadas em quadrados de 4 cm x 4 cm, com o auxílio de uma lâmina estéril e luvas. Toda a manipulação do alimento foi conduzida em uma capela de fluxo laminar (Cabine de segurança biológica – Clean Plus, marca Velco). Posteriormente, a formulação de interesse (POS) também foi dimensionada em quadrados de 4 cm x 4 cm e esterilizada sob luz UV por 15 min de cada lado - Conforme Figura 14(A). A Figura 14(B) ilustra a preparação do ensaio.

O ensaio foi conduzido usando suspensões de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 10^5 UFC/mL e 100 μ L de *Listeria monocytogenes* ATCC 13627 a 10^6 UFC/mL. As bactérias foram reativadas separadamente em Caldo BHI, incubadas a 35 °C (\pm 1 °C) por 18 h e a suspensão ajustada para o padrão de McFarland 0,5 contendo aproximadamente $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. Após o dimensionamento dos materiais, foram colocadas sobre a superfície dos queijos, em contato direto, 100 μ L de cada suspensão bacteriana, cobrindo prontamente com o filme de POS. Também foram preparadas combinações queijo e filme inerte para servir de controle. Os queijos foram acondicionados em embalagens plásticas vedadas e mantidos sob refrigeração a 6 °C. A contagem microbiológica no queijo foi avaliada em 3, 6, 9, 12, 15 e 30 dias. Todas as análises foram conduzidas em triplicata por dia.

Figura 14: Filme de POS dimensionados em quadrados de 4 cm x 4 cm sob luz UV (A), manipulação dos queijos para corte (B), e acondicionamento dos queijos e filmes em embalagens plásticas para a condução dos ensaios (C)



Fonte: Próprio autor

Para a análise microbiológica, o queijo muçarela (cerca de 3 g) foi separado

do filme e colocado em um saco plástico estéril (Stomacher - marca Laborclin) contendo 27 mL de água peptonada 1% (LOTFI et al., 2018). Os queijos foram homogeneizados por cerca de 1 min a 250 rpm com o auxílio de uma Bag Mixer – marca Interscience. Cerca de 1 mL do caldo resultante foi recolhido, diluído e inoculado por profundidade em placas descartáveis com Agar Triptona Bile Glicuronídeo (TBX) seletivo e diferencial para a contagem da *E. Coli*. Para a contagem de *L. monocytogenes* foi inoculado 100 µL do caldo, sobre superfície, em placas de Agar Listeria Ottaviani and Agosti (ALOA). Todas as placas foram incubadas a 37 °C, e as contagens microbiológicas realizadas após 24 h e 48 h, respectivamente. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES CONTENDO ÓLEO DE ORÉGANO E SELEÇÃO DA NANOPARTÍCULA INORGÂNICA

Os resultados apresentados nessa seção serão referentes aos filmes de PHBV contendo três diferentes argilas e óleo essencial de orégano. O objetivo deste primeiro estudo foi avaliar as propriedades dos filmes de acordo com a morfologia da argila utilizada e a interação com o óleo de orégano.

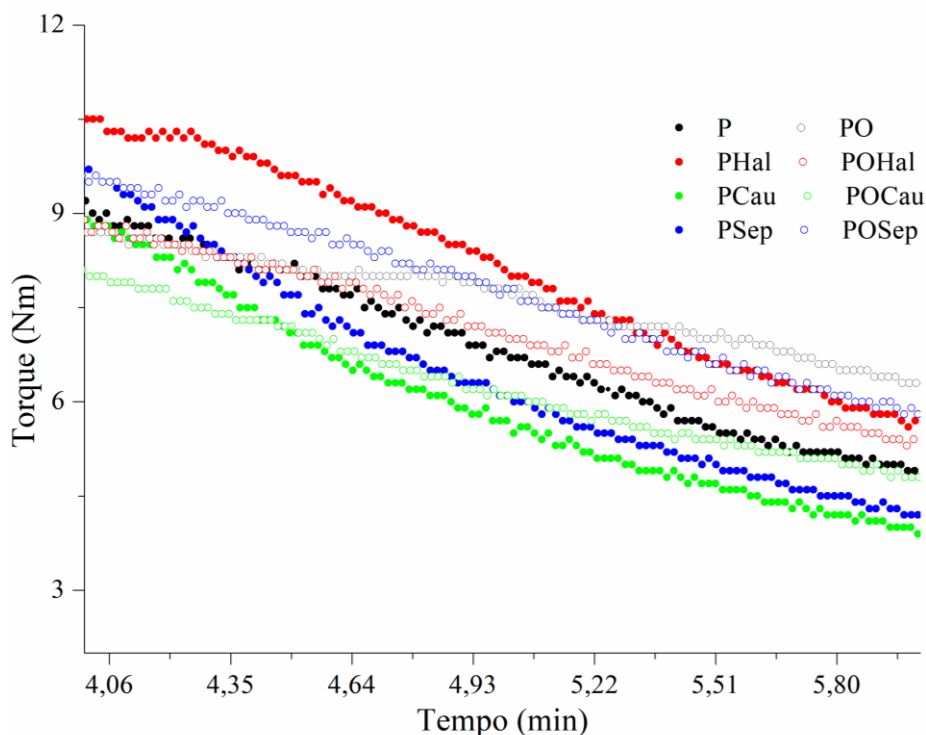
5.1.1 Torque durante o processamento

A etapa de mistura e processamento dos materiais envolve temperaturas elevadas (maiores que a temperatura de fusão – T_m), agitação vigorosa e tempo de permanência dos materiais dentro da câmara. Todas as condições promovem maior homogeneização no processamento, permitindo boa distribuição dos aditivos na matriz de PHBV. O controle das variáveis citadas deve ser adequado às características físico-químicas do polímero, principalmente quando o material de estudo – PHBV – apresenta janela de processamento estreita (CARLI et al., 2015; LIU et al., 2009).

A avaliação do torque durante o processamento permite visualizar a característica da viscosidade nas diferentes misturas e, conseqüentemente, uma possível tendência de degradação térmica dos materiais. As curvas são apresentadas na Figura 15. Os valores de torque diminuem com o tempo de permanência dentro da câmara, uma vez que a viscosidade vai diminuindo com a fusão do material e o tempo de processamento. O torque final avaliado para a amostra de PHBV puro (P) foi de 4,9 Nm. Um acréscimo neste valor indica uma maior viscosidade do polímero e, como consequência direta, indica uma menor degradação da matriz polimérica. De modo contrário, uma redução contínua do valor de torque pode indicar degradação do PHBV.

A incorporação de nanopartículas de argilas, em geral, deve promover um aumento na viscosidade da mistura devido às interações polímero-carga. Esse efeito foi observado na amostra contendo haloisita (PHal), aumentando o torque final da mistura até o valor de 5,7 Nm. Entretanto, os resultados para os nanocompósitos contendo caulinita (PCau) e sepiolita (PSep) indicam pequena redução no torque para 3,9 Nm e 4,2 Nm, respectivamente.

Figura 15: Torque em função do tempo de processamento das diferentes formulações propostas



Fonte: Próprio autor

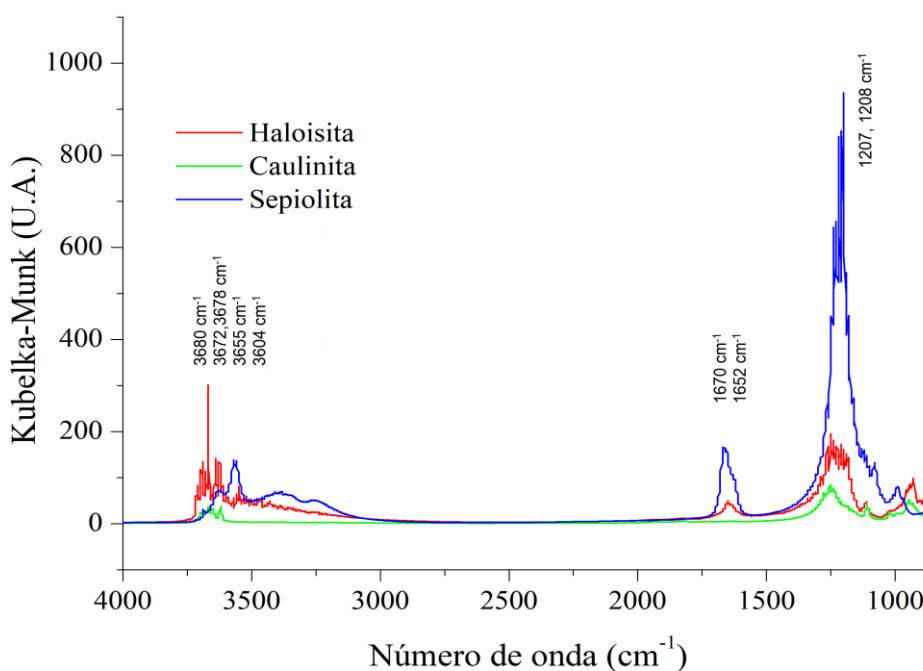
Os valores de torque obtidos para os nanocompósitos tendem a ser maiores com a incorporação da carga inorgânica combinada ao óleo essencial. A utilização de óleo pode atuar como auxiliar de processamento, diminuindo a temperatura de processamento e aumentando a estabilidade térmica no preparo dos nanocompósitos. Essa estabilidade térmica pode ser evidenciada ao analisar a curva referente à composição PO, onde a incorporação de óleo melhorou o processamento dos materiais, alterando o torque final de 4,9 Nm do polímero puro para 6,3 Nm na amostra de PO. A relação de aumento de viscosidade entre a formulação polímero/argila e respectiva formulação polímero/óleo/argila também foi observada para os sistemas PCau/POCau e PSep/POSep, confirmando a tendência do óleo de orégano em auxiliar o processamento do PHBV, aumentando a estabilidade térmica dos materiais. Esse efeito será mais claramente discutido adiante.

5.1.2 FTIR

A análise de FTIR permite a identificação qualitativa das ligações químicas presentes no material. A caracterização química das nanopartículas usadas nessa etapa foi realizada pela análise de FTIR-DRIFT, apresentada na Figura 16. Observando o espectro da haloisita (curva em vermelho), é possível identificar bandas de absorção na região de 3680 a 3655 cm^{-1} atribuídas ao estiramento O-H na ligação Al_2OH , em 3620 cm^{-1} ao estiramento do grupo O-H da superfície interna e em 1652 cm^{-1} a fortes vibrações de água adsorvida. A banda em 1207 cm^{-1} é atribuída à ligação Si-O (SZCZEPANIK et al., 2015). Para o espectro referente à nanopartícula de sepiolita, a banda larga em 3672-3508 cm^{-1} é atribuída à presença de grupos O-H na ligação Mg_3OH . A banda em 1670 cm^{-1} é atribuída à água coordenada ao magnésio na folha octaédrica. A banda intensa presente em 1208 cm^{-1} representa o estiramento de Si-O (ALKAN; TEKIN; NAMLI, 2005).

No espectro de caulinita não é possível notar a presença de bandas associadas à água adsorvida. A ausência de água na estrutura desta nanopartícula será observada mais à frente também na técnica de TGA. Entretanto, o espectro apresenta bandas referentes ao estiramento O-H da superfície interna em 3604 e 3678 cm^{-1} (QIU et al., 2014).

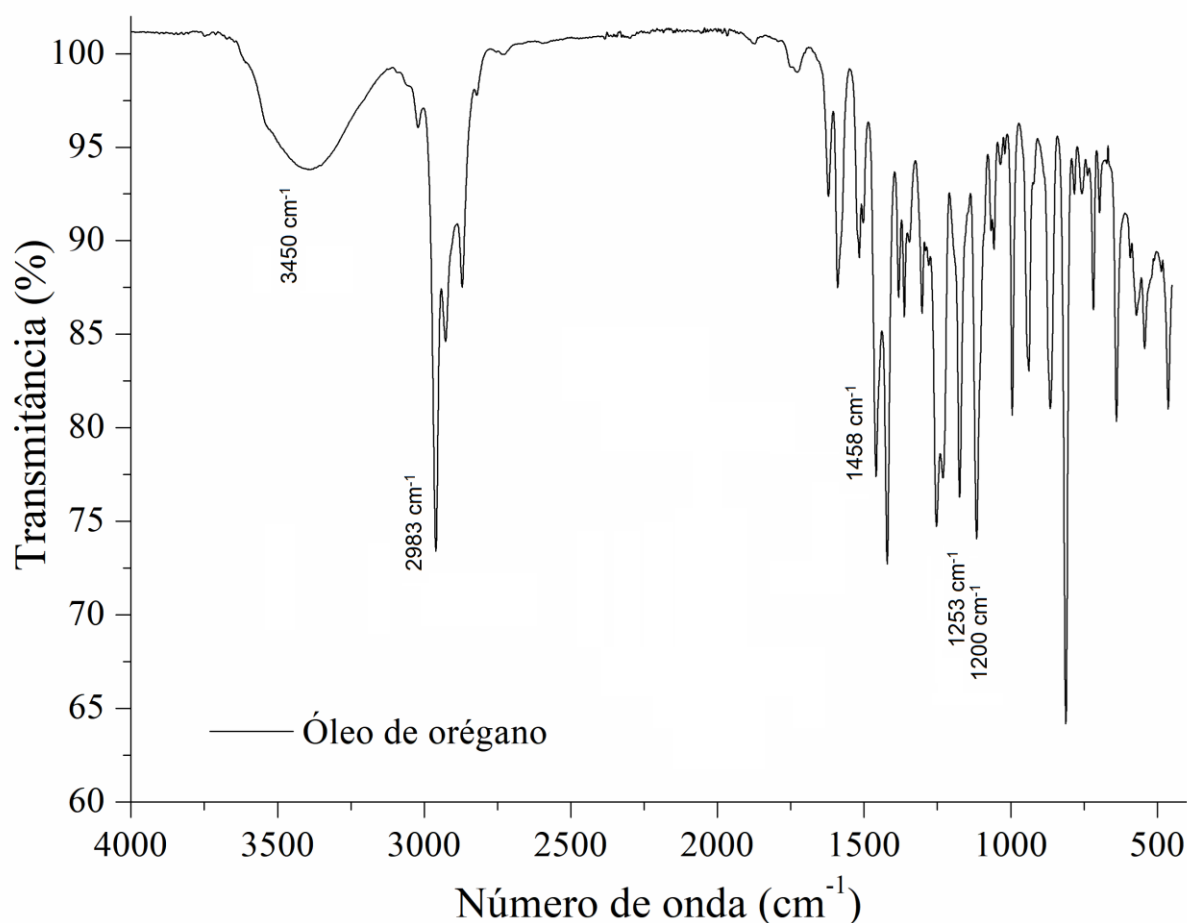
Figura 16: Espectro FTIR-DRIFT das nanopartículas inorgânicas



Fonte: Próprio autor

O espectro FTIR-ATR para o óleo essencial de orégano é apresentado na Figura 17. O espectro do óleo apresenta uma banda larga em 3450 cm^{-1} , referente à hidroxila dos compostos fenólicos encontrados nos óleos essenciais. Além desta, a banda em 1200 cm^{-1} também se refere ao grupo C-O dos fenóis. A banda característica em 2983 cm^{-1} está relacionada ao alongamento C-H, em 1458 cm^{-1} a flexão de CH_2 e em 1253 cm^{-1} ao alongamento C-O-C (HOSSEINI et al., 2013).

Figura 17: FTIR-ATR para o óleo essencial de orégano

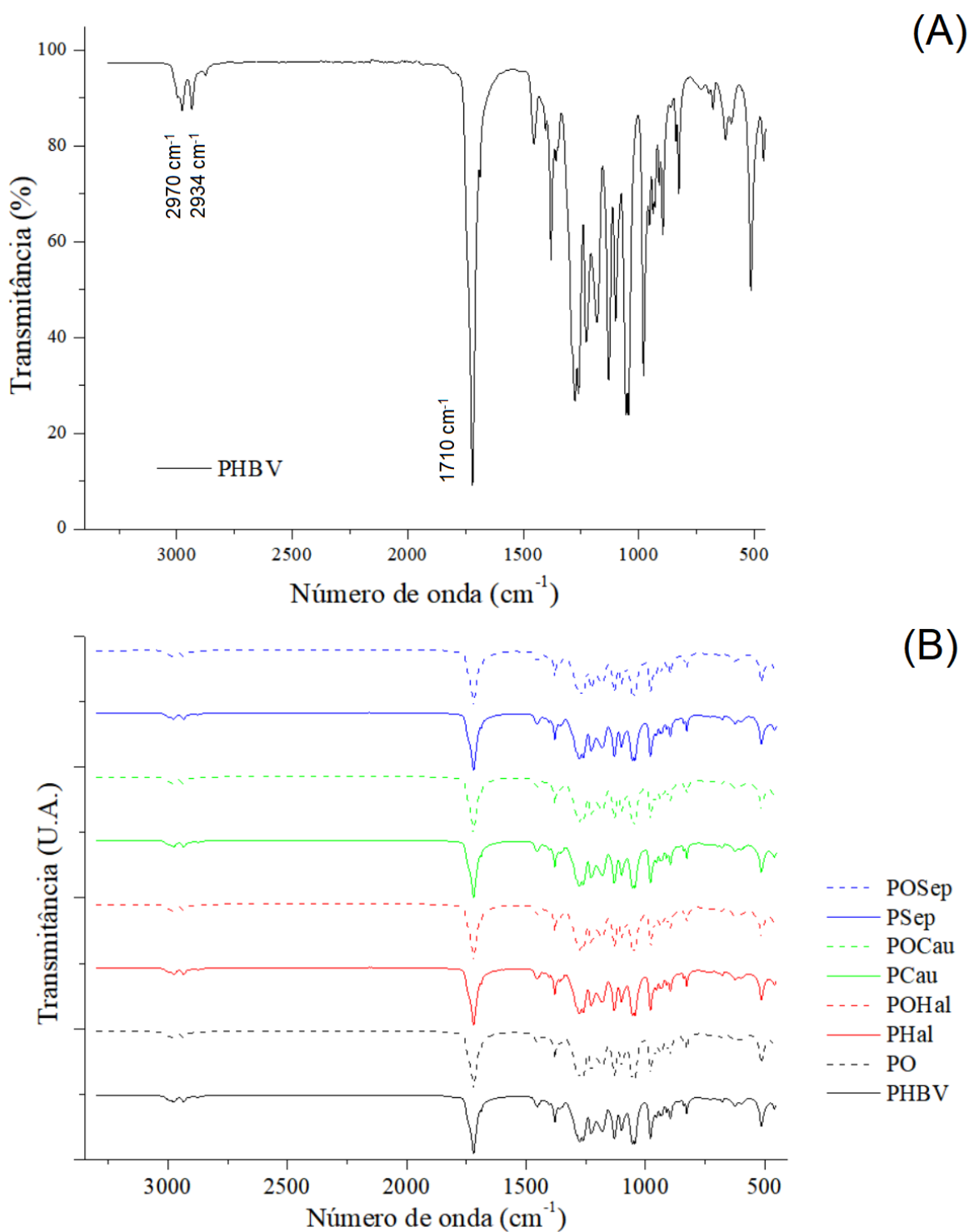


Fonte: Próprio autor

O espectro obtido para o filme de PHBV encontra-se na Figura 18 (A). As bandas em 2977 e 2934 cm^{-1} no espectro do PHBV representam as vibrações assimétricas e simétricas da ligação C-H, respectivamente. A banda de alta intensidade em 1710 cm^{-1} representa o estiramento da carbonila do éster ($\text{C}=\text{O}$) (SHAKIL; MASOOD; YASIN, 2017). Os espectros de FTIR-ATR das composições PHBV/argila e PHBV/óleo/argila são mostrados na Figura 18 (B) por linhas contínuas e tracejadas, respectivamente. A comparação entre os diferentes espectros apenas

identifica as bandas dominantes associadas à matriz polimérica – componente de maior percentual de massa – e não há diferenças visuais claras da incorporação de argila e óleo à matriz de PHBV.

Figura 18: FTIR-ATR para o filme de PHBV (A) e para os diferentes filmes de PHBV, sem e com óleo de orégano (B)



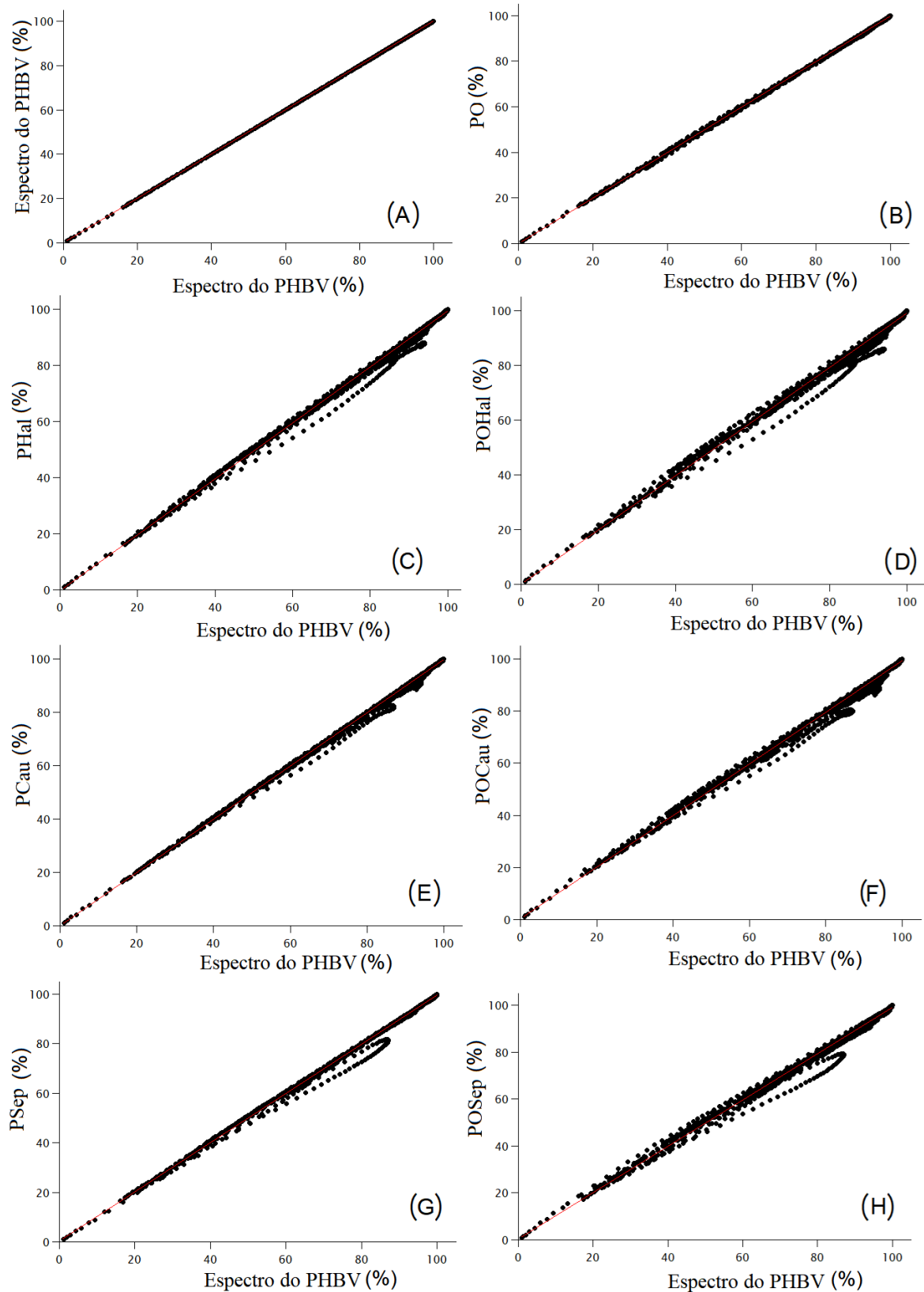
Fonte: Próprio autor

Para melhor compreensão dos dados obtidos na análise de FTIR foi utilizada a técnica dos mínimos quadrados, através do cálculo da correlação e o erro médio quadrático (RMSE) entre as diferentes curvas, permitindo a comparação entre os espectros obtidos (PEREIRA et al., 2016). Para a elaboração das curvas, as transmitâncias são normalizadas e comparadas entre si, como apresentadas na Figura 19. A Figura 19 (A) apresenta a comparação entre a transmitância da amostra de PHBV puro com o próprio filme de PHBV, fornecendo valores de correlação igual a 1,0 e RMSE igual a 0,0. Na Figura 19 (B) a transmitância do PHBV puro (eixo das abscissas) é comparada à transmitância do PHBV contendo óleo de orégano (eixo das ordenadas). Essa comparação permite visualizar o desvio de linearidade entre as transmitâncias e, conseqüentemente, verificar que houve uma modificação na estrutura química dos filmes devido à incorporação do óleo. A mesma comparação foi realizada para as demais formulações de filmes, contendo as diferentes argilas e com a incorporação do óleo essencial. As curvas vão apresentando aumento no desvio da linearidade conforme alteração na composição dos filmes.

O resultado numérico da comparação entre os espectros é apresentado na Tabela 2. Na formulação contendo apenas o óleo de orégano (PO) o valor de RMSE é alterado para 0,284. Embora a incorporação das argilas nos filmes de PHal, PCau e PSep represente um valor teórico de 3% m/m, é possível destacar um aumento nos valores de RMSE. Como esperado, a adição de cargas em escala nanométrica altera significativamente alguma propriedade da matriz polimérica.

A combinação entre os dois aditivos (óleo e argila) é o parâmetro que provoca maior desvio de linearidade entre os espectros, aumentando os valores de RMSE. Esse efeito indica que houve alteração na estrutura química dos filmes. Uma vez que a observação somente entre os espectros não pareceu clara, a técnica de mínimos quadrados se tornou necessária a ponto de poder afirmar que a incorporação dos diferentes aditivos foi efetiva no processo de fabricação dos filmes.

Figura 19: Análise comparativa das transmitâncias dos filmes de PHBV versus os filmes de PHBV puro (A) e as composições PO (B), PHal (C), POHal (D), PCau (E), POCau (F), PSep (G) e POSep (H)



Fonte: Próprio autor

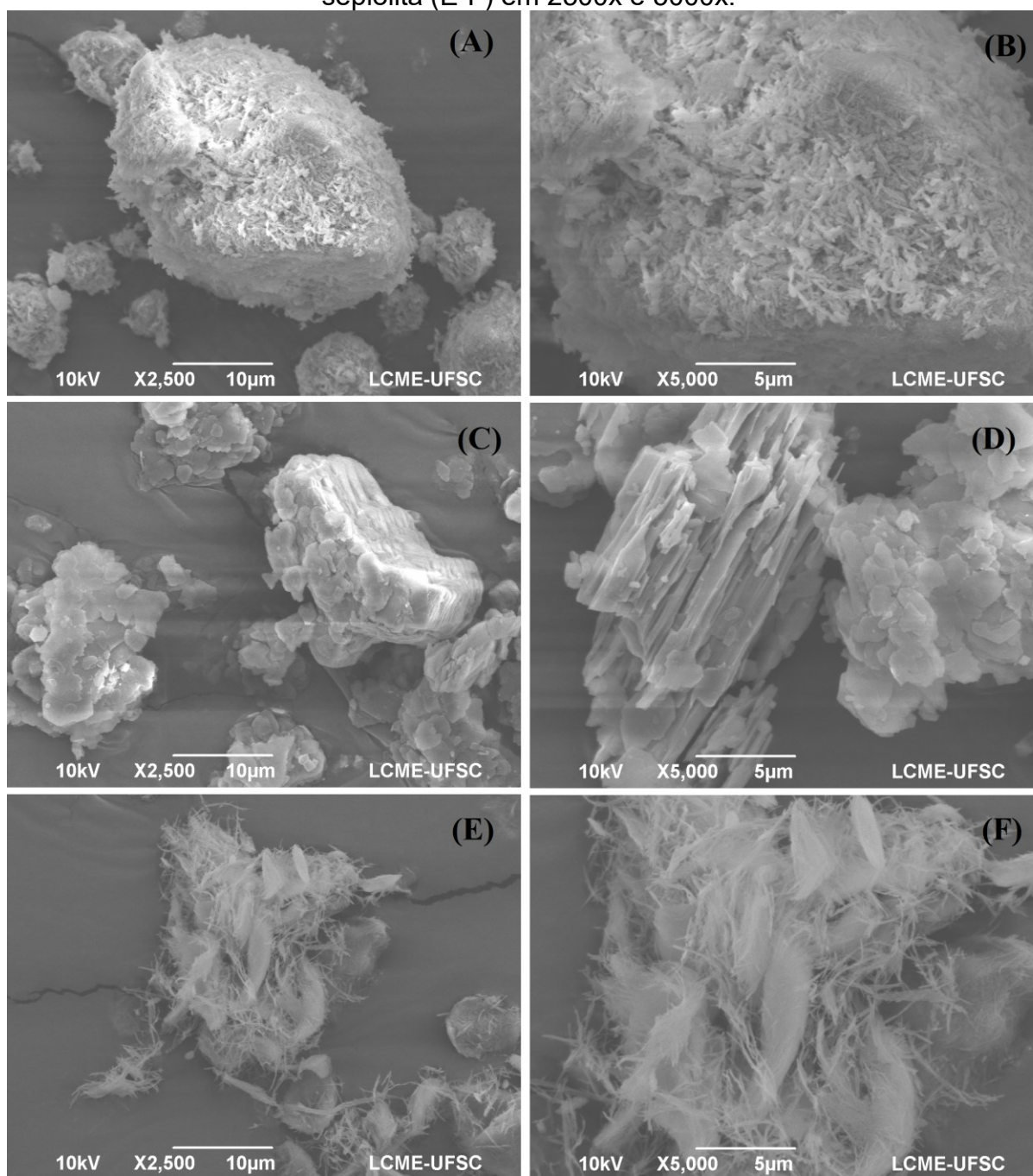
Tabela 2: Resultados de RMSE dos espectros após análise de FTIR/ATR

Amostras	Argila	Teor de argila (%)	Teor de óleo de orégano (%)	RMSE
P	-	-	-	0,000
PHal	Haloisita	3	-	0,991
PCau	Caulinita	3	-	0,710
PSep	Sepiolita	3	-	0,736
PO	-	-	8	0,284
POHal	Haloisita	3	8	1,375
POCau	Caulinita	3	8	1,161
POSep	Sepiolita	3	8	1,262

5.1.3 MEV

A morfologia das nanopartículas inorgânicas e dos filmes preparados foi analisada por MEV. As imagens das argilas são apresentadas na Figura 20, sendo evidente as diferenças morfológicas entre as cargas selecionadas. A observação de estruturas predominantemente aglomeradas pode estar associada à baixa ampliação do MEV e a absorção de umidade durante o armazenamento da carga. A microscopia referente à Figura 20 (A) está relacionada à nanopartícula de haloisita, que apresenta uma morfologia tubular. Na Figura 20 (C-D) é possível observar a morfologia lamelar da caulinita, com folhas compactadas. Por fim, na Figura 20 (E-F) encontra-se apresentada a estrutura da sepiolita, com morfologia de nanoagulhas. Embora a sepiolita também apresente aglomeração em seu estado sólido, essa nanopartícula apresenta elevada área superficial, evidente principalmente em maiores ampliações.

Figura 20: Micrografias das nanopartículas de haloisita (A-B), caulinita (C-D) e sepiolita (E-F) em 2500x e 5000x.



Fonte: Próprio autor

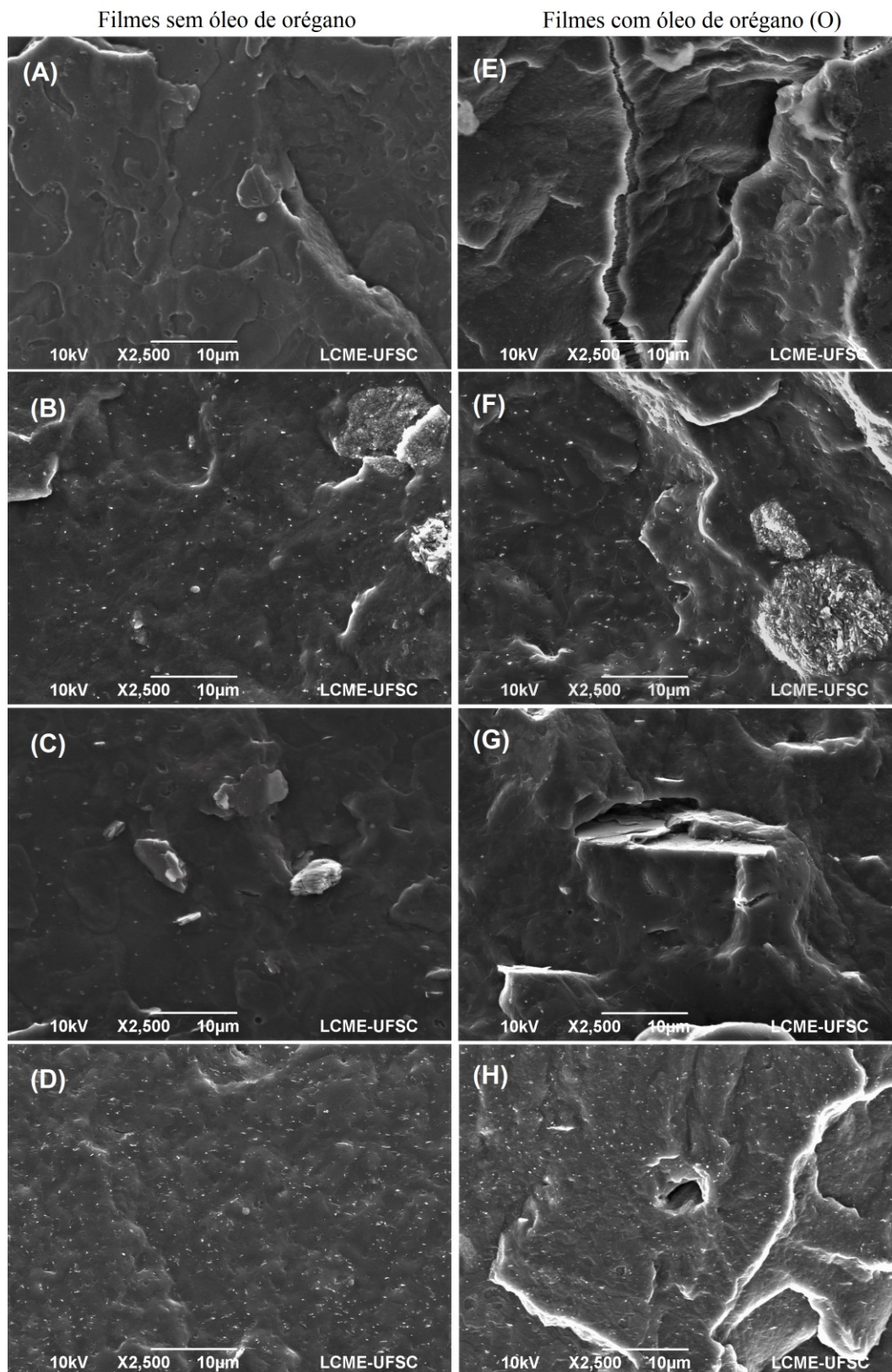
A Figura 21 apresenta as microscopias da seção transversal para o PHBV puro (A) e para os nanocompósitos PHal (B), PCau (C) e PSep (D), à esquerda. A Figura 21 (A) aponta uma superfície lisa típica de uma fratura frágil, comparável com resultados relatados por outros autores para a matriz de PHBV (JOST; LANGOWSKI, 2015). Nas demais imagens – Figura 21 (B), (C) e (D) – a região mais clara indica as nanopartículas, sendo possível observar a aglomeração encontrada

em cada formulação. É importante destacar que as argilas foram submetidas às mesmas condições de pré-processamento (secagem) e processamento. Comparando os três nanocompósitos produzidos, é possível afirmar claramente que os filmes contendo sepiolita apresentaram a melhor dispersão, com a carga inorgânica finamente dispersa ao longo da matriz de PHBV (Figura 21 (D)). Já os filmes de PHal e PCau (Figura 21 (B) e (C), respectivamente) apresentaram algumas estruturas aglomeradas. Essa dispersão limitada pode afetar a permeação de moléculas gasosas para o interior e/ou exterior do alimento, como será discutido mais a frente.

A incorporação do óleo de orégano resultou em aumento na rugosidade dos filmes (Figura 21 – imagens à direita), sugerindo mudanças no comportamento mecânico dos materiais como consequência do efeito plastificante do óleo. Também são observados alguns vazios e/ou rachaduras nos filmes, que podem estar relacionados à volatilização de óleo durante alguma etapa do processamento dos filmes. Na Figura 21 (F) e (G) ainda é possível observar a aglomeração de algumas nanopartículas de haloisita e caulinita, respectivamente, mesmo com a incorporação do óleo. É provável que para os filmes contendo caulinita, onde os grupos hidroxila estão presentes entre as lamelas, ocorra uma forte interação partícula-partícula e a carga tende a permanecer aglomerada. Já para os filmes contendo haloisita, embora os grupos silanol e aluminol presentes na superfície e bordas da nanopartícula possam interagir com o polímero, as forças de cisalhamento induzidas durante o processamento não foram suficientes para promover um maior nível de dispersão na carga.

Entretanto, nos filmes de POsep (Figura 21 (H)) a sepiolita segue homogeneamente dispersa ao longo da matriz polimérica. A boa dispersão das agulhas de sepiolita no PHBV também foi observada em outros estudos e pode ser explicada pela interação entre os grupos hidroxila na superfície da partícula e os grupos éster da cadeia do PHBV (GONZÁLEZ-AUSEJO et al., 2019).

Figura 21: Micrografias dos nanocompósitos (à esquerda) e dos respectivos filmes com óleo de orégano (à direita): P(A); PHal (B); PCau (C); PSep (D); PO (E); POHal (F); POCau (G) e POSep (H)



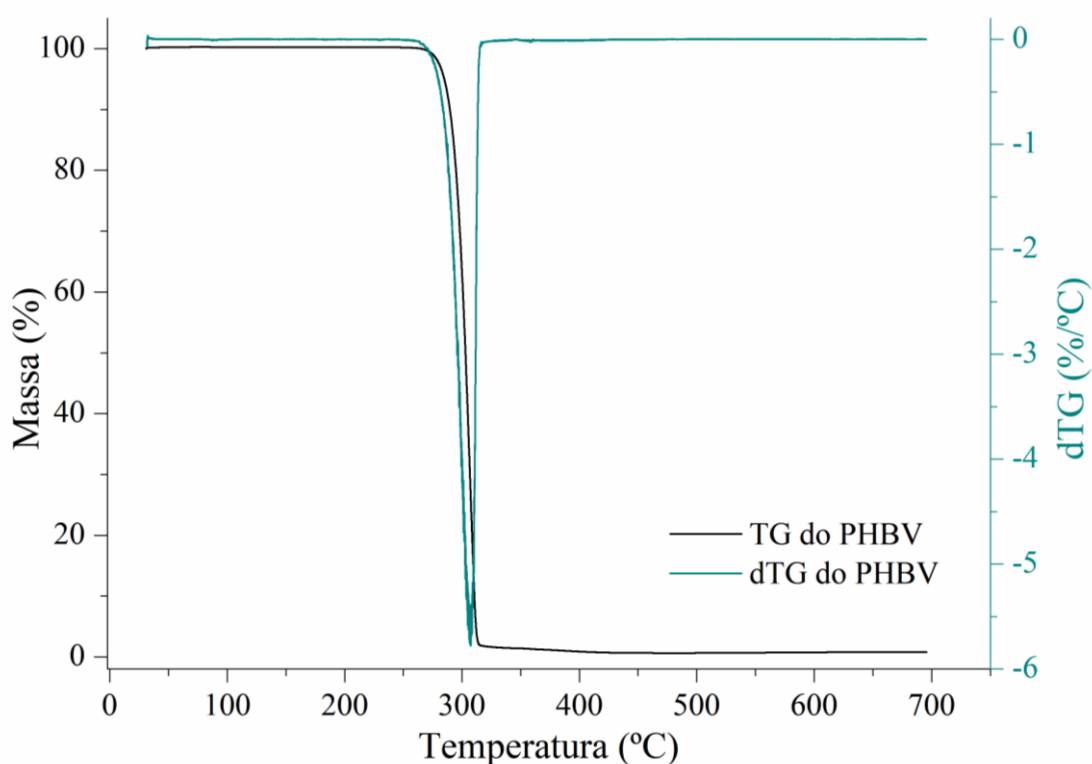
Fonte: Próprio autor

5.1.4 Propriedades térmicas: TGA, DSC e MO

A análise termogravimétrica fornece um importante resultado para a estimar a temperatura onde se inicia o processo de degradação nos materiais poliméricos, principalmente em biopolímeros que são materiais mais susceptíveis a sofrerem hidrólise e, conseqüente, quebra da cadeia. Além disso, em nanocompósitos, é uma ferramenta para estudar a estabilidade térmica dos materiais. O resultado da análise de TGA para o filme de PHBV encontra-se na Figura 22.

Para o PHBV puro, observa-se apenas um evento de perda de massa, na faixa de 265-319 °C, onde ocorre um mecanismo de cisão de cadeia aleatória (eliminação *cis*), levando a degradação da matriz polimérica (AOYAGI; YAMASHITA; DOI, 2002; SHAKIL; MASOOD; YASIN, 2017). Além disso, o produto final da degradação do PHBV são CO₂ e H₂O (MAZUR et al., 2022).

Figura 22: Curva de TGA para o filme de PHBV produzido



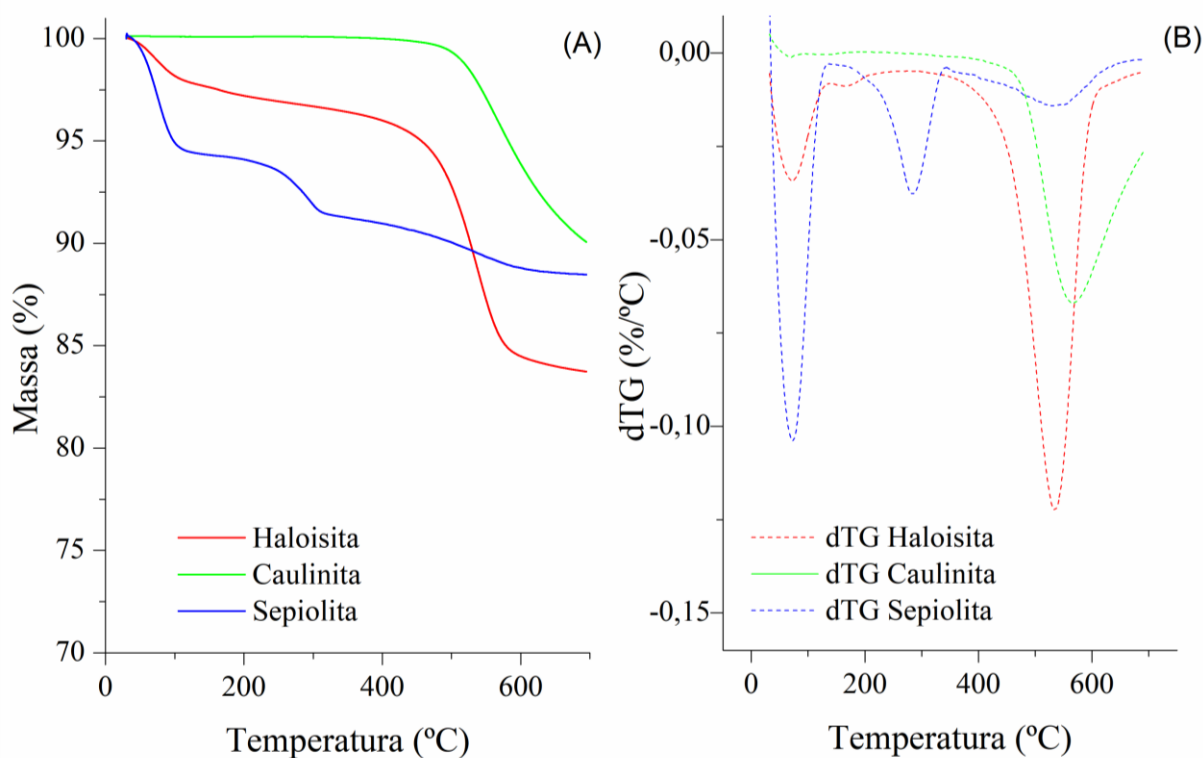
Fonte: Próprio autor

Para as nanopartículas inorgânicas, inicialmente é possível destacar a presença de água adsorvida em cada nanopartícula. A amostra de caulinita, que apresenta estrutura lamelar, não apresenta nenhum evento de perda de massa

associada à presença de água, corroborando os resultados de FTIR-DRIFT. Entretanto, para a haloisita e sepiolita, é possível verificar uma perda de massa de 2,07% e 5,61%, respectivamente, até a temperatura de 120 °C.

Outra característica observada no termograma das argilas está relacionada à decomposição parcial das nanopartículas, perdendo grupos hidroxila em altas temperaturas de acordo com mecanismos de desidroxilação (FROST; DING, 2003). Este evento de degradação térmica ocorre na faixa de temperatura de 280 °C a 628 °C para a haloisita, 456 °C a 626 °C para a caulinita e 377 °C até 618 °C para a sepiolita. Apesar disso, todas as partículas ainda apresentam boa parte da sua estrutura química mantida em 650 °C, podendo ser confirmado pelos altos valores de massa residual no TGA.

Figura 23: Curvas de TGA das nanopartículas de haloisita, caulinita e sepiolita (A) e respectivas curvas de dTG (B)



Fonte: Próprio autor

A Figura 24 apresenta os termogramas das diferentes formulações de filmes, bem como a curva de TGA associada ao óleo essencial de orégano. O óleo (curva roxa tracejada) inicia seu processo de volatilização em torno de 80 °C, com máximo de perda de massa em torno de 198 °C e, em 270 °C, apresenta total volatilização. Essa informação condiz com a estabelecida pela literatura para a temperatura de

ebulição do óleo em 246 °C (HOSSEINI et al., 2013).

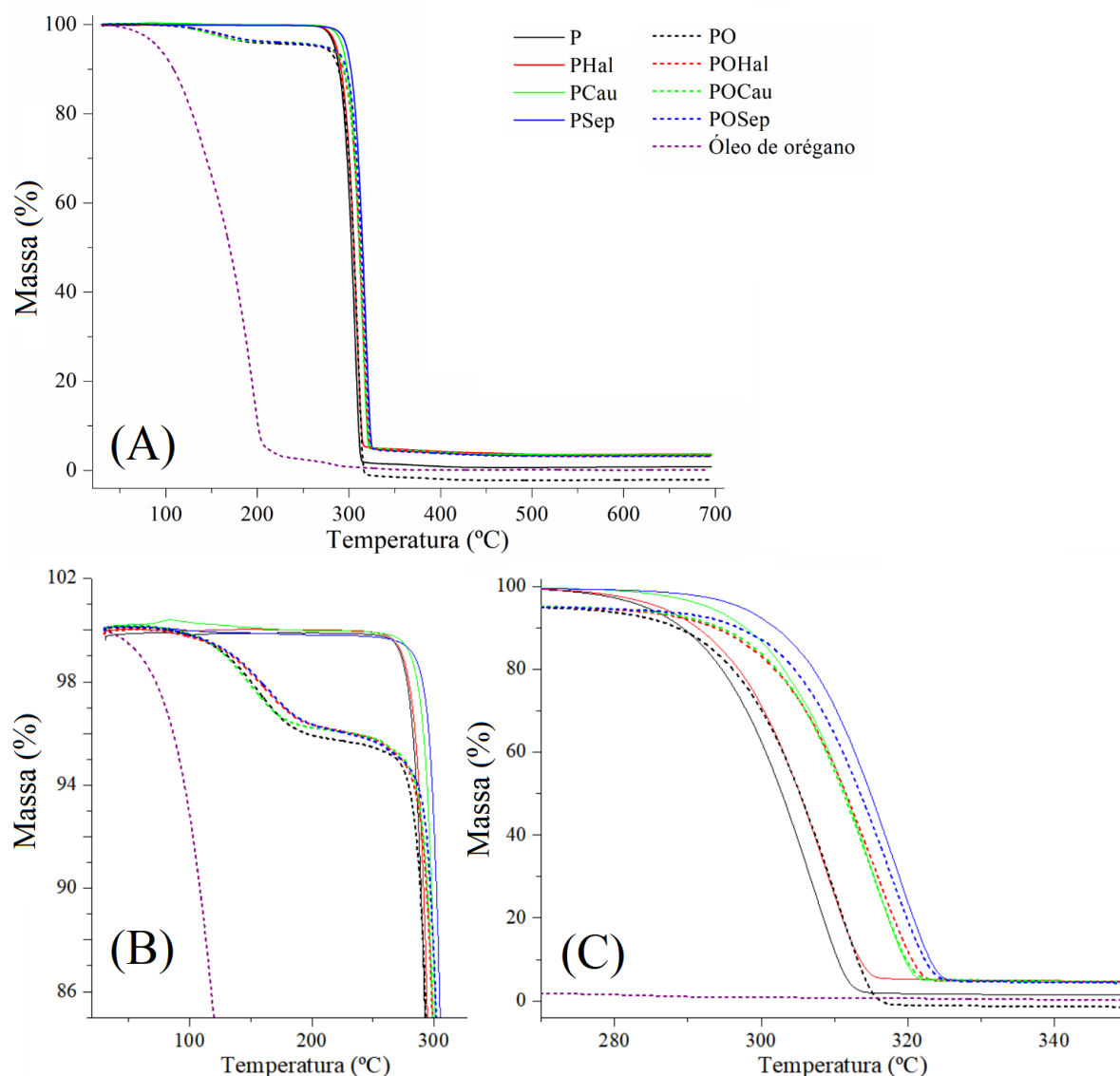
É possível também perceber a diferença entre as curvas que contém óleo de orégano, destacando na Figura 24 (B) e (C) os eventos térmicos associados em cada faixa de temperatura. A Figura 24 (B) destaca o intervalo da análise onde ocorre a volatilização do óleo de orégano. É possível perceber a perda de massa em todas as curvas tracejadas, que contém óleo de orégano, indicando a saída do óleo até a temperatura de 270 °C. Posteriormente a essa temperatura, o comportamento de degradação segue o esperado para filmes onde o constituinte principal é o PHBV, ou seja, um evento de perda de massa em torno de 300 °C. Através desta observação, é possível estimar o teor incorporado de óleo essencial de orégano nos filmes preparados.

O destaque na Figura 24 (C) refere-se à estabilidade térmica dos filmes. Todas as curvas de perda de massa foram deslocadas para a direita em comparação à curva do polímero PHBV. Esse efeito indica que a estabilidade térmica dos materiais aumenta tanto com a adição da argila, quanto com a incorporação do óleo de orégano. Na prática, o aumento da estabilidade térmica é interessante pois aumenta a janela de processamento de materiais biodegradáveis.

Os resultados numéricos do TGA estão consolidados na Tabela 3. Como mencionado anteriormente, a incorporação das argilas influenciou a estabilidade térmica dos filmes, aumentando os valores de T5% (temperatura onde ocorre a perda de 5% da massa) e Td (temperatura de máxima taxa de degradação). A redução de T5% observada nas formulações contendo óleo essencial refere-se à volatilização do óleo, sem afetar os estágios iniciais de degradação do polímero.

A presença de argila em nanocompósitos contendo o óleo de orégano retardou o processo de degradação do óleo. A $T_{d\text{óleo}}$ de 159 °C para o filme de PO foi deslocada para 166 °C nos filmes de POHal, 164 °C nos filmes de POCau e 170 °C para o filme de POSep. Esse resultado pode indicar uma interação entre o óleo e as diferentes nanopartículas, aumentando tanto a estabilidade térmica dos filmes quanto do aditivo antimicrobiano. Resultados semelhantes foram observados por Persico et al. (2009) ao incorporar carvacrol e montmorilonita em filmes de LDPE (PERSICO et al., 2009).

Figura 24: Curva de TGA do óleo de orégano e das diferentes formulações de filmes (A), ampliação na temperatura de volatilização do óleo (B) e ampliação na temperatura de degradação do PHBV (C)



Fonte: Próprio autor

Outro destaque importante é que a incorporação de óleo de orégano aumentou a Td dos nanocompósitos de PHBV/argila. Para filmes de PHal, a Td aumentou de 309 °C (sem óleo) para 316 °C (com óleo). É possível que a incorporação de óleo de orégano tenha melhorado a dispersão da haloisita, aumentando a área específica das nanopartículas e melhorando a propriedade térmica dos filmes. Para as nanopartículas de caulinita, mesmo com sua fraca dispersão na matriz de PHBV obteve-se um aumento na Td, de 308 °C para o PHBV a 316 °C para ambos os filmes de PCau e POCau. A incorporação das nanopartículas de sepiolita – que apresenta melhor dispersão na matriz de PHBV

(segundo análise de MEV) – foi responsável pelos maiores valores de Td: 319 °C para PSep e 317 °C para POsep. Esse efeito pode estar relacionado à interação entre OEO e sepiolita, cujos grupos químicos são mais acessíveis do que outras argilas.

Tabela 3: Temperaturas de degradação e percentual de incorporação dos aditivos após processamento

Filmes	Td _{óleo} (°C)	T _{5%} (°C)	Td _{max} (°C)	Óleo incorporado (%)	Eficiência de incorporação do óleo (%)	Argila incorporada (%)
P	-	284	308	-	-	-
PHal	-	286	309	-	-	3,4
PCau	-	293	316	-	-	3,0
PSep	-	297	317	-	-	2,8
PO	159	270	311	4,6	57	-
POHal	166	274	316	4,2	52	2,9
POCau	164	276	316	4,3	53	2,8
POsep	170	273	317	4,4	54	2,7

A partir dos dados da TGA, também foi possível estimar o teor de incorporação desses aditivos nos filmes preparados. A incorporação de óleo de orégano foi determinada a partir da massa residual em 255 °C. Da mesma forma, o teor de argila presente nas formulações foi calculado pelo resíduo a 690 °C.

Os resultados da Tabela 3 indicaram eficiência de incorporação em torno de 57% para o filme PO e, em menor rendimento, 52% para o filme de POHal. Essa perda de material é esperada, uma vez que o polímero e as cargas são submetidos a aquecimento durante o processamento (165 °C) e moldagem dos filmes (190 °C). Nessas condições, pode ocorrer volatilização parcial do óleo de orégano.

O teor real de óleo nos filmes foi de 4,4% (m/m) de óleo na composição de POsep, 4,2% no filme de POHal e 4,3% para o filme POCau. Esse efeito corrobora a interação entre os grupos hidroxila disponíveis na superfície da sepiolita com o óleo de orégano. Além disso, o maior teor de óleo nesses filmes também pode indicar a proteção do óleo pela nanopartícula de sepiolita. Para as demais argilas, os pontos de interação entre a argila e o óleo tornam-se menores devido a sua própria

estrutura morfológica e a aglomeração das mesmas, resultando em um maior percentual de óleo perdido. Entretanto, vale destacar a proximidade entre os resultados obtidos, reforçando que todos os materiais apresentaram incorporação satisfatória do agente antimicrobiano.

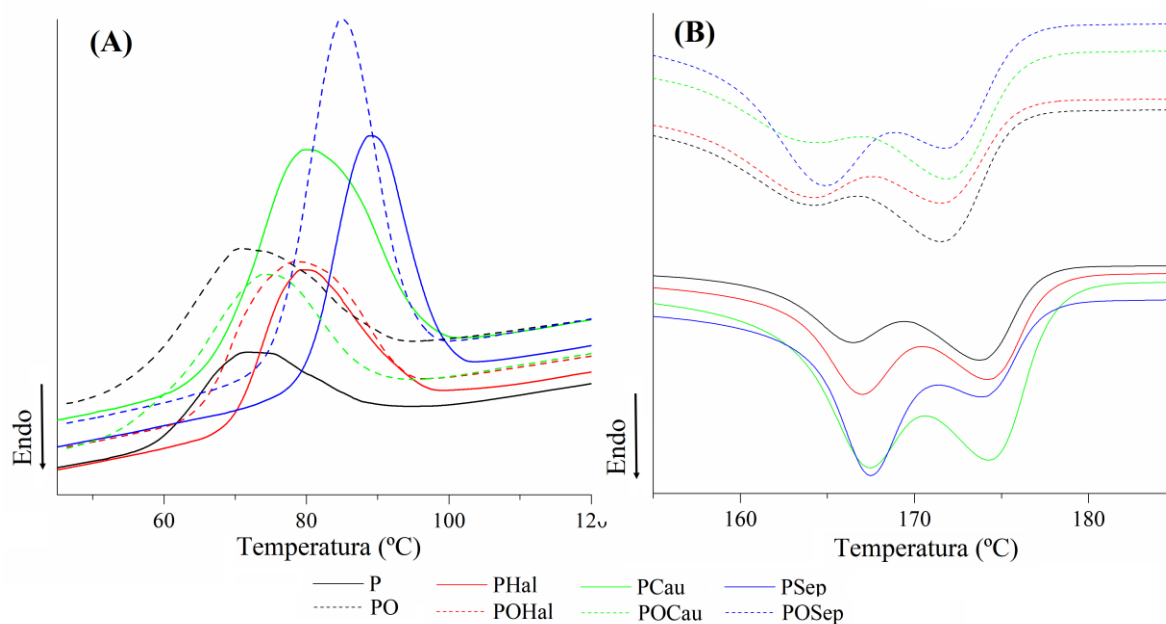
Quanto às nanopartículas, considerando o teor teórico de 3% (m/m) de argila, pode-se verificar que as formulações mantiveram aproximadamente o mesmo percentual de carga inorgânica, indicando perda mínima de material durante o processamento e uma boa homogeneidade das amostras.

5.1.4.1 Caracterização da cristalização por DSC e MO

Os materiais também foram avaliados pela análise térmica de DSC, a fim de observar propriedades importantes para a caracterização dos filmes, como temperatura de cristalização (T_c) determinada durante o resfriamento, temperatura de fusão cristalina (T_m) e grau de cristalinidade (X_c) dos materiais, estimadas no segundo aquecimento. A Figura 25 (A) apresenta os resultados de resfriamento para as diferentes composições. É possível verificar a tendência de aumento da T_c em todos os filmes onde foram incorporadas as nanopartículas. Esse aumento na T_c pode indicar um efeito nucleante das nanopartículas na cristalização de PHBV, aumentando a densidade de nucleação nas composições e, conseqüentemente, originando maior quantidade de esferulitos em comparação com o filme de PHBV puro.

Os resultados obtidos durante o segundo aquecimento são apresentados na Figura 25 (B). A ocorrência de picos duplos de fusão (T_{m1} e T_{m2}) foi observada para todas as composições de PHBV. Esse comportamento já foi observado para o PHBV por diversos trabalhos (CARLI; CRESPO; MAULER, 2011; WANG et al., 2005). Alguns autores sugerem que o primeiro evento térmico estaria relacionado a uma recristalização do polímero, caracterizando como temperatura de fusão dos cristais somente o segundo evento térmico (T_{m2}) (YU et al., 2014). No entanto, neste trabalho, os dois picos endotérmicos estão muito próximos e o aparecimento do pico duplo pode estar associado à fusão de estruturas cristalinas de diferentes tamanhos presentes na matriz de PHBV.

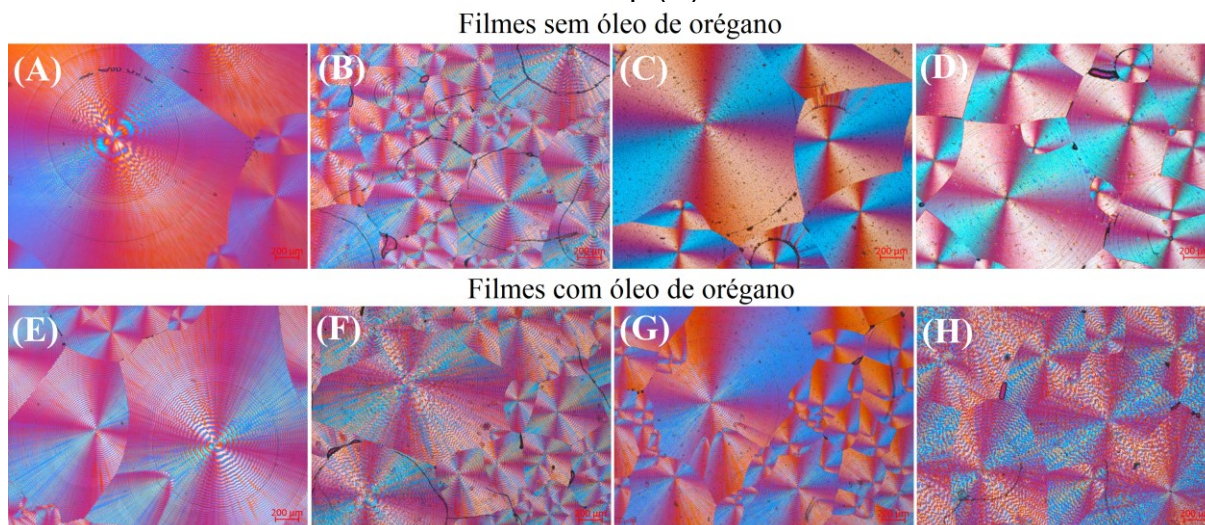
Figura 25: Curvas de cristalização (A) e fusão (B) para os filmes de PHBV



Fonte: Próprio autor

Além disso, é possível identificar uma tendência das curvas de DSC: para os filmes de P e PO, o pico de fusão referente à T_{m2} é maior que o pico da T_{m1} . Com a adição das nanopartículas, entretanto, os picos referentes à T_{m1} apresentaram maior intensidade. Essa tendência foi corroborada por micrografias ópticas, apresentada na Figura 26 sugerindo que, de fato, cada evento endotérmico está relacionado à fusão de esferulitos de diferentes tamanhos. O polímero puro (P) exibiu esferulitos de tamanhos uniformes. Com a incorporação das argilas, a formação de núcleos cristalinos foi predominante, confirmando a hipótese sugerida anteriormente onde as nanopartículas atuariam como agentes nucleantes na matriz de PHBV. Assim, esferulitos de diferentes tamanhos seriam formados, implicando em diferentes temperaturas de fusão onde estruturas menores fundem primeiro. Além disso, as formulações PHal e PSep apresentaram maior quantidade de esferulitos, formando cristalitos de tamanhos menores. Conforme já discutido por MEV, essas formulações apresentaram melhor dispersão. Já para os filmes de PCau, é observado uma menor quantidade de esferulitos, além de apresentarem forma irregular. As estruturas aglomeradas encontradas no nanocompósito PCau por MEV podem ter levado à formação de cristalitos mais imperfeitos. Assim, o pico de T_{m1} deste material apresenta intensidade semelhante ao pico de T_{m2} .

Figura 26: Morfologia dos esferulitos obtidas por microscopia óptica com luz polarizada para P (A), PHal (B), PCau (C), PSep (D), PO (E), POHal (F), POCau (G) e POSep (H).



Fonte: Próprio autor

A incorporação do óleo de orégano não afetou significativamente a aparência das curvas DSC, bem como a morfologia dos esferulitos, apresentando a mesma tendência do nanocompósito associado sem o óleo. No entanto, vale notar um deslocamento da T_m para temperaturas mais baixas (Tabela 4), indicando que o óleo de orégano pode atuar como plastificante, aumentando a flexibilidade das cadeias do PHBV. Este comportamento, aliado à maior estabilidade térmica promovida pela incorporação de nanopartículas de argila, permite que o PHBV seja processado a 165 °C sem degradação de suas macromoléculas.

Os valores obtidos pela análise de DSC estão expostos na Tabela 4. O intervalo de temperatura onde acontece a fusão cristalina do PHBV está de acordo com a temperatura de fusão encontrada em outros trabalhos (IGGUI et al., 2015). Além das informações obtidas na interpretação das curvas, também é possível identificar que os valores de cristalinidade dos filmes sofreram um significativo aumento, chegando a valores de 80% para a amostra de PSep e 79% para POHal em comparação ao grau de cristalinidade do polímero puro (P). O grau de cristalinidade do PHBV em 66% também foi observado em outro trabalho (CASTRO-MAYORGA et al., 2017). O efeito da combinação de argila e óleo essencial no comportamento cristalino dos filmes pode ser resultado no aumento da mobilidade das cadeias agregado ao efeito nucleante das argilas bem dispersas, como discutido anteriormente.

Tabela 4: Resultados térmicos obtidos por DSC

Filmes	T _c (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	ΔH _m [*] (J/g)	X _c (%)
P	71	166	174	97	66
PHal	79	167	174	109	77
PCau	79	167	174	110	77
PSep	89	167	174	113	80
PO	70	164	171	112	84
POHal	78	164	171	103	79
POCau	79	164	172	100	77
POSep	85	165	172	103	79

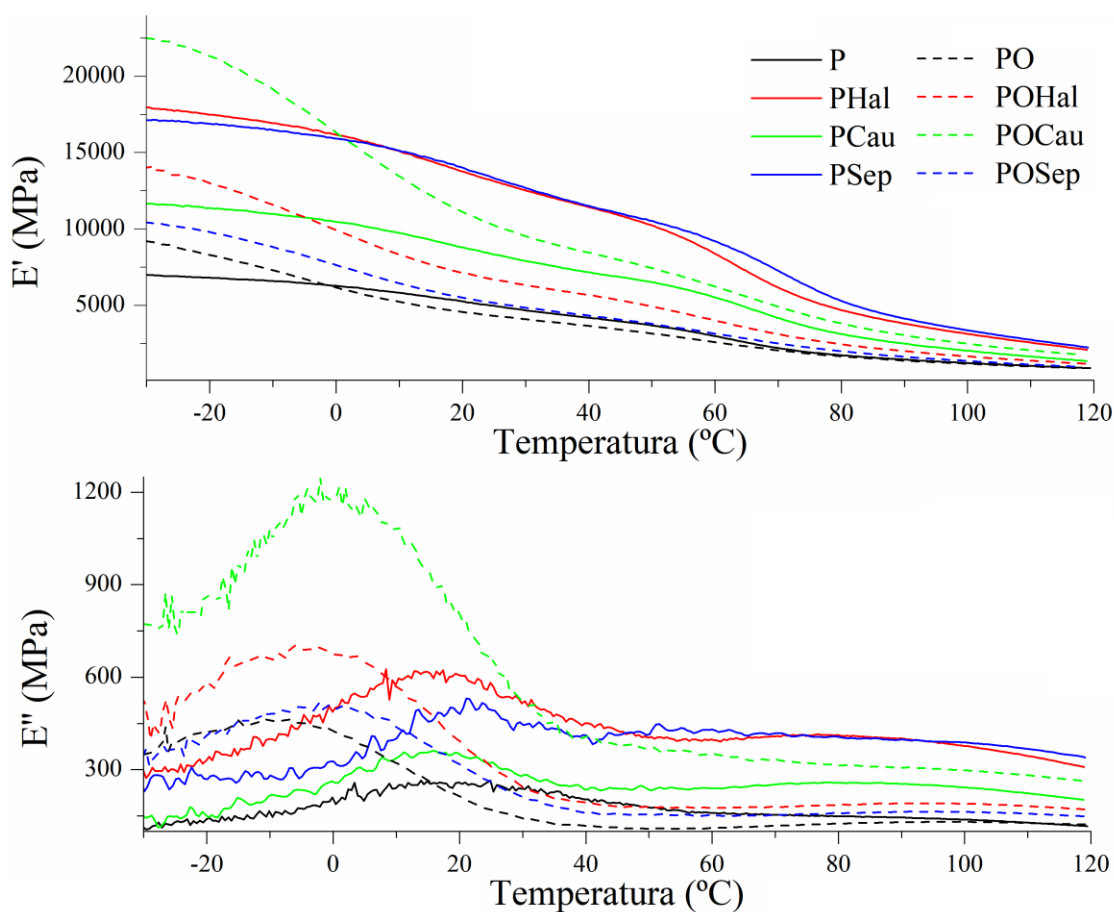
ΔH_m^{*}(J/g): Somatório da área de T_{m1} e T_{m2}

5.1.5 DMA

A influência das nanopartículas e do óleo essencial sobre as propriedades mecânicas dos filmes de PHBV foi avaliada por DMA. A Figura 27 apresenta as curvas obtidas quanto ao módulo de armazenamento (E') e módulo de perda (E''), respectivamente.

É possível observar um aumento significativo do módulo de armazenamento em toda a faixa de temperatura para os nanocompósitos de PHal, PCau e PSep em comparação com a curva de E' para o polímero puro (P – curva em preto). Esse comportamento indica que a adição das nanopartículas de argila melhora as propriedades elásticas da matriz de PHBV, aumentando a rigidez dos filmes (IGGUI et al., 2015). As curvas de PHal e PSep encontram-se próximas indicando que as nanopartículas de haloisita e sepiolita, respectivamente, contribuíram com o aumento do módulo mais fortemente do que as nanopartículas de caulinita, que apresentou menor módulo. Tal efeito está relacionado à interação polímero-argila. As nanopartículas de haloisita e sepiolita apresentam grupos hidroxilas mais acessíveis do que as nanopartículas de caulinita, onde os grupos hidroxilas estão localizados dentro das lamelas. Esses grupos podem interagir com a carbonila do grupamento éster de PHBV, aumentando a interação entre as cadeias e facilitando a dispersão das cargas na matriz polimérica (CARLI; CRESPO; MAULER, 2011). Com isso, as propriedades mecânicas dos filmes de PHal e PSep apresentam um comportamento mais próximo enquanto o filme de PCau apresenta uma curva de E' deslocada das demais, devido a aglomeração da caulinita (conforme verificado na análise de MEV).

Figura 27: Módulo de armazenamento (E') e módulo de perda (E'') obtido nos ensaios de DMA



Fonte: Próprio autor

Quando avaliadas as curvas contendo óleo de orégano (linhas tracejadas), o comportamento passa a ser um pouco diferente. Em temperaturas mais baixas (abaixo da transição vítrea do polímero) todos os filmes contendo óleo essencial apresentaram maior E' quando comparado ao PHBV puro. Este efeito indica que a incorporação do óleo de orégano na matriz de PHBV, junto as demais nanopartículas, pode contribuir para um aumento das interações entre os componentes do filme. Como resultado, o desempenho dos filmes em aplicações de embalagem pode ser ajustado com a seleção adequada de argila/óleo, produzindo materiais com propriedades funcionais.

Além dos resultados obtidos para o módulo de armazenamento, algumas considerações também podem ser feitas na Figura 27 quanto ao módulo de perda (E''), associado à componente viscosa do polímero. O módulo de perda para o polímero puro está representado pela curva em preto. Com a adição das

nanopartículas inorgânicas houve um aumento significativo no E'' dos materiais. Isto era esperado, visto que como há uma maior energia armazenada, maior será sua dissipação de energia. Assim como no módulo E' , os filmes de PHal e PSep também apresentaram maior módulo de perda E'' em comparação aos filmes de P puro e PCau. Ainda, é possível verificar a tendência do deslocamento das curvas E'' para temperaturas menores com a incorporação de óleo de orégano, evidenciando um efeito plastificante do óleo nas composições.

Os resultados numéricos do módulo de armazenamento bem como os valores de Tg estão expostos na Tabela 5. Os valores de Tg são obtidos da curva de $\tan\delta$, apresentado mais à frente na Figura 28. Os valores de E' a 25 °C são menores do que os observados a -25 °C. Esse efeito é observado uma vez que atingido a temperatura de transição vítrea do polímero, o material ganha mais mobilidade, reduzindo os valores de E' .

Tabela 5: Módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e temperatura de transição vítrea (Tg) obtidos por DMA

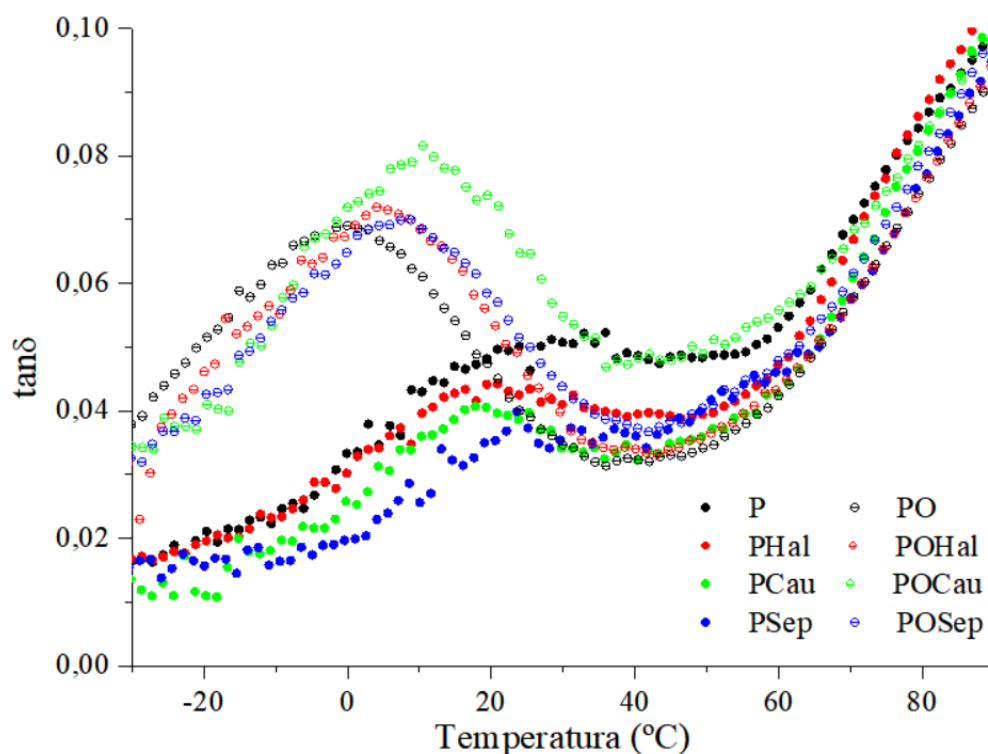
Filmes	E' (MPa) a -25°C	E' (MPa) a 25°C	E'' (MPa) a 25°C	Tg (°C)
P	6910	4984	265	24,8
PHal	17780	13136	468	23,1
PCau	11507	8333	617	17,6
PSep	17085	13335	704	23,7
PO	8765	4330	371	-0,5
POHal	13542	6710	1248	5,8
POCau	22031	10266	552	10,6
POSep	10176	5162	522	8,6

Visto que a $\tan\delta$ é a razão entre o módulo de perda (E'') e o módulo de armazenamento (E'), as nanopartículas diminuem a dissipação de energia, ou seja, há uma restrição na mobilidade das cadeias do polímero devido às interações partícula/polímero. A visualização da temperatura de transição vítrea permite caracterizar a mobilidade entre os sistemas preparados.

O PHBV puro apresenta Tg em torno de 24,8 °C que é ligeiramente deslocada para 23,1 °C, 17,6 °C e 23,7 °C nos nanocompósitos contendo haloisita, caulinita e sepiolita, respectivamente. Na Figura 28 esse efeito é visualizado através do deslocamento das curvas de $\tan\delta$ dos nanocompósitos em relação à curva do polímero puro. Esse comportamento é significativamente alterado com a

incorporação do óleo essencial de orégano. Os valores de Tg são reduzidos para -0,5 °C para o filme PO. Tal efeito pode ser justificado pela atuação do óleo como plastificante na matriz PHBV, aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas pelo aumento da distância entre elas. Esse efeito plastificante do óleo também é evidenciado nas composições com a combinação óleo/argila, com valores de 5,8°C, 10,8°C e 8,6°C para POHal, POCau e POsep, respectivamente. Na Figura 28 essa redução é destacada pelo deslocamento de todas as curvas para a esquerda.

Figura 28: Curvas de $\tan\delta$ para os diferentes nanocompósitos



Fonte: Próprio autor

5.1.6 Permeabilidade ao oxigênio

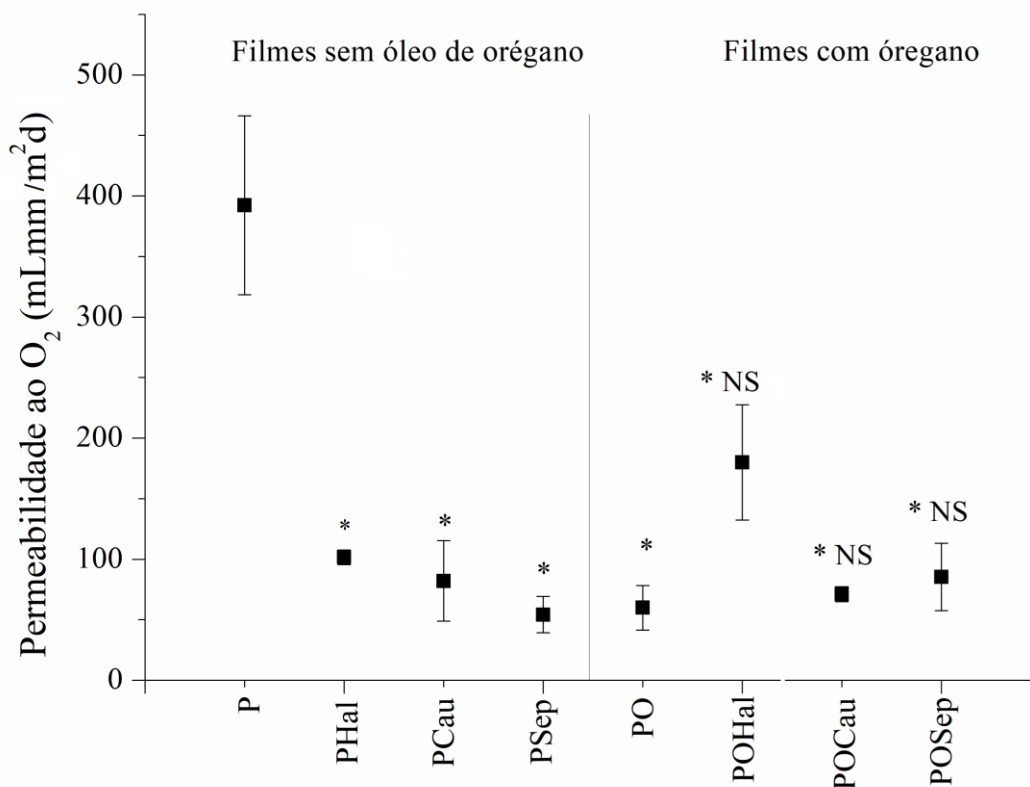
A caracterização dos filmes de PHBV/argila/óleo também foi realizada quanto à permeabilidade ao oxigênio. O oxigênio pode causar oxidação, que é um estágio inicial de várias formas de deterioração dos alimentos. Um filme que atua como uma barreira adequada ao oxigênio pode ajudar a manter características sensoriais do alimento, prolongando o tempo de prateleira (KLANGMUANG; SOTHORNVIT, 2016). A Figura 29 apresenta o resultado de permeabilidade ao O₂ das diferentes amostras.

O filme de PHBV puro apresenta valor de permeabilidade de 392,4 mLmm/m²d. Com a incorporação das diferentes argilas, os valores foram reduzidos

em 70% ou mais, de acordo com cada composição. Essa redução é identificada por um asterisco na Figura 29, onde todas as formulações foram estatisticamente diferentes com $p < 0,05$ quando comparadas ao filme de PHBV puro. A redução mais significativa no valor da permeabilidade foi alcançada no nanocompósito PSep, com valor de 54,3 mLmm/m²d. Esse resultado está de acordo com a maioria dos resultados anteriores, indicando que a sepiolita apresenta a melhor dispersão na matriz de PHBV e, como consequência, atua diretamente como barreira à permeação de oxigênio.

Alguns trabalhos com óleos essenciais não confirmam o efeito de barreira nos filmes com a adição de agentes antimicrobianos (ROJAS-GRAÜ et al., 2007). Entretanto, no presente estudo, foi observada uma notável redução da permeabilidade no filme PO e na combinação óleo de orégano/argila. Este fenômeno pode estar associado ao aumento da cristalinidade dos filmes (conforme Tabela 4) em comparação com o polímero puro e os filmes sem óleo. De fato, os domínios cristalinos também atuam como uma barreira, impedindo a difusão das moléculas de oxigênio (KANEHASHI et al., 2010). Além disso, ao comparar as composições com a mesma argila, não foi possível verificar diferença significativa entre os pares PHal e POHal, PCau e POCau, e PSep com POSep (Indicado na Figura 29 pelo código "NS"). Isso confirma que não houve efeito negativo da incorporação de óleo aos materiais quanto à permeabilidade ao oxigênio.

Figura 29: Resultados de permeabilidade ao oxigênio dos diferentes filmes preparados.



Sendo *: Estatisticamente significativo em comparação com filme de P ($p < 0,05$)

NS: Não significativo em comparação com o respectivo filme isento de óleo

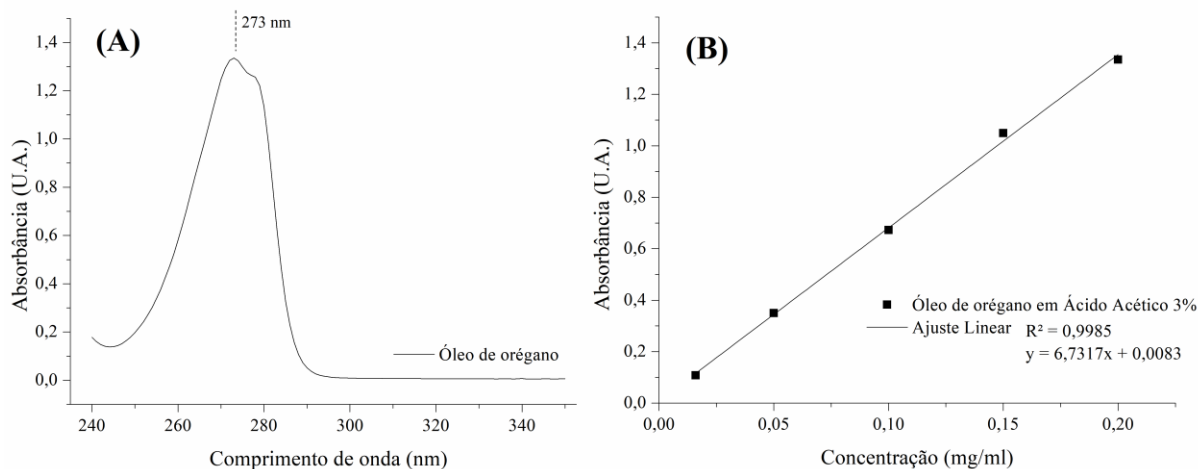
Fonte: Próprio autor

5.1.7 Estudo de liberação controlada do óleo de orégano

Os nanocompósitos contendo óleo essencial de orégano foram usados para o estudo de liberação em meio simulando o ambiente de produtos lácteos. Esses estudos permitem compreender a taxa de liberação do óleo nas diferentes formulações e assim, verificar a influência de cada nanopartícula no controle da liberação do agente antimicrobiano.

Inicialmente ao ensaio, uma solução de óleo de orégano em ácido acético (3%v/v) foi preparada e analisada por UV para determinação do comprimento de onda a ser feita a quantificação. O pico característico em 273 nm, como mostra a Figura 30, encontra-se condizente com a literatura e foi usado para elaborar a curva analítica de óleo de orégano (CAMPOS-REQUENA et al., 2015a). Os dados obtidos estão apresentados na Figura 30.

Figura 30: Espectro UV do óleo de orégano em ácido acético (A) e curva analítica construída para a quantificação do ensaio de liberação (B)



Fonte: Próprio autor

Com base nos valores satisfatórios de R^2 e com a equação relacionando concentração do óleo e absorbância, foi possível estudar o percentual de ativo antimicrobiano liberado em cada formulação do filme no meio proposto, ao longo de diferentes tempos de ensaio.

O ensaio de liberação do óleo de orégano em ácido acético (3%v/v) foi conduzido ao longo de 48 h. A Figura 31 apresenta os pontos obtidos no ensaio, com o ajuste cinético usando o modelo de Korsmeyer-Peppas. Os parâmetros obtidos estão apresentados na Tabela 6. Em todas as formulações foi possível identificar uma liberação gradual do óleo de orégano. Essa informação é interessante para a aplicação em embalagens ativas, pois espera-se obter uma liberação gradual do composto ativo ao longo da vida de prateleira do alimento, evitando o crescimento da população bacteriana.

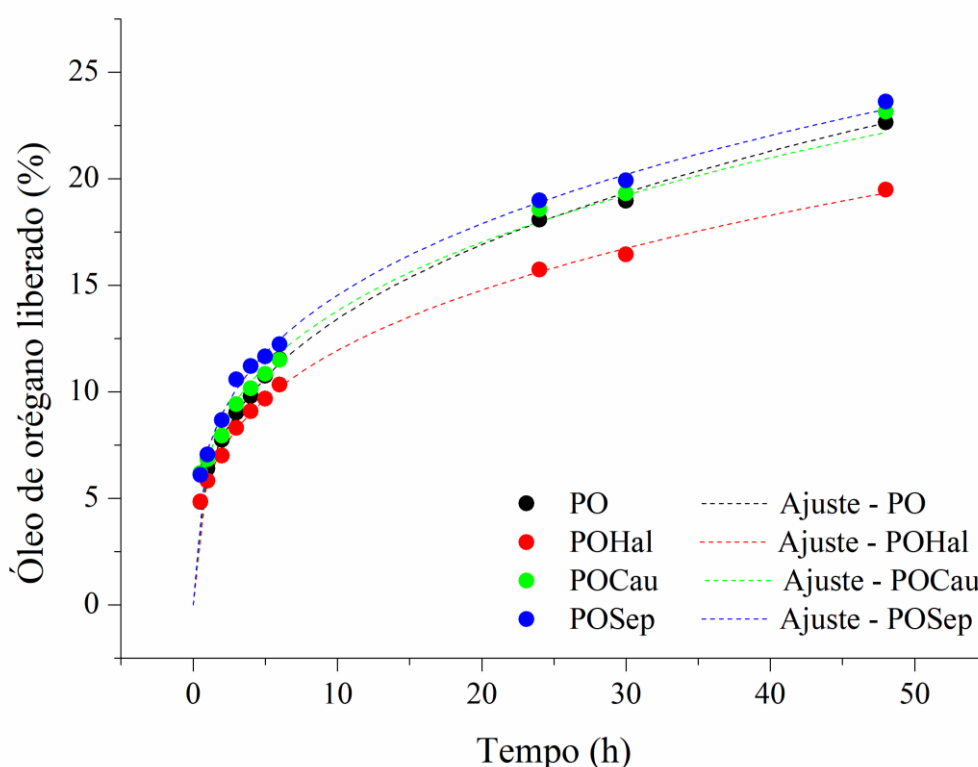
Para o filme contendo somente o óleo (PO) foi observada uma liberação de $11,5\% \pm 0,5\%$ de antimicrobiano após 6 h de análise, completando $22,6\% \pm 0,7\%$ em 48 h. O ajuste adequado dos dados experimentais aos dados do modelo é destacado através do erro quadrado médio (R^2) de 1,00 para os filmes de PO, POHal e POsep, e 0,99 para o filme de POCau. Esse modelo segue equação:

$$F = K_{KP} \times t^n \quad \text{Eq. 5}$$

Onde F é a fração de aditivo liberada, K_{KP} a constante da taxa de liberação, t o tempo e n o coeficiente de difusão. O parâmetro $n \leq 0,43$ indica que a liberação do

ativo segue por processo de difusão; $n = 0,85$ indica que a liberação ocorre conforme acontece relaxamento da cadeia do polímero; enquanto que n com valor entre 0,43 e 0,85 indica um mecanismo de transporte não Fickiano, com os processos de difusão e erosão do polímero acontecendo concomitantemente e, conseqüentemente, liberando o ativo.

Figura 31: Curva de liberação do óleo de orégano em ácido acético com ajuste cinético usando modelo de Korsmeyer-Peppas



Fonte: Próprio autor

Na Tabela 6, é observado n em torno de 0,31 para todas as formulações de filmes. Muitos estudos destacam que o processo de liberação em PHBV acontece através de difusão e degradação da matriz. Entretanto, pode ser que o processo de degradação da matriz de PHBV comece a acontecer em estágios superiores ao tempo de análise ensaiado. Além disso, essa característica torna-se interessante para aplicação em alimentos, uma vez que não há interferência da erosão do material de embalagem na liberação do ativo antimicrobiano. Nesse contexto, a liberação de óleo de orégano em meio de ácido acético (3%v/v) acontece, unicamente, pelo processo de difusão através da matriz de PHBV. Esse parâmetro evidencia a importância da seleção adequada da carga inorgânica, uma vez que a

dispersão da carga, a interação entre carga e aditivo e as características de cristalinidade resultante com a combinação desses materiais pode alterar a difusão do óleo através do polímero.

Tabela 6: Parâmetros obtidos no DDSolver para o modelo de Korsmeyer-Peppas.

Modelo: Korsmeyer-Peppas				
Parâmetros	PO	POHal	POCau	POSep
K_{KP}	6,24	5,89	6,89	7,28
n	0,33	0,31	0,30	0,30
R²	1,00	1,00	0,99	1,00

A curva de liberação para POHal apresentou liberação ligeiramente mais lenta quando comparada aos demais sistemas. Após 48 h de análise, o filme contendo haloisita liberou $19,5\% \pm 1,2\%$ de óleo de orégano, enquanto as composições POCau e POsep liberaram $23,1\% \pm 2,7\%$ e $23,7\% \pm 1,5\%$, respectivamente. Sabendo que a liberação ocorre unicamente pela difusão do óleo do interior para o exterior do filme, a dispersão e interação do óleo com as nanopartículas inorgânicas pode influenciar diretamente na liberação do óleo para o meio. Nesses sistemas, a aglomeração da haloisita pode ter levado a uma má dispersão do óleo na matriz PHBV, e parte do óleo pode ter sido aprisionado dentro dos nanotubos de haloisita, ao contrário das demais nanopartículas com outras morfologias. Essa característica pode ter limitado a difusão e consequentemente a liberação do óleo de orégano. Esse efeito também pode ser corroborado quando analisada a permeabilidade ao oxigênio: a má dispersão de óleo e argila nos filmes de POHal causou os maiores valores de permeabilidade entre as amostras contendo óleo de orégano.

Inicialmente, seria razoável afirmar que a liberação deve ocorrer mais lentamente, como é comumente aplicado em estudos de entrega de fármacos. No entanto, como será discutido mais adiante, a análise antimicrobiana desses filmes indica que a formulação que apresenta a liberação inicial mais rápida no meio de simulação é a preferível. Para que a atividade antimicrobiana seja alcançada durante todo o tempo de prateleira do alimento, a embalagem deve entregar o ativo antimicrobiano ao meio de acondicionamento do alimento desde o primeiro contato com o produto alimentício, para evitar os estágios iniciais de multiplicação microbiana. Portanto, para aplicações alimentícias, a embalagem ativa deve garantir que não haja crescimento de bactérias patogênicas no início do

armazenamento dos alimentos (CAMPOS-REQUENA et al., 2015a, 2015b).

5.1.8 Atividade antimicrobiana segundo JIS Z 2801:2000

A atividade antimicrobiana de composições de PHBV contendo óleo de orégano contra *S. aureus* e *E. coli* foi estudada seguindo a norma JIS Z 2801:2000. Esta metodologia é adequada para sistemas onde os ativos antimicrobianos não se limitam à superfície da matriz, mas também são liberados para o meio por difusão (RADHESHKUMAR; MÜNSTEDT, 2006). De acordo com este método, a eficácia antibacteriana observada em superfícies plásticas deve permitir uma redução de 2 ciclos log ou superior a esta nos materiais analisados (VILLANUEVA et al., 2016). Os resultados são apresentados na Tabela 7, com os valores de redução (R) apresentados em log e em percentual.

Tabela 7: Contagem microbiológica em filmes de PHBV com óleo de orégano calculada por ensaio de contato direto contra *E. coli* e *S. aureus*

Amostras	<i>E. coli</i> *			<i>S. aureus</i> **		
	Contagem após 24h (UFC/mL)	Redução (R) em log	R (%)	Contagem após 24h (UFC/mL)	Redução (R) em log	R (%)
Controle	1,3x10 ⁶	-	-	1,1x10 ³	-	-
PO	1,8x10 ⁴	1,9±0,9	98,6	3,1x10 ²	0,6±0,1	71,8
POHal	4,3x10 ³	2,5±0,1	99,7	8,5x10 ¹	1,1±0,1	92,3
POCau	9,0x10 ^{-1***}	6,2±0,0	99,9	3,0x10 ¹	1,6±1,2	97,3
POSep	5,3x10 ⁴	1,4±1,8	95,9	9,0x10 ⁻¹	3,1±0,0	99,9

Controle: Filme controle, sem aditivo antimicrobiano.

* Contagem de *E. coli* no tempo zero foi de 3,7x10³ UFC/mL

** Contagem de *S. aureus* no tempo zero foi de 5,1x10³ UFC/mL

*** Amostra não apresentou crescimento microbiano sendo considerado o valor de 0,9 UFC/mL uma vez que o limite de quantificação do ensaio é de 1,0 UFC/mL.

Nos filmes controle, a contagem microbiana passou de 3,7x10³ UFC/mL no tempo zero para 1,3x10⁶ UFC/mL após 24 h de contato da suspensão bacteriana com o filme inerte. Portanto, para o controle do teste (sem aditivo antimicrobiano), não houve redução na contagem microbiana. Entretanto, para as demais amostras, a multiplicação de *E. coli* foi claramente inibida nos filmes contendo óleo de orégano, chegando a 4,3x10³ UFC/mL para os filmes POHal, o que corresponde a uma

redução (R) de 2,5 em log (equivalente a uma redução de 99,7% de suspensão bacteriana em relação ao controle). Nas formulações PO e POsep, a contagem atingiu uma redução de 1,9 log e 1,4 log, respectivamente. Percentualmente, a multiplicação da *E. coli* foi inibida em 98,6% e 95,9% em relação ao filme usado como controle. Este efeito pode estar relacionado com a cinética de liberação do agente antimicrobiano na superfície dos filmes, uma vez que a presença de argilas influencia na difusão do óleo para o meio. Nos filmes de POCau, não foi possível observar o crescimento de *E. coli* após 24 h de contato com o agente antimicrobiano, resultando em uma redução de 6,2 log quando comparado ao controle.

Quanto à atividade antimicrobiana contra a *S. aureus*, os resultados obtidos indicam que a contagem microbiológica permaneceu constante no filme controle comparando o tempo inicial de ensaio (tempo zero) e após 24 h de incubação (10^3 UFC/mL). As contagens microbiológicas nos filmes contendo óleo de orégano também se mostraram diferentes dos resultados obtidos nos testes anteriores usando *E. coli*. Após 24 h de incubação e contato direto com os filmes, foi possível observar uma redução de apenas 0,6 log (71,8% de redução) para os filmes PO. A eficácia dos sistemas contendo óleo de orégano foi maior quando combinado as argilas. Para a formulação de POCau a redução chegou a 97,3% (1,6 em log) e nos filmes de POHal a inibição foi de 92,3% (1,1 em log). Embora essas duas formulações não tenham atingido o valor de redução acima de 2 ciclo log, conforme proposto pela norma, o efeito antimicrobiano é evidente e poderia ser melhorado com alguns ajustes na concentração de óleo essencial ou no controle da cinética de liberação, por exemplo.

O efeito antimicrobiano foi mais evidente no sistema contendo sepiolita (POsep) onde não foi possível observar a multiplicação de *S. aureus* após 24 h de incubação. A contagem após 24 h nesses materiais, em comparação a contagem no tempo zero, indica uma inibição de 3,1 em log ou 99,9% de inibição de *S. aureus* sobre a superfície dos filmes que contém óleo essencial de orégano e sepiolita. Em geral, os óleos essenciais são mais eficazes contra bolores e leveduras do que contra bactérias e entre essas, parecem ser mais eficientes contra Gram positivas do que em comparação a culturas de Gram negativas (OTERO et al., 2014).

Estudos utilizando a mesma metodologia foram propostos por Otero et al. (2014) em filmes de PP e PET contendo 4%, 6% e 8% de óleo de orégano. Os autores demonstraram que os filmes de PP só foram eficazes quando a

concentração de óleo de orégano foi de 8% m/m, com redução de 1,08 log na carga microbiana. Para filmes de PET, todas as concentrações de óleo essencial foram eficazes para as diferentes cepas testadas (OTERO et al., 2014). Em outro trabalho de Altan e Yildirim (2014), foram produzidos filmes de HDPE e PP com nanopartículas de TiO₂ e ZnO como agentes antimicrobianos. Na maioria das formulações, a redução na carga microbiana de *E. coli* atingiu uma redução logarítmica de 2 ciclos (ALTAN; YILDIRIM, 2014). A comparação com outros filmes poliméricos confirma que filmes de PHBV contendo 8% m/m de óleo essencial de orégano foram eficazes na redução do crescimento da carga bacteriana.

Finalmente, após todos os ensaios de caracterização descritos nesse tópico, a nanopartícula de sepiolita foi selecionada como melhor carga para a aplicação desejada, devido à combinação funcional com óleo essencial de orégano e a matriz polimérica de PHBV, gerando ótimos resultados quanto às propriedades termo-mecânicas, permeabilidade ao oxigênio e os ensaios antimicrobianos. Os demais filmes (POCau e POHal) também apresentaram resultados satisfatórios, comprovando a eficácia desses sistemas como embalagens ativas. Entretanto, devido à aglomeração dessas duas cargas – caulinita e haloisita, algumas propriedades ainda necessitam ser ajustadas para que a dispersão limitada não interfira nos resultados desejados. O presente trabalho segue para o tópico seguinte, onde sistemas contendo PHBV/Sepiolita serão aplicados a diferentes óleos essenciais.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES CONTENDO SEPIOLITA E ALTERANDO O ATIVO ANTIMICROBIANO

Com a seleção da nanopartícula inorgânica para as embalagens ativas de PHBV propostas nesse trabalho, os próximos resultados visam estudar a influência de diferentes agentes antimicrobianos nos filmes produzidos contendo sepiolita. Os resultados estão apresentados nessa seção.

5.2.1 CG/MS

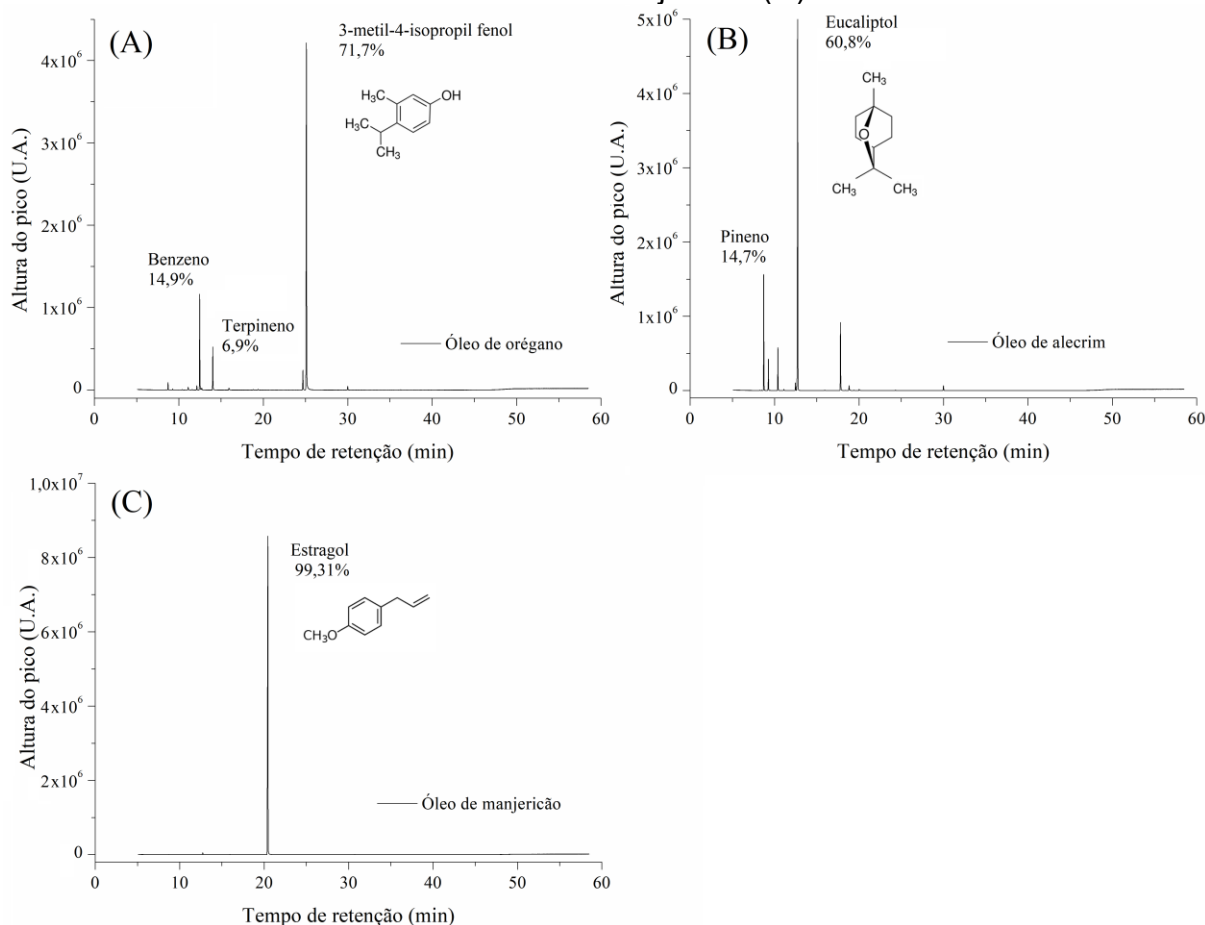
Os três óleos essenciais comerciais foram analisados segundo CG/MS. Os cromatogramas são apresentados na Figura 32.

A Figura 32 (A) apresenta o cromatograma do óleo de orégano indicando que o componente majoritário deste, com 71,7%, refere-se ao 3-metil-4-isopropil fenol. Em menor quantidade, é possível perceber a presença de benzeno (14,9%) e terpinenos (6,9%). Diversos relatos indicam a presença majoritária do carvacrol ou timol na composição do óleo de orégano (FERNÁNDEZ-PAN et al., 2015; SHEMESH et al., 2015; TAWAKKAL; CRAN; BIGGER, 2016). Entretanto, esta composição depende da localidade de cultivo da planta, da forma de extração e da região de extração do óleo (por exemplo, se o óleo foi extraído de folhas, frutos ou caule). Neste estudo, a técnica de CG/MS permitiu avaliar a composição real do óleo de orégano adquirido, sendo possível afirmar que o componente majoritário refere-se ao 3-metil-4-isopropil fenol. Embora muito similar aos demais componentes citados (carvacrol e timol), os grupos pendentes encontram-se em diferentes posições no anel aromático. O 3-metil-4-isopropil fenol apresenta características antimicrobianas comprovadas, sendo comercializado com o nome de Biosol, ativo com propriedades antisépticas usado principalmente em produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (YU; BOUWER; COELHAN, 2006).

Enquanto a atividade antimicrobiana do óleo de orégano é garantida através do composto fenólico, no óleo de alecrim o composto orgânico é um éter cíclico. O cromatograma apresentado na Figura 32 (B) destaca que 60,8% da composição do óleo de alecrim é de eucaliptol (ou 1,8-cineole), seguido por 14,7% de pineno. A atividade antimicrobiana deste ativo majoritário está frequentemente associada a tratamentos respiratórios como bronquite e sinusite, por sua eficaz ação descongestionante (SANTOS; RAO, 2000). Além disso, ambos os componentes apresentam regulamentação segundo a FDA para serem aplicados como aditivos em

alimentos, tanto com aplicação direta como aplicação indireta em substâncias de contato com alimentos (Documento número 21 CFR, 172.515).

Figura 32: Cromatograma do óleo de orégano (A), óleo de alecrim (B) e óleo essencial de manjeriço (C)



Fonte: Próprio autor

Por fim, o cromatograma do óleo de manjeriço apresentado na Figura 32 (C), indica 99,3% do ativo estragol. Assim como os demais óleos citados, o óleo de manjeriço é frequentemente associado a estudos visando produtos com atividade antimicrobiana ou atividade antioxidante, podendo ser aplicado em embalagens ou produtos odontológicos (HEMALATHA et al., 2017).

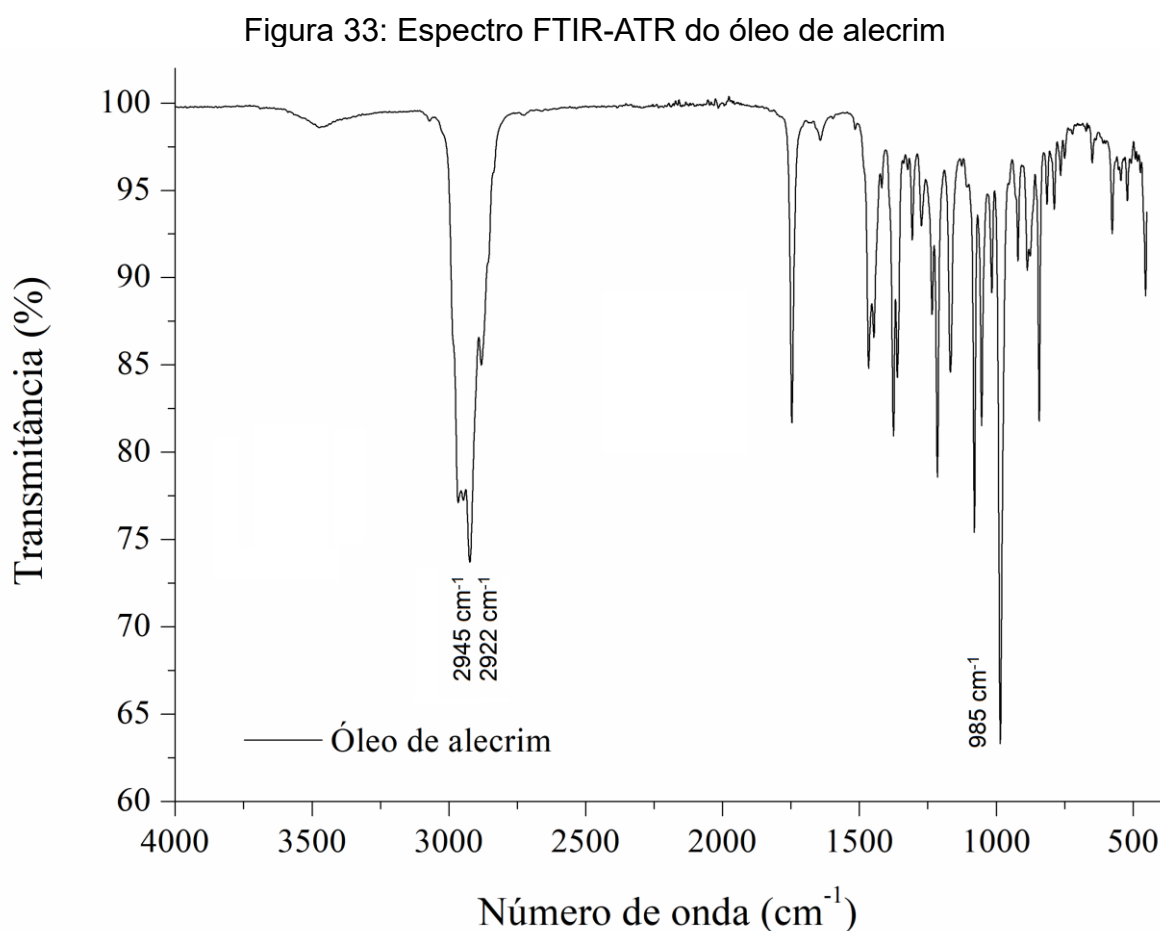
5.2.2 FTIR

Complementar a análise de CG-MS, a espectroscopia permite confirmar as estruturas químicas principais na composição de cada óleo, através da visualização de grupos funcionais e ligações químicas presentes em cada espectro. Os óleos foram selecionados de modo que cada um apresentasse uma composição, visando

obter a melhor interação óleo/argila/polímero e conseqüentemente, a otimização das propriedades antimicrobianas das embalagens ativas propostas.

Conforme já caracterizado, o espectro referente ao óleo de orégano foi discutido na seção 5.1.2 na Figura 17. De imediato é possível perceber a diferença entre os espectros, indicando as distintas estruturas químicas e confirmando o resultado observado no CG/MS.

No espectro do óleo de alecrim (Figura 33), a banda intensa em 985 cm^{-1} é característica da estrutura do eucaliptol, referente a ligação C-O de éter (HAMICHE et al., 2018). Além disso, as bandas em 2922 e 2945 cm^{-1} são características das vibrações simétricas e assimétricas, respectivamente, da ligação C-H de CH_2 (NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2005).

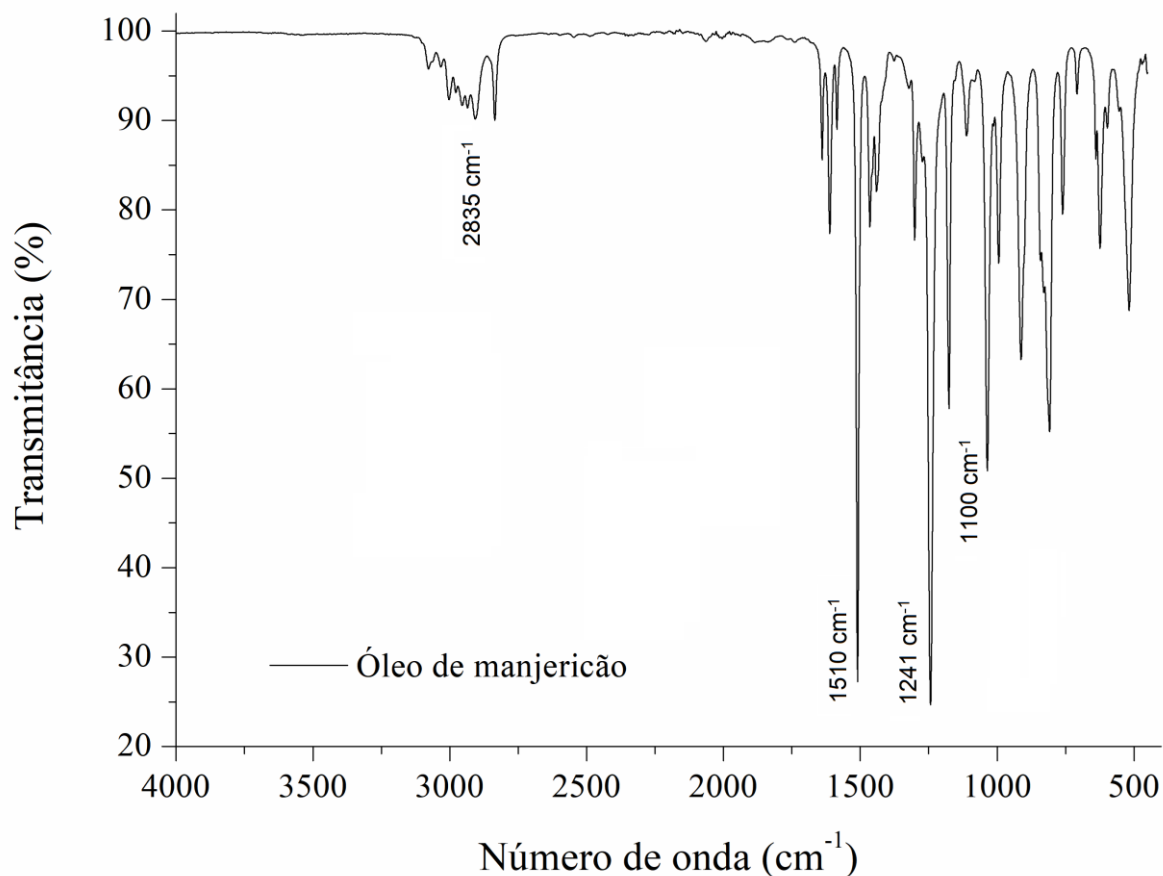


Fonte: Próprio autor

Por fim, o espectro do óleo de manjerição (Figura 34) distingue-se dos demais, uma vez que apresenta a estrutura majoritária de um fenilpropeno. O espectro indica duas bandas intensas em 1510 e 1241 cm^{-1} atribuídos à vibração

C=C de aromáticos, em 2835 cm^{-1} ao estiramento de C-H e em 1100 cm^{-1} característico da ligação C-O-C de éter (YANG et al., 2017).

Figura 34: Espectro FTIR-ATR do óleo de manjerição



Fonte: Próprio autor

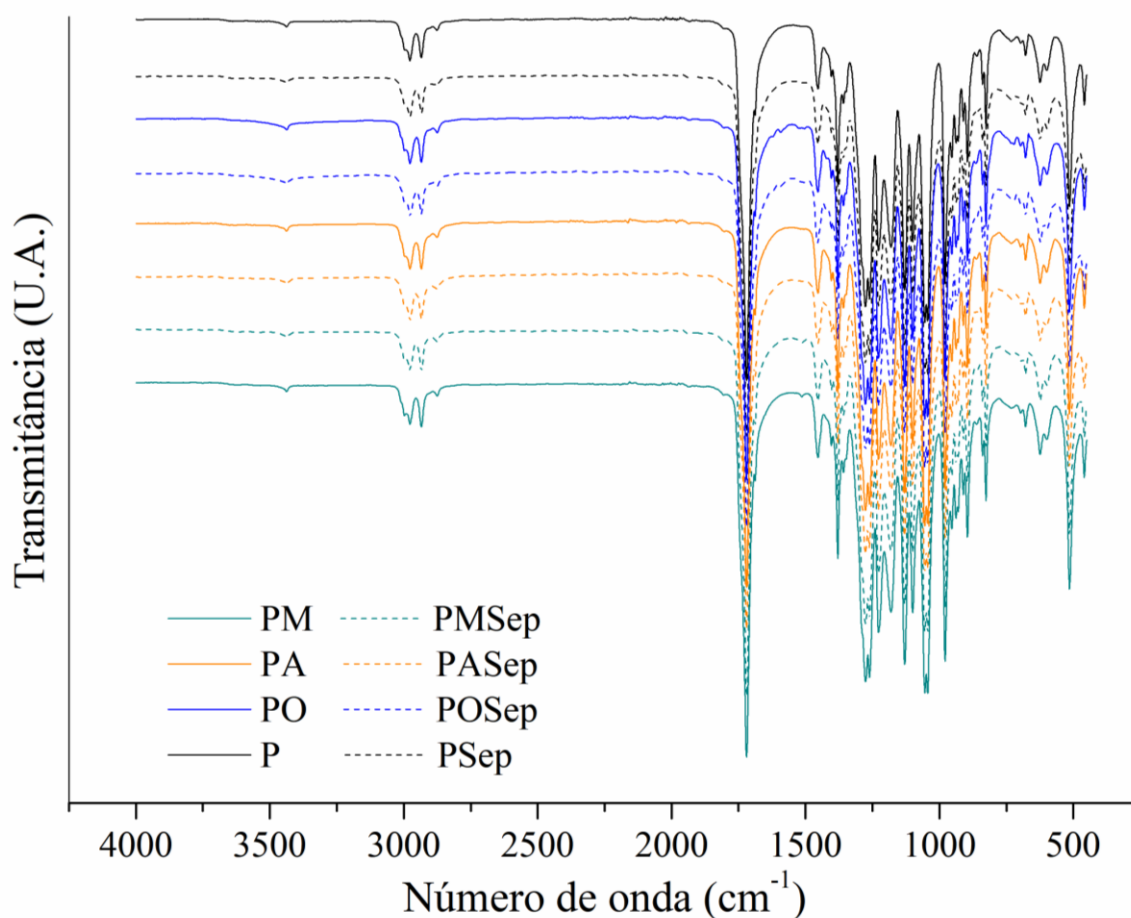
Os espectros de FTIR-ATR das composições PHBV/óleo e PHBV/óleo/argila são mostrados na Figura 35 por linhas contínuas e tracejadas, respectivamente. Novamente, a comparação entre os espectros apenas identifica as bandas dominantes associadas ao PHBV, não sendo possível visualizar claramente a diferença entre os diferentes óleos essenciais incorporados. A comparação entre os espectros foi acompanhada pelo ajuste usando a técnica dos mínimos quadrados, apresentado na Tabela 8.

O valor de RMSE para o PHBV puro é de 0,000 uma vez que a comparação é feita com o próprio espectro. Com a adição da sepiolita, o desvio entre os espectros de P e P Sep atinge um RMSE de 0,854. O aumento significativo do RMSE desses filmes confirma não somente que a nanopartícula foi incorporada aos filmes como

também que a carga está mais dispersa que os aditivos antimicrobianos. Esse efeito estaria indicado ao observar que o RMSE dos filmes com óleo (PO, PA e PM) é menor. Para os filmes com orégano e manjerição, o valor de RMSE é de 0,660 e 0,634 respectivamente. Para o óleo de alecrim o desvio entre os espectros é ligeiramente menor.

A combinação entre os dois aditivos (óleo e argila) segue como parâmetro que provoca maior desvio de linearidade entre os espectros, aumentando os valores de RMSE para próximo a 1. Essa alteração confirma, através da caracterização por FTIR, que houve alteração na estrutura química dos filmes com a adição dos aditivos. Além disso, destaca-se o valor de 1,195 para os filmes de POsep, podendo indicar o favorecimento na incorporação do óleo de orégano nos materiais produzidos.

Figura 35: Espectro FTIR-ATR do PHBV e das diferentes formulações de filmes ativos



Fonte: Próprio autor

Tabela 8: Relação entre os espectros FTIR-ATR de PHBV e dos filmes contendo diferentes óleos essenciais

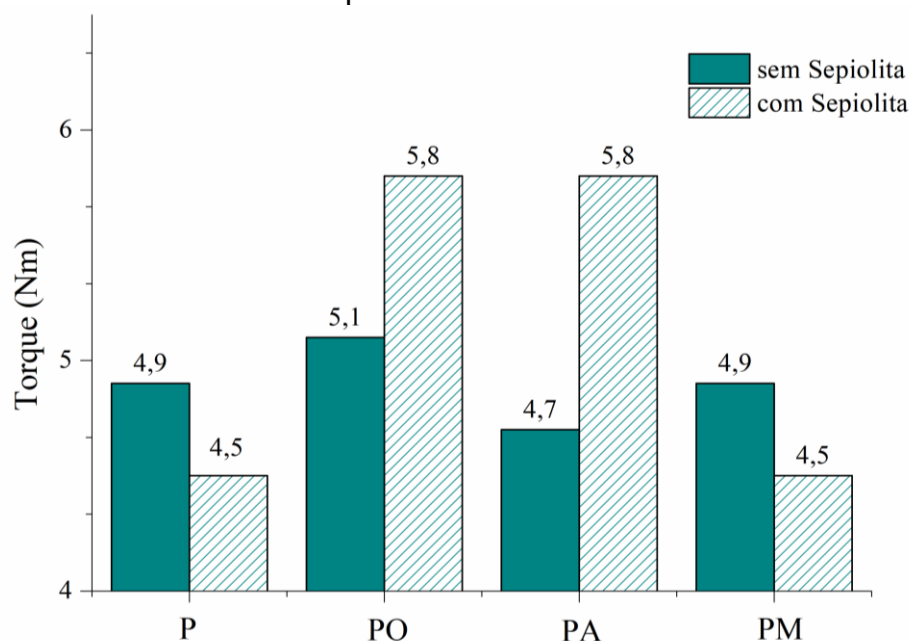
Sistemas contendo óleos	RMSE	Sistemas contendo óleo e argila	RMSE
P	0,000	PSep	0,854
PO	0,660	POSep	1,195
PA	0,476	PASep	1,102
PM	0,634	PMSep	0,970

5.2.3 Torque durante o processamento

Como mencionado na seção 5.1.1, as condições de processamento das misturas influenciam diretamente na homogeneização dos materiais e, conseqüentemente, na dispersão das cargas escolhidas para agregar valor à matriz de PHBV. A Figura 36 apresenta o resultado de torque final após os 6 min de processamento dos materiais na câmara de mistura. O valor de torque para a composição contendo somente PHBV foi de 4,9 Nm. Com a incorporação da sepiolita, o valor de torque foi reduzido para 4,5 Nm. Comportamento semelhante foi observado no resultado de torque da seção 5.1.1.

Embora o valor numérico encontrado nas diferentes formulações não altere significativamente a estabilidade térmica das amostras, é possível identificar uma característica positiva de aumento do torque (5,8 Nm) nos materiais onde a sepioita foi combinada aos óleos essenciais de orégano e alecrim. Esses resultados indicam que estes óleos podem atuar como plastificantes e, eventualmente, podem vir a diminuir os efeitos de degradação das misturas durante o processamento quando associados em conjunto com nanopartículas de argila.

Figura 36: Torque final após 6 min de processamento para as misturas de PHBV/Sepiolita contendo diferentes óleos essenciais



Fonte: Próprio autor

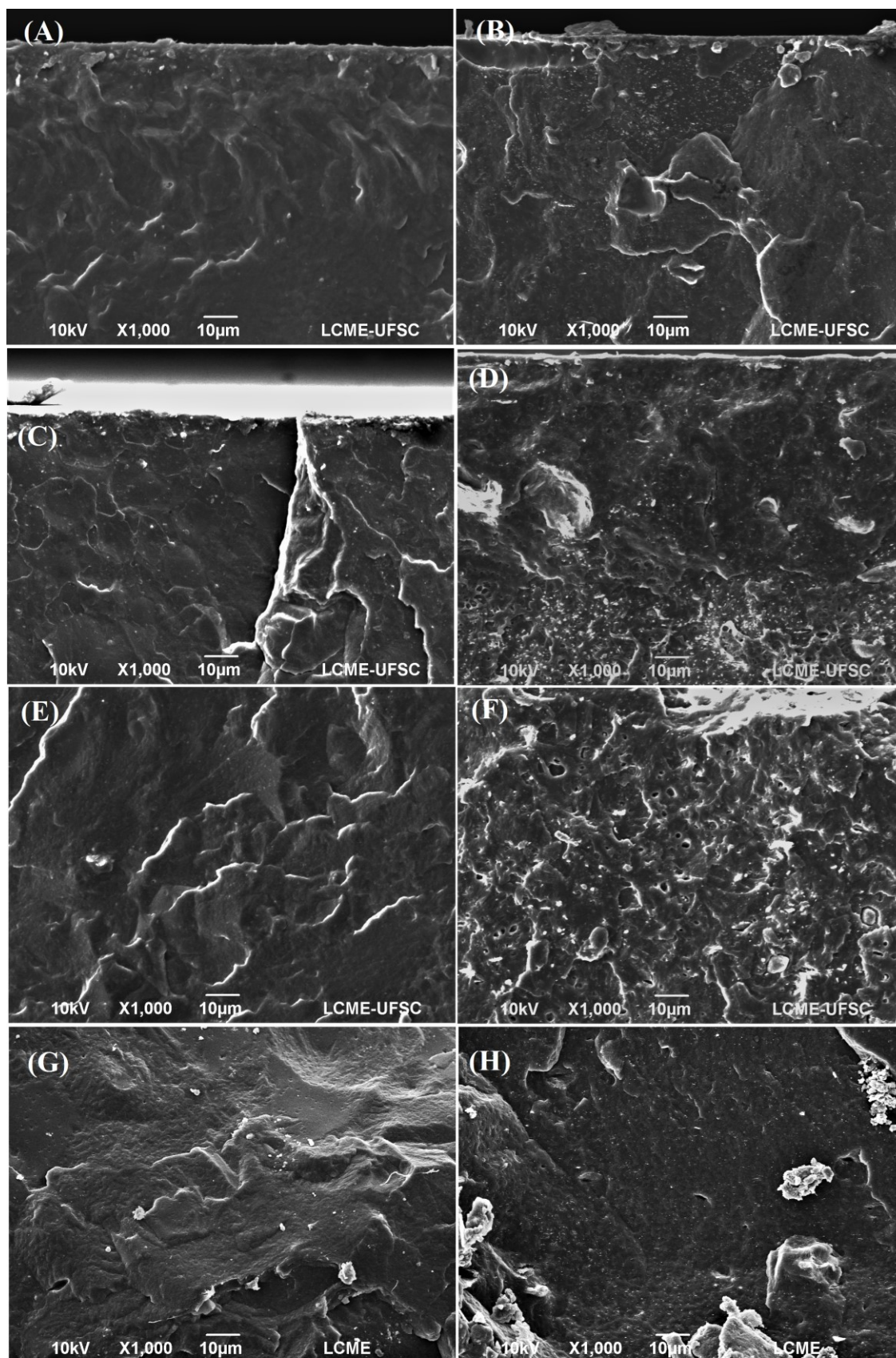
5.2.4 MEV

Nas micrografias apresentadas para os filmes da etapa 1, foi utilizada aproximação de 2500x, uma vez que o interesse era visualizar a morfologia das nanopartículas e a dispersão das mesmas. Nesta etapa, a aproximação foi ajustada para 1000x a fim de verificar a dispersão dos componentes na matriz de PHBV e a característica geral de cada filme com os diferentes óleos essenciais. As imagens obtidas no MEV para esta etapa são apresentadas na Figura 37.

A Figura 37 (A) apresenta a imagem da seção transversal para o filme de PHBV. As imagens registradas para os filmes contendo óleo, sem a presença da nanopartícula, estão indicadas na Figura 37 (C), (E) e (G). Entre essas imagens não é possível destacar uma alteração entre a morfologia dos filmes, tendo todas uma ligeira rugosidade, também apresentada pela matriz de PHBV sem aditivos.

Com a adição da sepiolita, Figura 37 (B), é observado um aumento de regiões heterogêneas finamente dispersas, possivelmente referente à nanopartícula dispersa na matriz. Essa característica também é observada nos filmes POsep e PMsep - Figura 37 (D) e (H) respectivamente, indicando que a dispersão da nanopartícula foi melhor atingida nesses materiais.

Figura 37: Morfologia dos filmes: P(A); P Sep (B); PO (C); PO Sep (D); PA (E); PA Sep (F); PM (G) e PM Sep (H).



Fonte: Próprio autor

Nos filmes PASEp (Figura 37 (F)) a seção transversal apresenta um aspecto mais poroso e heterogêneo. Essa morfologia porosa observada para os filmes de PASEp pode ser um indicativo de baixa compatibilidade entre os aditivos adicionados e a matriz polimérica (YONG; LIU, 2021), em que o óleo de alecrim pode ter sido volatilizado/perdido durante a análise, formando vazios.

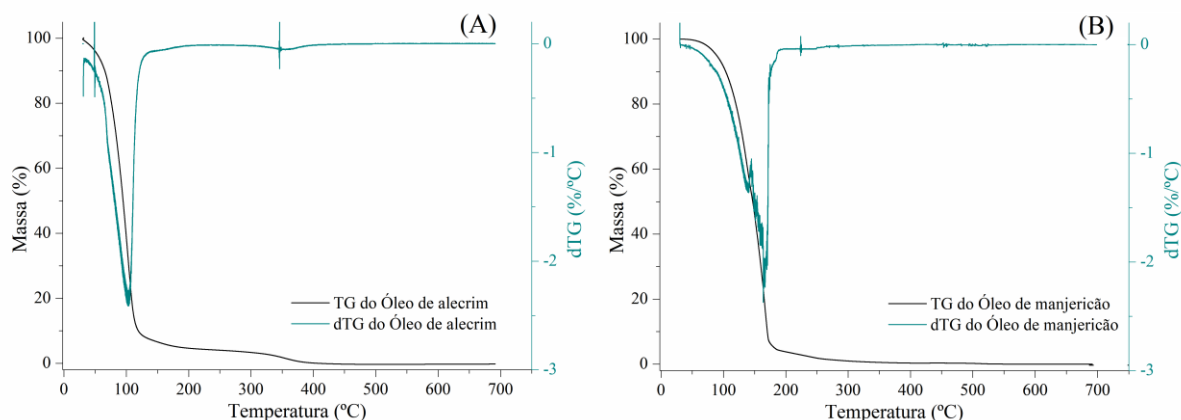
5.2.5 Propriedades térmicas: TGA, DSC

Os resultados de perda de massa do óleo essencial de alecrim e óleo essencial de manjeriço são apresentados na Figura 38. Assim como o óleo de orégano, que teve seu termograma apresentado na seção anterior (Figura 24), os óleos aqui ilustrados também apresentam perda de massa até a temperatura de 270 °C. Por serem compostos voláteis e aromáticos, todos os aditivos antimicrobianos incorporados apresentaram características de volatilização com o aumento da temperatura. Essa propriedade limita parcialmente a utilização dos óleos em produtos poliméricos que necessitam de processamento a altas temperaturas ou altas taxas de cisalhamento pois haveria perda do aditivo já na fabricação dos materiais. Além disso, como será discutido mais a frente, os óleos também apresentam limitação quanto ao armazenamento dos filmes produzidos com o aditivo antimicrobiano.

Na Figura 38 (A) o óleo de alecrim apresenta elevada perda de massa em torno de 100 °C e uma pequena perda massa em torno de 350 °C. Essa característica pode estar relacionada à multicomposição do óleo de alecrim adquirido. A análise de CG/MS discutida anteriormente estima que 60,82% da composição do óleo de alecrim seja de eucaliptol e os demais percentuais são relacionados a outros componentes presentes nesse óleo, que podem apresentar ponto de ebulição um pouco maior em relação ao eucaliptol, que apresenta ponto de ebulição em torno de 176 °C (KYASA, 2020).

O termograma do óleo de manjeriço, Figura 38 (B), apresenta uma única perda de massa (volatilização) na faixa de temperatura entre 60 °C e 210 °C. Esse comportamento também pode ser relacionado à composição do óleo obtida por CG/MS, uma vez que o cromatograma indica que o óleo apresenta composição majoritária de apenas um componente – 99,31% de estragol. O comportamento do óleo de manjeriço na análise de TGA obtida segue de acordo com a literatura, com o ponto de ebulição do estragol em torno de 216 °C (TRIAUX et al., 2020).

Figura 38: Curva de perda massa para óleo essencial de alecrim (A) e óleo essencial de manjeriço (B)

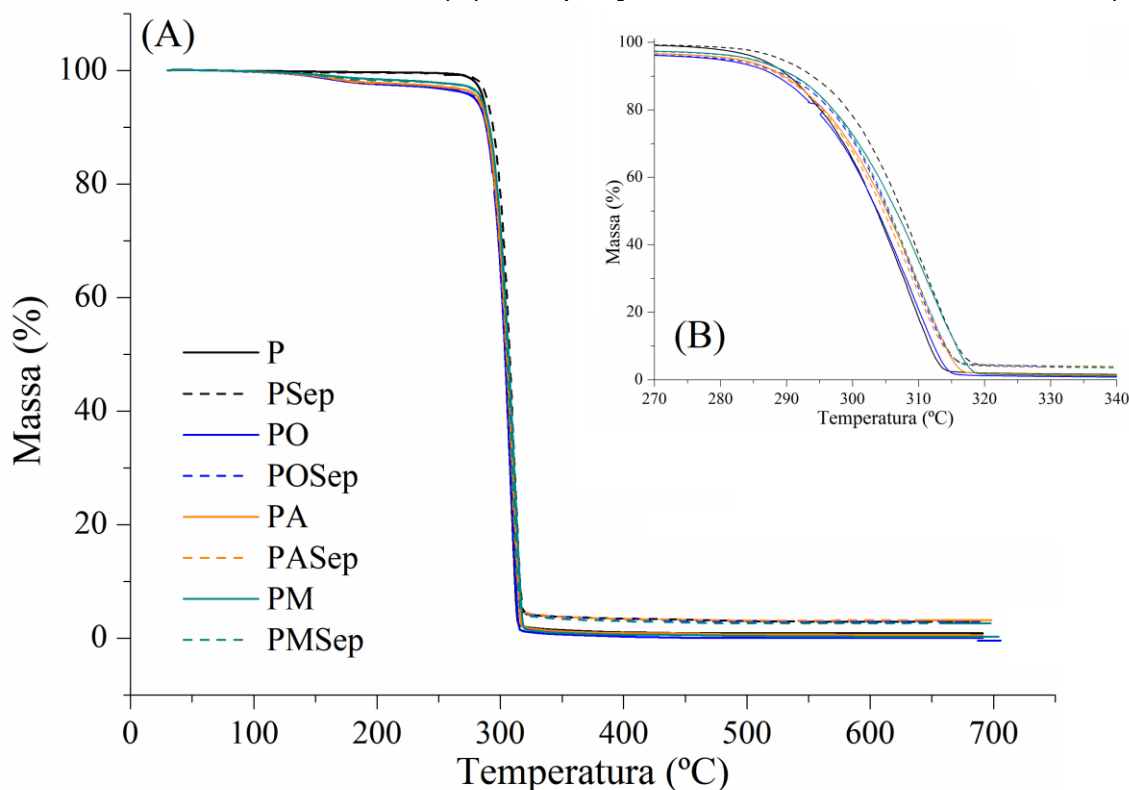


Fonte: Próprio autor

A Figura 39 apresenta os resultados de TGA para os filmes ao longo de toda a faixa de temperatura, com ampliação na Figura 39 (B) na faixa de temperatura entre 270 °C e 340 °C. Os termogramas apresentam a mesma tendência de perda de massa máxima em torno de 300 °C devido à degradação da matriz de PHBV – já discutido anteriormente na seção 5.1.4. O destaque dessa caracterização é apresentado na Figura 39 (B), onde é possível visualizar o aumento da estabilidade térmica dos filmes com a presença da nanopartícula. Todas as curvas tracejadas (que contém sepiolita) são deslocadas para a direita em relação à curva do polímero sem aditivo (P – curva em preto). O aumento da estabilidade térmica com a incorporação da sepiolita indica a boa dispersão da carga nos filmes, além de proporcionar o ajuste adequado da propriedade térmica dos materiais, uma vez que a degradação dos materiais poderá ser iniciada em temperaturas mais elevadas.

Outro destaque interessante refere-se às curvas para PM e PMSep (curvas em verde – contínua e tracejada). Ambos os materiais apresentam elevada estabilidade térmica em relação ao filme de PHBV puro. Essa característica pode indicar uma interação adequada entre a matriz e o óleo de manjeriço, além ser justificada pelo óleo de manjeriço (componente majoritário estragole) apresentar maior ponto de ebulição em relação aos demais óleos utilizados.

Figura 39: Termograma para os filmes preparados com diferentes óleos essenciais na faixa de 30 °C a 700 °C (A) e ampliação na faixa de 270 °C até 340 °C (B).

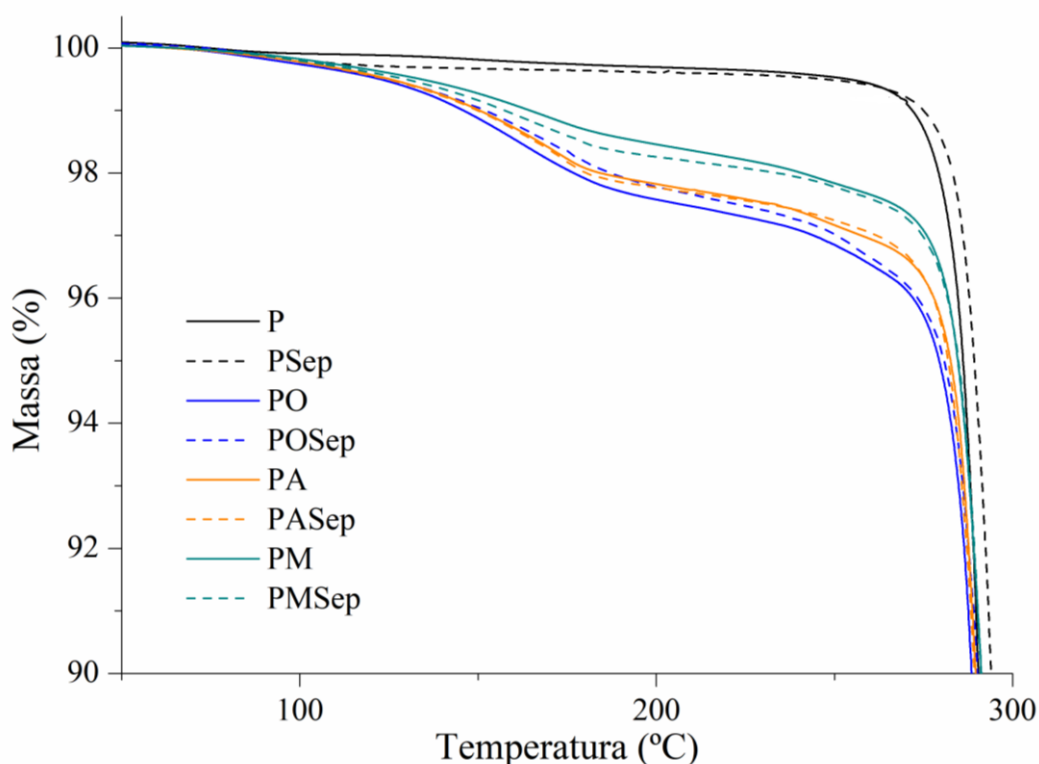


Fonte: Próprio autor

A Figura 40 destaca o intervalo da análise onde ocorre a volatilização dos óleos. É possível perceber a perda de massa em todas as curvas que contém os aditivos antimicrobianos, confirmando a volatilização dos óleos aromáticos até a temperatura de 270 °C. Novamente, após a temperatura de 300 °C o comportamento de degradação segue o esperado para filmes onde o constituinte principal é o PHBV.

A partir dos dados da TGA, a incorporação dos óleos foi determinada a partir da massa residual em 255 °C. Da mesma forma, o teor de argila presente nas formulações foi calculado pelo resíduo a 690 °C. Observa-se na Tabela 9 que o percentual de argila incorporada não varia muito entre as diferentes formulações, indicando um percentual em torno de 2,0% e 2,7% de sepiolita nos filmes PMSep e PAsep, respectivamente. Essa variação na massa de nanopartícula incorporada entre as diferentes formulações também não parece influenciar diretamente na estabilidade térmica dos filmes, já que todas as temperaturas de máxima degradação ($T_{d_{max}}$) apresentam valores em $309\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Figura 40: Perda de massa obtida associada aos diferentes filmes até 300 °C.



Fonte: Próprio autor

Outra análise importante refere-se à incorporação dos óleos essenciais. Uma vez que o percentual teórico de óleo adicionado aos filmes foi o mesmo (8% m/m), a observação dos diferentes percentuais de perda de massa na Figura 40 traz a informação acerca do real percentual de incorporação do óleo em cada filme.

Diferentemente dos resultados encontrados anteriormente para o OEO, o teor de óleo encontrado para as novas composições (Tabela 9) encontra-se bem abaixo do esperado para os diferentes materiais. O teor de óleo incorporado chega a ser de 2,2% nos filmes de PM e 2,3% nos filmes de PMSep, com rendimento de 28% e 29%, respectivamente, na incorporação dos óleos. Esse resultado não está relacionado ao rendimento durante a preparação dos filmes, uma vez que já seria esperada uma perda mínima de óleo essencial devido às etapas de processamento. Aqui nesse ponto, é importante ressaltar alguns aspectos sobre o desenvolvimento de filmes antimicrobianos contendo óleos essenciais e a limitação desse tipo de material devido à característica de volatilização do próprio aditivo antimicrobiano, que tende a migrar do filme com o tempo, principalmente quando os materiais são na forma de filmes (cerca de 0,23 mm de espessura). Ampliando a discussão nesse ponto, os materiais propostos nessa segunda etapa do trabalho foram preparados e

os filmes contendo os diferentes óleos essenciais produzidos logo em seqüência. Entretanto, devido às circunstâncias envolvidas durante os anos de 2020 e 2021, os materiais tiveram que ficar estocados e a análise de TGA foi realizada após cerca de dois anos do período de produção dos filmes. Com isso, a elevada perda de óleo nos filmes caracteriza-se, além da perda durante o processamento, pela volatilização do óleo ao longo do tempo de armazenamento dos filmes.

Confirmando a discussão sobre o tempo de estocagem, uma análise pode ser feita quando comparados os resultados de TGA nos filmes de PO e POsep preparados na etapa 1 e imediatamente caracterizados (Tabela 3) e os filmes preparados na etapa 2 com caracterização após dois anos (Tabela 9). O percentual de óleo de orégano nos filmes após a etapa de processamento foi de 4,6% na formulação de PO e 4,4% para o POsep. O percentual encontrado nos filmes após o período de armazenamento passou para 3,3% e 3,2%, respectivamente.

Tabela 9: Resultados de TGA quanto à temperatura de degradação para as diferentes formulações de filmes e estimativa de teor de aditivo incorporado.

Filmes	Td _{óleo} (°C)	T _{5%} (°C)	Td _{max} (°C)	Óleo incorporado (%)	Eficiência de incorporação do óleo (%)	Argila incorporada (%)
P	-	284	308	-	-	-
PSep	-	289	309	-	-	2,4
PO	159	279	296	3,3*	41	-
POSep	166	281	308	3,2**	40	2,4
PA	161	283	308	3,0	37	-
PASep	160	282	310	2,8	36	2,7
PM	168	285	311	2,2	28	-
PMSep	178	285	309	2,3	29	2,0

* Perda de 1,3% de óleo de orégano em relação do teor de 4,6% obtido na Etapa 1, segundo análise de TGA.

** Perda de 1,2% de óleo de orégano em relação do teor de 4,4% obtido na Etapa 1, segundo análise de TGA.

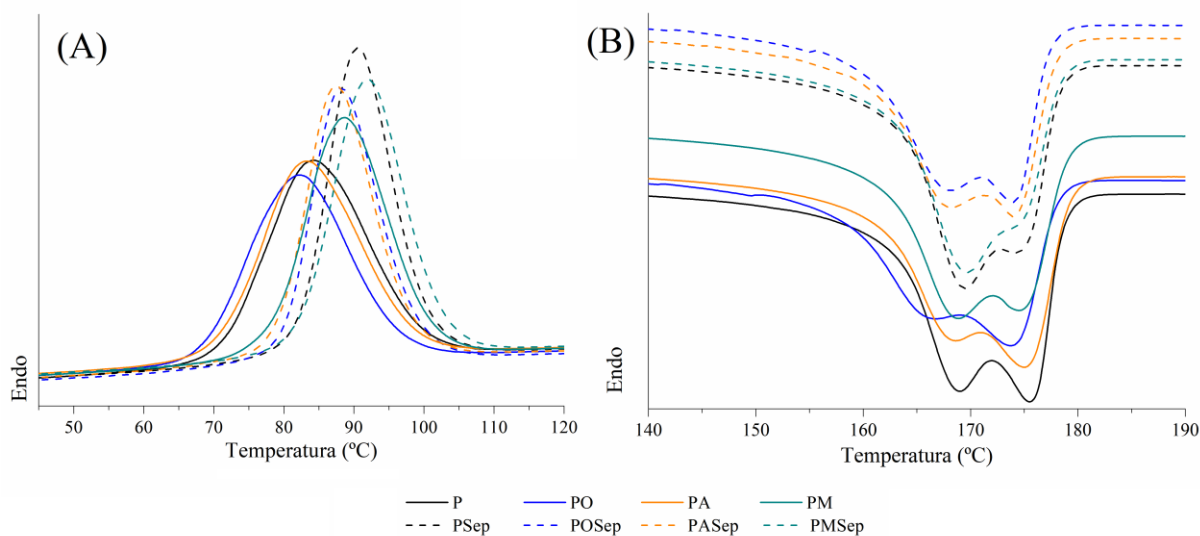
Dentre os percentuais de incorporação do óleo observados na Tabela 9, os filmes contendo óleo de orégano parecem ter mais óleo aprisionado nos filmes (41% e 40% de incorporação para a formulação PO e POsep, respectivamente) do que nos materiais que foram produzidos usando óleo de manjerição (PM com 28% de

rendimento de óleo incorporado e PMSep com 29% de óleo de manjerição). Esse efeito pode estar relacionado à dispersão de cada nanopartícula nos filmes e a compatibilidade da mesma com os diferentes óleos essenciais, influenciando na volatilização dos aditivos antimicrobianos. Na morfologia dos filmes de PMSep apresentada na Figura 37 (H) é observada uma aglomeração das nanopartículas ao longo da seção transversal dos filmes. Essa possível aglomeração, juntamente com a baixa compatibilidade da sepiolita com o estragol (componente majoritário do óleo de manjerição) favorece a volatilização do óleo ao longo do filme antimicrobiano. Em contrapartida, nos filmes de POSep, a boa dispersão da sepiolita pode ter favorecido o aprisionamento do óleo de orégano nos filmes produzidos, criando um caminho tortuoso para a volatilização do óleo. Além disso, dentre todos os ativos antimicrobianos apresentados, é favorecida a interação do ativo 3-metil-4-isopropil fenol, composto fenólico, com a matriz de PHBV e a nanopartícula de sepiolita, resultando em maiores rendimentos de incorporação de aditivos.

A Figura 41 (A) apresenta as curvas de cristalização obtidas no resfriamento para as diferentes composições. É possível observar que a T_c obtida para o filme de PHBV puro assemelha-se às obtida para o filme PA e PO. No entanto, para a formulação de PHBV contendo óleo de manjerição (PM), a T_c é ligeiramente aumentada, assim como em todos os materiais preparados com o uso de sepiolita – curvas tracejadas. Esse aumento na T_c confirma o efeito nucleante das nanopartículas na cristalização de PHBV, já mencionados anteriormente.

O comportamento durante o segundo aquecimento é apresentado na Figura 41 (B). Novamente, o perfil de picos duplos de fusão (T_{m1} e T_{m2}) é observado em todas as formulações. Além disso, o perfil observado na etapa 1 (Figura 25) também é confirmado nessa segunda análise, indicando que nos filmes de P e PO o pico de fusão T_{m2} é mais intenso que o pico da T_{m1} . O mesmo efeito também é observado para a formulação PA. Com a adição das nanopartículas, entretanto, os picos referentes à T_{m1} apresentaram maior intensidade, especialmente nas formulações POSep e PMSep. A característica desses picos apresenta o indício de que há diferentes estruturas esferulíticas nos filmes e que a presença da sepiolita pode vir a atuar como agente nucleante nos materiais preparados.

Figura 41: Curvas de cristalização (A) e de fusão cristalina durante o segundo aquecimento (B) para os filmes com diferentes óleos essenciais



Fonte: Próprio autor

Os valores para as temperaturas de fusão (T_m) assim como a temperatura de cristalização (T_c), a entalpia de fusão cristalina (ΔH_m) e o grau de cristalinidade (X_c) são apresentados na Tabela 10. Em princípio, a cristalização dos nanocompósitos é positiva do ponto de vista da barreira, uma vez que os cristalitos são tipicamente sistemas impermeáveis. Na Tabela 10 é possível identificar um aumento na cristalinidade de todos os sistemas preparados, em especial para as formulações contendo óleo de manjeriço. Esse efeito no aumento da cristalização também pode vir a impor rigidez e alterar o desempenho mecânico dos nanocompósitos. Além disso, na análise de microscopia foi possível identificar estruturas mais aglomeradas de argila nos filmes de PMSep. A aglomeração dessas nanopartículas é responsável pela formação de núcleos cristalinos, podendo a sepiolita atuar como agente nucleante nesses materiais e, conseqüentemente, aumentar a cristalinidade dos filmes.

Tabela 10: Transições térmicas obtidas por DSC para as diferentes formulações de filmes e grau de cristalinidade (X_c) correspondente.

Filmes	T _c (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	ΔH_m^* (J/g)	X _c (%)
P	84	169	176	93	63
PSep	91	170	174	90	63
PO	82	166	174	86	64
POSep	88	168	174	86	66
PA	83	169	175	90	67
PASep	87	168	174	88	68
PM	89	169	175	89	68
PMSep	92	170	174	90	69

ΔH_m^* (J/g): Somatório da área de T_{m1} e T_{m2}

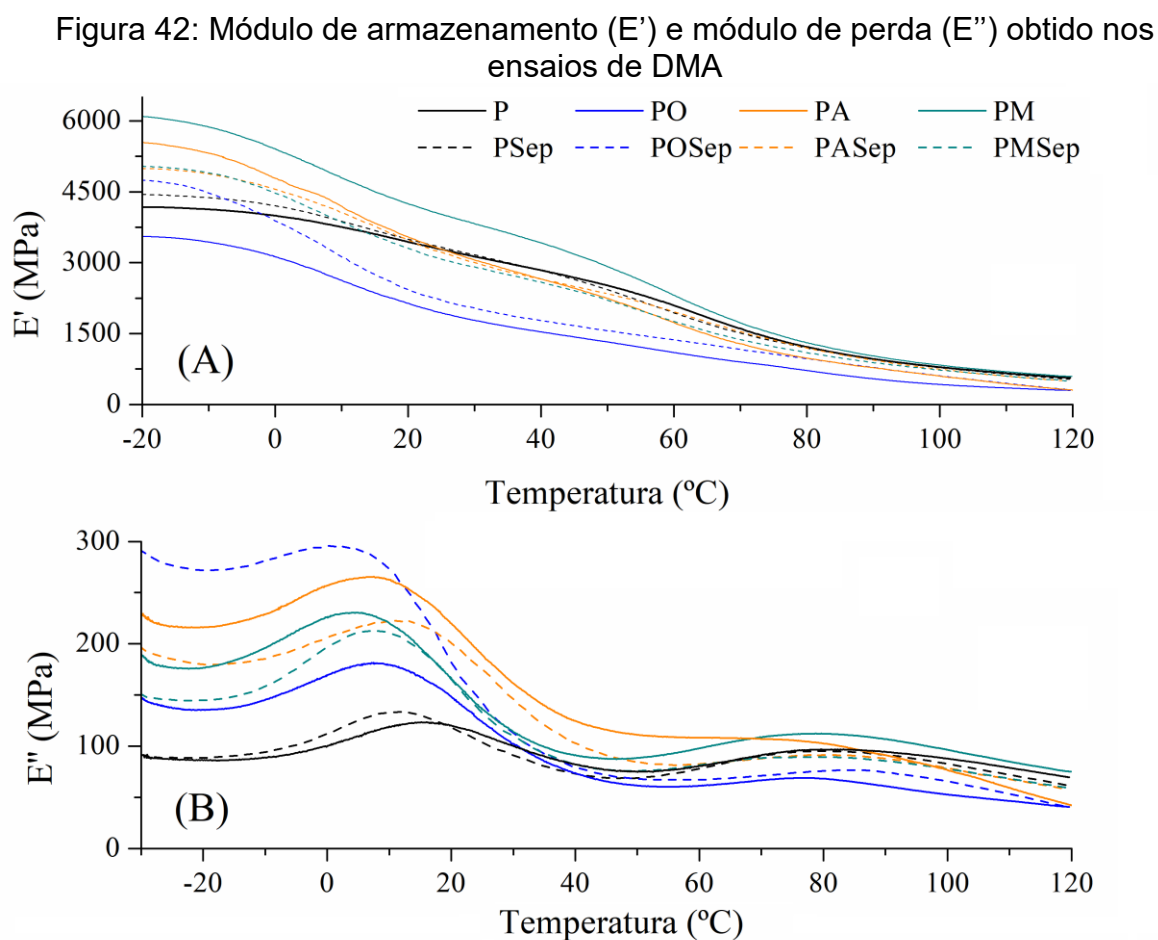
5.2.6 DMA

A Figura 42 apresenta os dados obtidos pelo DMA para os filmes em diferentes composições. Como os materiais investigados são destinados a aplicações de embalagem, a temperatura de interesse acontece em, aproximadamente, 25 °C. Os filmes contendo óleo de alecrim (PA e PASep) e os nanocompósitos PSep e PMSep não apresentam diferenças significativas no valor de módulo de armazenamento E' em relação ao polímero puro nesta temperatura. O aumento em E' nesses materiais foi maior abaixo da T_g do que acima dela. Esse efeito pode ser atribuído à sensibilidade dos aditivos à temperatura.

Os maiores valores de E' foram os obtidos para os filmes de PM, que aumentou de 4175 MPa do PHBV puro para 6111 MPa (em -25 °C) e de 3284 MPa para 4025 MPa a 25 °C. Essa característica pode estar relacionada à interação entre o óleo essencial de manjeriço e a cadeia do polímero, uma vez que a composição deste óleo é predominantemente observada pela presença de um grupamento polar (estragol). Esse efeito também será abordado mais a frente no ensaio de liberação, onde a discussão acerca do parâmetro de solubilidade indica que o PHBV e o óleo de manjeriço apresentam forte semelhança. Entretanto, quando avaliados os valores de E' para os filmes com manjeriço e sepiolita, o desempenho mecânico parece diminuir com a presença da nanopartícula. O valor de E' a -25 °C é reduzido para 5049 MPa e 3076 MPa a 25 °C. Essa característica novamente pode estar relacionada à baixa dispersão da argila nesses filmes, devido à baixa interação da sepiolita com o óleo de manjeriço, influenciando nas propriedades térmicas e mecânicas.

No estudo discutido no item 5.1.5, foi observado um aumento do módulo de

armazenamento com a adição de argila ao polímero, e esse aumento dependeu fortemente da qualidade da dispersão. Neste estudo, quando avaliados os filmes contendo óleo de orégano com e sem sepiolita, um comportamento oposto é observado nos materiais. Há uma redução significativa no módulo E' na temperatura de aplicação das embalagens. Esse resultado também é justificado devido à caracterização tardia dos materiais (após um período de dois anos de estocagem dos filmes), que influencia diretamente na qualidade e na flexibilidade dos filmes.



Fonte: Próprio autor

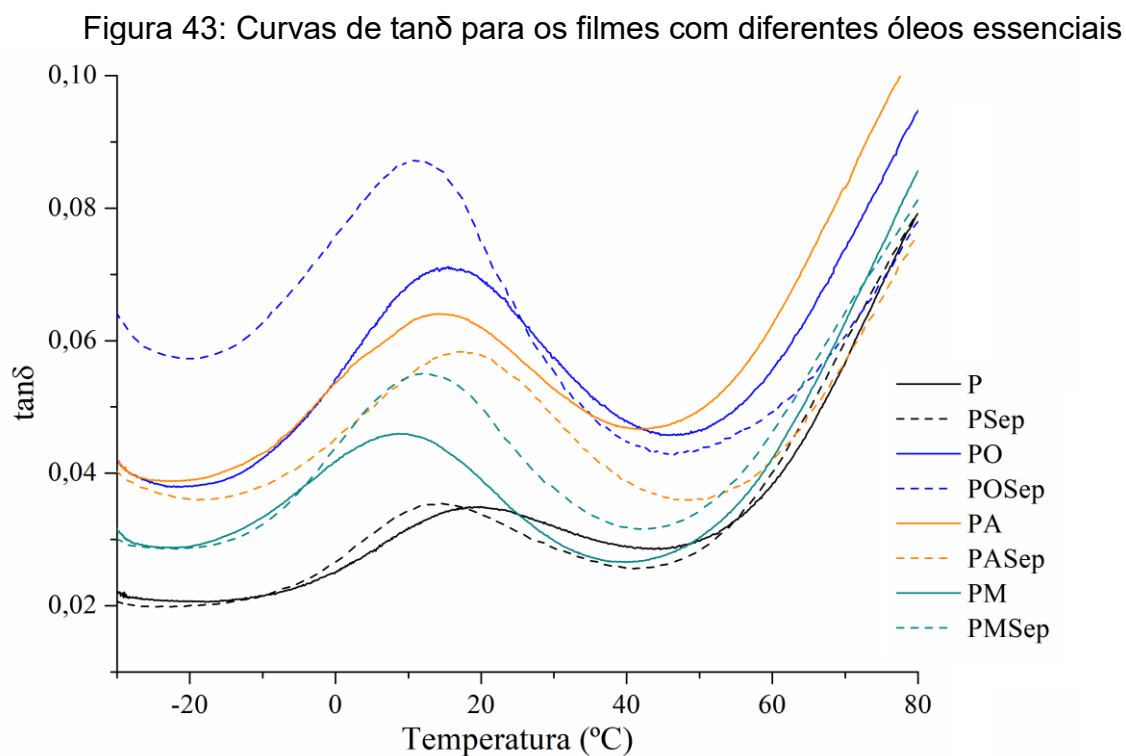
A Tabela 11 resume os valores encontrados para o módulo de armazenamento (E') e módulo de perda (E''), assim como para a temperatura de transição vítrea (T_g) para as diferentes composições de filmes produzidos na etapa 2. O valor de T_g encontrado para o PHBV puro foi de 18,8 °C. Esse valor não sofreu alteração quando observado o filme de P-Sep (18,3 °C). Para os demais filmes produzidos, os valores de transição vítrea foram reduzidos, chegando a 8,7 °C para o filme de PM, 10,8 °C para o filme de PO-Sep e 13,5 °C para o P-Sep. A redução na

Tg indica que a mobilidade da fase amorfa nesses materiais é alcançada em temperaturas mais baixas, tornando o material mais flexível em temperatura próxima à temperatura ambiente (25 °C) e melhorando o desempenho mecânico dessas formulações como filmes flexíveis para aplicação em alimentos.

Tabela 11: Módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e temperatura de transição vítrea (T_g) obtidos por DMA

Filmes	E' (MPa) a -25°C	E' (MPa) a 25°C	E'' (MPa) a 25 °C	T_g (°C)
P	4175	3284	111	18,8
PSep	4459	3327	103	13,5
PO	3566	1940	124	15,6
POSep	4728	2216	143	10,8
PA	5568	3284	189	14,9
PASep	4967	3225	175	18,3
PM	6111	4025	136	8,7
PMSep	5049	3076	132	12,5

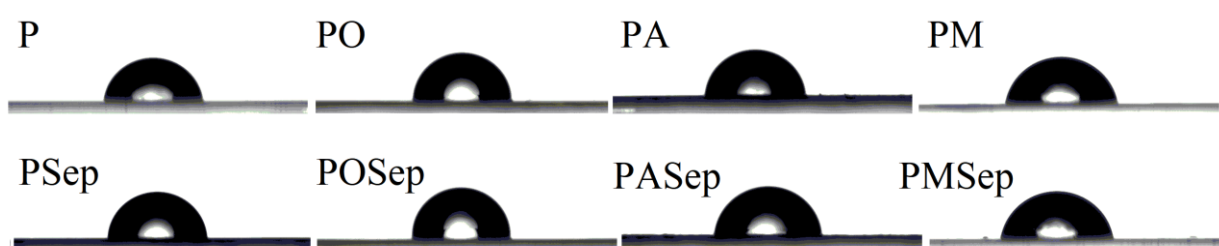
As curvas $\tan\delta$ para as diferentes formulações de filmes ativos são apresentadas na Figura 43. Percebe-se o deslocamento das curvas para a esquerda em relação à curva de PHBV puro (curva preta), indicando a diminuição da temperatura de transição vítrea, conforme discutido anteriormente.



5.2.7 Ângulo de contato

O ângulo de contato é um teste rápido que permite avaliar características hidrofóbicas da superfície dos filmes, que interfere na resistência dos filmes à água e influencia na liberação dos óleos durante o armazenamento do produto. Valores de ângulo de contato inferiores a 65° indicam natureza hidrofílica dos materiais, enquanto valores superiores a 65° estão relacionados a superfícies hidrofóbicas (MEDINA-JARAMILLO et al., 2017). Os resultados de ângulo de contato estão apresentados na Figura 44.

Figura 44: Perfil das gotas obtidas no ensaio de ângulo de contato para os filmes contendo diferentes óleos essenciais



Fonte: Próprio autor

Todas as amostras parecem apresentar resposta semelhante quanto à molhabilidade. Para o filme de PHBV (P), é possível apontar um perfil de gota com caráter mais hidrofóbico, com ângulo de contato medindo $82,28^\circ \pm 3,17^\circ$. O ângulo encontrado para filmes de PHBV coincide com o observado por outros autores (FERREIRA et al., 2009; FIGUEROA-LOPEZ et al., 2019). As medidas sofrem uma pequena variação com a adição de óleos essenciais e sepiolita, conforme detalhado na Tabela 12.

Tabela 12: Medidas de ângulo de contato para as diferentes formulações de filmes

Filmes	Ângulo de contato ($^\circ$)	Filmes	Ângulo de contato ($^\circ$)
P	$82,28 \pm 3,17$	PSep	$87,75 \pm 0,68$
PO	$83,63 \pm 5,20$	POSep	$88,95 \pm 4,10$
PA	$86,06 \pm 4,36$	PASep	$84,61 \pm 0,43$
PM	$85,33 \pm 4,32$	PMSep	$81,18 \pm 2,85$

É possível observar que os valores de ângulo de contato aumentam ligeiramente com a adição dos óleos essenciais, devido à hidrofobicidade destes.

Essa característica de redução no caráter hidrofílico com a incorporação de óleos agrega mais uma propriedade aos filmes, uma vez que a resistência à água é um comportamento desejável para filmes biodegradáveis, protegendo o alimento ao longo de sua vida de prateleira (HASHEMI; MOUSAVI KHANEGHAH, 2017). O ângulo de contato para o filme de PA apresentou um valor de $86,06^\circ$, seguido de $85,33^\circ$ para o filme PM.

Conforme mencionado, as medidas sofrem pouca alteração em relação ao valor medido de ângulo de contato, uma vez que o próprio desvio entre os resultados torna a caracterização mais parecida. Entretanto, é possível destacar uma tendência de aumento do ângulo de contato com a incorporação de sepiolita nos filmes de PHBV e na combinação sepiolita/óleo de orégano. Esse aumento pode ser um indício da interação entre a nanopartícula e o óleo de orégano, diminuindo os grupamentos hidrofílicos livres e, conseqüentemente, aumentando o ângulo de contato (HASHEMI; MOUSAVI KHANEGHAH, 2017).

5.2.8 Permeabilidade ao oxigênio

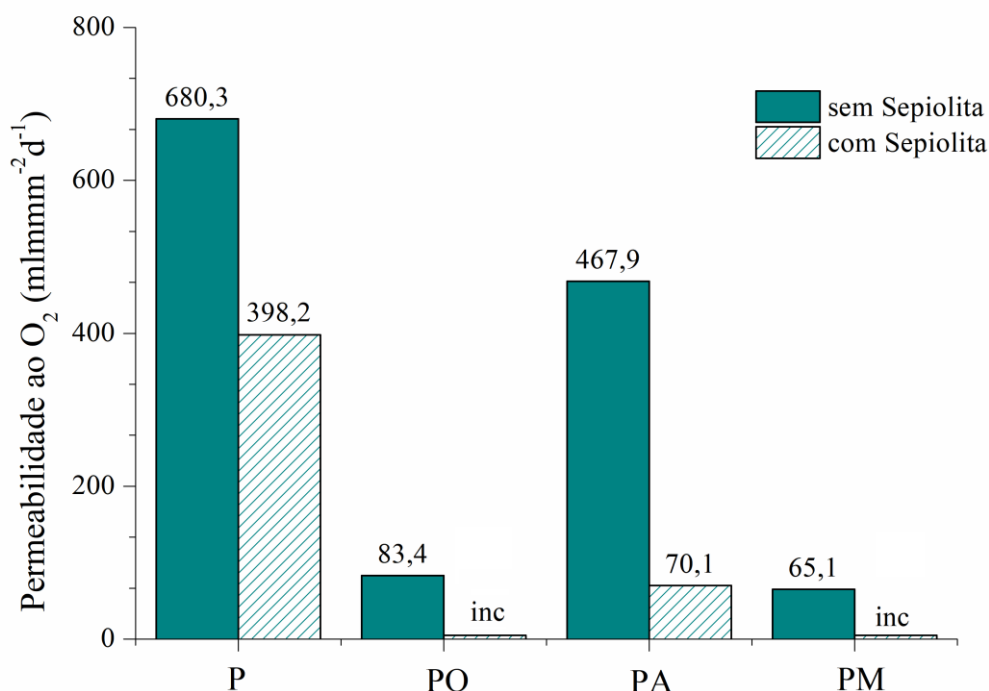
Os filmes foram caracterizados quanto à influência da sepiolita em agregar propriedades de barreira às formulações desenvolvidas. A Figura 45 apresenta o resultado de permeabilidade ao O_2 das diferentes amostras.

O ensaio anteriormente descrito (item 5.1.6) apresentava um valor de permeabilidade em $392,4 \text{ mLmm/m}^2\text{d}$ para o PHBV puro. Na presente etapa, o valor encontrado para o filme de PHBV, sem aditivos, foi de $680,3 \text{ mLmm/m}^2\text{d}$. Esse desvio entre os resultados é justificado pelos diferentes períodos de armazenamento dos filmes e diferentes momentos de realização das análises. Portanto, a comparação aqui apresentada refere-se apenas a esta série de resultados. A adição da sepiolita nos filmes (PSep) reduz a permeabilidade dos filmes para o valor de $398,2 \text{ mLmm/m}^2\text{d}$. Essa redução de 42% confirma a atuação das nanopartículas como barreira à passagem de moléculas de O_2 .

Nos filmes contendo óleo de orégano e óleo de manjeriço, os valores de permeabilidade encontrados foram de $83,4 \text{ mLmm/m}^2\text{d}$ para o PO e $65,1 \text{ mLmm/m}^2\text{d}$ para o filme de PM. Embora o óleo essencial não atue como aditivo de barreira em filmes polímero, é possível que essa tortuosidade na passagem de moléculas de O_2 e conseqüente redução da permeabilidade esteja associada ao grau de cristalinidade dos materiais. Como discutido no item 5.2.5, houve um aumento na

cristalinidade dos filmes de PO e PM em relação ao filme de PHBV puro. Como os cristalitos são impermeáveis, a molécula permeante deve procurar zonas amorfas para passar pela matriz polimérica. Portanto, um polímero com maior grau de cristalinidade proporciona menor permeação (ZABIHZADEH KHAJAVI et al., 2020).

Figura 45: Permeabilidade ao oxigênio dos filmes preparados usando diferentes óleos essenciais, com e sem nanopartículas



inc: Valores inconclusivos. Não foi possível estimar o valor de permeabilidade devido a defeitos nos filmes produzidos (POSep e PMSep).

Fonte: Próprio autor

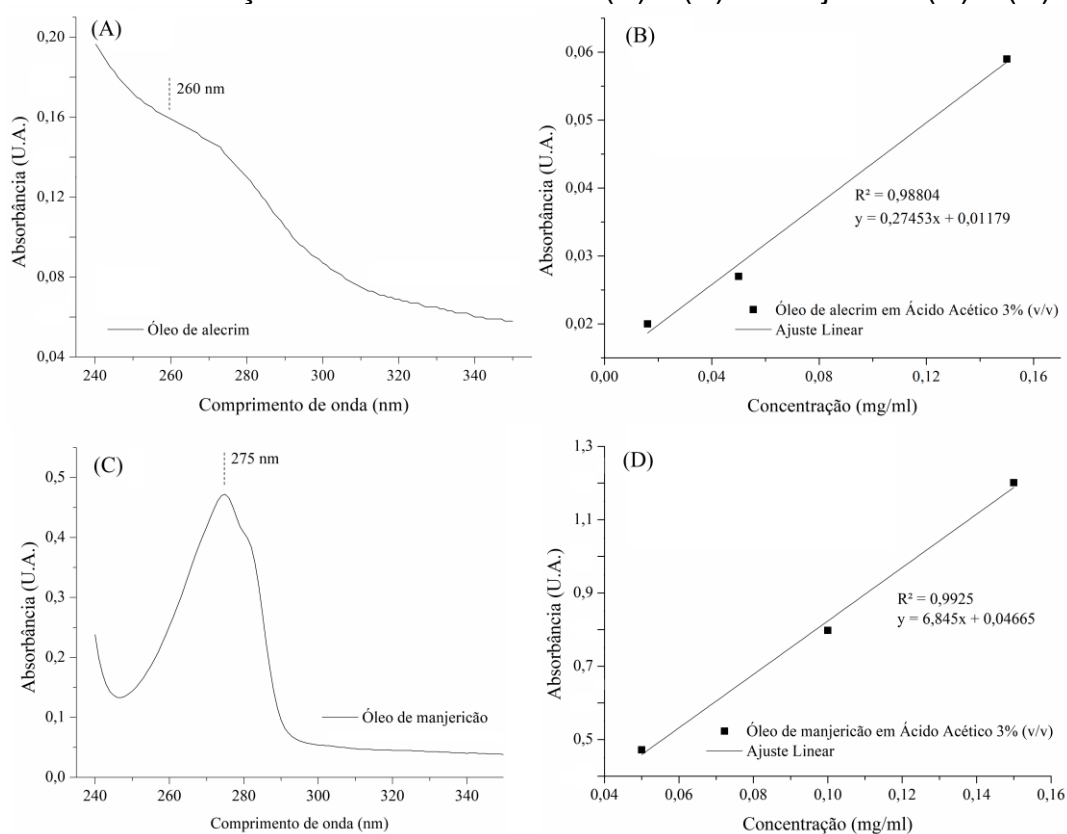
Para os filmes com óleo de alecrim, os valores encontrados são de 467,9 mLmm/m².d para a composição PA e 70,1 mLmm/m².d na formulação PASEp. Os resultados estão de acordo com o esperado, com uma redução de 32% no valor de permeabilidades ocasionado pela presença do óleo essencial e uma redução acentuada de aproximadamente 90% nos filmes com a presença de sepiolita.

5.2.9 Ensaios de liberação associado aos diferentes óleos essenciais

Os ensaios de liberação dos filmes de PHBV/Sep contendo diferentes óleos essenciais foram novamente conduzidos em meio de ácido acético 3% (v/v). Previamente ao ensaio, as curvas de calibração foram construídas para auxiliar na quantificação de óleo liberado em cada ensaio. A calibração associada ao óleo de

órégano encontra-se apresentada na Figura 30, anteriormente discutida. Para os demais óleos, a curva de calibração segue apresentada na Figura 46. O comprimento de onda para a quantificação do óleo de alecrim foi de 260 nm, observado também em alguns artigos (MURESAN et al., [s.d.]). Entretanto, o espectro apresentado na Figura 46 (A) indica que o alecrim não apresenta uma banda de absorção bem definida no UV-Vis, devido à ausência de insaturação na cadeia do componente majoritário, eucaliptol. De modo contrário, para o óleo de manjerição, a banda de absorção é bem definida em torno de 275 nm devido à insaturação do grupo estragol (GUPTA et al., 2022).

Figura 46: Espectro UV e respectiva curva analítica para quantificação do ensaio de liberação dos óleos de alecrim (A) e (B) e manjerição (C) e (D).

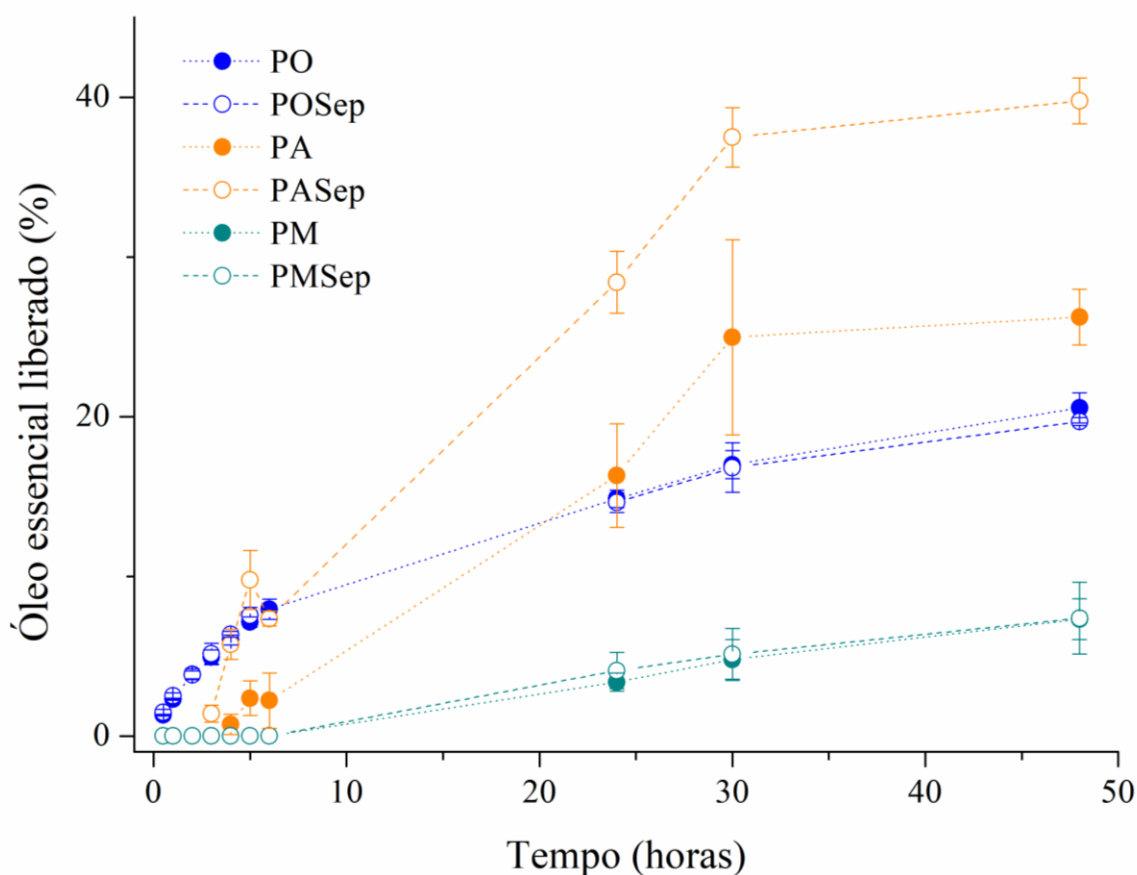


Fonte: Próprio autor

Para a discussão desses resultados é importante ressaltar que a concentração de óleo liberada é calculada de acordo com o teor de óleo presente nos filmes, obtida por TGA. Os resultados discutidos na Tabela 9 indicam que houve perda do óleo durante o período de armazenamento do filme (cerca de dois anos). Esse material foi o mesmo usado nos ensaios de liberação. Conseqüentemente, os

resultados passam a não representar fielmente a entrega do ativo antimicrobiano no meio simulador, uma vez que o óleo desprendido dos filmes durante o armazenamento é o mesmo que deveria ser liberado mais rapidamente para o meio no ensaio de dissolução. Dito isso, as curvas de liberação para os óleos essenciais nas diferentes formulações de filmes (com e sem sepiolita) são apresentados na Figura 47.

Figura 47: Curvas de liberação dos diferentes óleos essenciais nos filmes de PHBV, com e sem a presença de sepiolita.



Fonte: Próprio autor

A entrega do óleo de orégano nos filmes de PO e POSep acontece de forma gradual no meio de ácido acético 3% (v/v). Em 48 h de ensaio, o filme de PO liberou cerca de $20,56\% \pm 0,94\%$ de aditivo, enquanto o filme de POSep liberou $19,69\% \pm 0,25\%$ de óleo. Esse resultado segue coerente com o observado anteriormente no item 5.1.7, onde a liberação do orégano foi em torno de 20% para os filmes de PO e POSep. Nos filmes contendo óleo de manjeriço, a liberação segue mais lenta quando comparada à liberação dos filmes com orégano. A baixa liberação é

observada principalmente nos estágios iniciais do ensaio, não sendo possível quantificar o óleo de manjeriço liberado pelos filmes. O ensaio de liberação apresentado na Figura 47 inicia em 24 h, com liberação de $3,37\% \pm 0,56$ de OEM no filme PM e $4,10\% \pm 1,14$ para o filme de PMSep. Não parece existir diferença entre o perfil de liberação desses filmes, uma vez que os valores para o filme sem e com sepiolita estão muito próximos. Essa semelhança é evidenciada em 48 h de ensaio, onde os filmes liberaram $7,31\% \pm 1,13$ de óleo nos filmes PM e $7,37\% \pm 2,25$ de óleo no filme PMSep.

Nos filmes contendo óleo de alecrim, $0,73\% \pm 0,64$ de óleo é liberado em 4 h de ensaio no filme de PA e $1,40\% \pm 0,52$ para o filme de PASep. Ao final de 48 h, é observada a liberação de $26,23\% \pm 1,74$ e $39,77\% \pm 1,44$ de alecrim nos filmes de PA e PASep, respectivamente.

Dois análises tornam-se importantes a serem consideradas, principalmente nos filmes onde não foi possível quantificar o óleo liberado nas horas iniciais de ensaio. A primeira refere-se à volatilização do óleo durante o armazenamento, já mencionado anteriormente, que acaba reduzindo a quantidade de ativo disponível, principalmente o óleo da camada mais externa do filme. Com isso, o ativo liberado e quantificado no ensaio é aquele que difundiu lentamente através da matriz de PHBV ou PHBV/Sep ao longo do ensaio, sendo difícil a quantificação nas horas iniciais onde o óleo ainda não foi liberado para o meio.

A segunda análise refere-se ao parâmetro de solubilidade (δ) de cada óleo, que influencia na afinidade entre os componentes do filme e na afinidade dos componentes com o meio de liberação proposto. A Tabela 13 apresenta o δ de cada substância e o coeficiente de partição ($K_{P/L}$), parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a distribuição do óleo essencial no polímero ou no meio simulador. O coeficiente de partição ($K_{P/L}$) é obtido através da Equação

$$K_{P/L(a)} = \frac{\Delta\delta_{L,a}}{\Delta\delta_{P,a}} \quad \text{Eq. 6}$$

Sendo $\Delta\delta_{L,a}$ a diferença entre o parâmetro de solubilidade do meio e o parâmetro de solubilidade do óleo e $\Delta\delta_{P,a}$ a diferença entre os parâmetros de solubilidade do polímero e do óleo (ZYGOURA; PALEOLOGOS; KONTOMINAS, 2011).

Tabela 13: Parâmetro de solubilidade (δ) e coeficiente de partição ($K_{P/L}$) do PHBV, do meio de liberação e dos óleos utilizados no ensaio.

Substância	Parâmetro de Solubilidade (δ) (MPa ^{1/2})*	Coeficiente de partição ($K_{P/L}$)
PHBV	20,6	-
Ácido acético 3% (v/v)	47,1	-
Óleo de orégano	15,1	5,82
Óleo de alecrim	17,8	10,46
Óleo de manjeriço	19,2	19,93

* Os dados de δ foram obtidos segundo referências: PHBV (CHOI; PARK, 2004); ácido acético 3% (v/v) (ZYGOURA; PALEOLOGOS; KONTOMINAS, 2011); óleo de orégano (ZHU et al., 2016); óleo de alecrim; óleo de manjeriço (LI et al., 2014).

É possível observar que os valores de $K_{P/L}$ são bem distintos entre si, indicando que há uma diferença na entrega de cada óleo para o ácido acético 3% (v/v). Quanto menor o valor de $K_{P/L}$, maior é a partição dos componentes no meio de liberação e, conseqüentemente, melhor é a difusão do ativo para o meio. Esses resultados confirmam os dados obtidos no ensaio de liberação do óleo de orégano, onde foi possível medir a concentração de ativo liberado em todo o período de análise.

Nos ensaios conduzidos com óleo de manjeriço, não foi possível quantificar os dados em tempos inferiores a 24 h. Esse resultado pode estar associado ao alto valor de $K_{P/L}$ do sistema, indicando baixa migração do ativo para o meio. Além do alto $K_{P/L}$, é possível observar que dentre os óleos usados, o óleo de manjeriço apresenta δ de 19,2 MPa^{1/2}, próximo ao valor de 20,6 MPa^{1/2} para o PHBV. Essa proximidade entre os valores de solubilidade indica que há uma maior interação do óleo de manjeriço com a matriz polimérica e, como consequência, há uma liberação mais lenta do ativo para o meio.

Por fim, a entrega de óleo de alecrim para o ácido acético é intermediária aos dados obtidos para o óleo de orégano e óleo de manjeriço. O percentual de alecrim liberado nos sistemas PA teve medição iniciada em 4 h de ensaio, enquanto nos sistemas PASep em 3 h de análise. Esses resultados reforçam a importância de conhecer a solubilidade do ativo antimicrobiano no meio e compreender todos os fatores que podem vir a afetar o ensaio de dissolução.

5.2.10 Atividade antimicrobiana segundo JIS2801:2000

Assim como avaliado no item 5.1.8, a atividade antimicrobiana das formulações de PHBV/Sepiolita contendo diferentes óleos essenciais também foi avaliada contra *S. aureus* e *E. coli*, seguindo a JIS 2801:2000 com adaptações. Os resultados estão indicados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados de atividade antimicrobiana por ensaio de contato direto contra *E. coli* e *S. aureus* para os filmes com diferentes óleos essenciais

Amostras	E. coli*			S. aureus**		
	Contagem após 24 h (UFC/mL)	Redução (R) em log	R (%)	Contagem após 24 h (UFC/mL)	Redução (R) em log	R (%)
Controle	1,6x10 ⁶	-	-	3,5x10 ⁶	-	-
PO	1,6x10 ³	3,0±0,5	99,9	1,3x10 ²	4,4±0,9	99,9
POSep	6,9x10 ³	2,4±0,8	99,6	2,2x10 ³	3,2±0,9	99,9
PA	1,5x10 ⁶	0,0±0,0	6,3	1,6x10 ⁶	0,3±0,3	54,3
PASep	1,1x10 ⁶	0,2±0,5	31,3	8,5x10 ⁵	0,6±0,0	75,7
PM	1,0x10 ³	3,2±0,8	99,9	9,0x10 ^{-1****}	6,0±0,0	99,9
PMSep	3,1x10 ^{7****}	0,2±0,1	39,2	1,6x10 ⁶	0,3±0,3	54,3

* Contagem de *E. coli* no tempo zero foi de 1,4x10³ UFC/mL

** Contagem de *S. aureus* no tempo zero foi de 1,0x10³ UFC/mL

*** Ensaio foi conduzido em outro período para a amostra PMSep. A contagem microbiológica inicial e após 24 h sofreu alteração no valor. Os dados de redução (R), em log, foram calculados em relação à respectiva contagem inicial do ensaio de 3,3x10⁴ UFC/mL

**** Ensaio foi conduzido em outro período para a amostra PM. A contagem microbiológica inicial e após 24 h sofreu alteração no valor. Os dados de redução (R), em log, foram calculados em relação à respectiva contagem inicial do ensaio de 2,5x10⁴ UFC/mL

A contagem de *S. aureus* e *E. coli* nos filmes de PHBV contendo óleo de orégano (PO e POSep) e no filme contendo óleo de manjerição (PM) foram significativamente menores do que no controle. Para bactérias Gram negativas como a *E. coli*, a inibição foi praticamente a mesma para ambos os materiais, com redução percentual próximo a 99% e redução em log maior que 2 ciclos, conforme sugerido pela norma proposta para avaliar eficácia de atividade antimicrobiana. Para a *S. aureus*, é possível observar um aumento significativo da característica antimicrobiana dos filmes, com uma redução em log de 4,4 para o filme de PO e 3,2

em redução log para o filme de POsep. Essa característica segue de acordo com o apontado por alguns trabalhos, que discutem que óleos essenciais apresentam um melhor desempenho contra bactérias Gram positivas (DANNENBERG et al., 2017).

A composição PM também seguiu apresentando melhor desempenho contra a bactéria Gram positiva, com uma redução em log de 6,0 sendo que em nenhuma das placas ensaiadas em triplicata foi observada contagem microbiológica das suspensões de *S. aureus*. Como não houve contagem de bactérias inicialmente incorporadas à análise, o material apresentou excelente efeito contra *S. aureus*, levando à inibição total das bactérias e redução de 99,9% do crescimento microbiano. Embora menor, a eficácia do óleo de manjerição em filmes de PHBV também foi apontada frente a bactérias *E. Coli*, onde a redução atingiu um valor de 3,2 log.

Nas composições usando óleo de alecrim não foi verificado um bom desempenho dos filmes como agentes antimicrobianos, com os valores de redução significativamente baixos, tanto em log como em escala percentual. Além do alecrim, os filmes PMSep também não apresentaram redução e/ou inibição na carga inicial de bactérias. Para esses materiais, o resultado pode estar associado à sepiolita presente na composição, em relação ao material sem carga que apresentou excelente desempenho antimicrobiano. A presença de sepiolita má dispersa nos filmes de PMSep, como visto anteriormente, pode prejudicar as propriedades do material produzido, aumentando a cristalinidade dos filmes e, conseqüentemente, diminuindo o contato direto do óleo de manjerição com o inóculo depositado sobre os filmes.

Após a análise do conjunto de resultados obtidos, o filme POsep (óleo de orégano e nanopartícula) parece ser o responsável pelo melhor desempenho como embalagem ativa, tanto em seus ensaios analíticos e qualitativos, como nos ensaios de atividade antimicrobiana. Por isso, a composição foi selecionada para a caracterização final de avaliação da atividade *in situ*, simulando condições de aplicação no produto alimentício de interesse.

5.2.11 Atividade antimicrobiana *in situ* avaliada em queijo muçarela

O prazo de validade de um produto lácteo, como o queijo muçarela, é muito curto, de aproximadamente de 5 a 7 dias (COELHO et al., 2014), devido às alterações químicas, bioquímicas e físicas que podem sofrer por microrganismos e

enzimas deteriorantes de origem alimentar. Como consequência, o produto perde suas características sensoriais e nutricionais, depreciando seu valor comercial.

O ensaio antimicrobiano *in situ* foi conduzido como o sugerido pela norma, usando bactérias mais comuns nesse tipo de caracterização. Portanto, devido ao interesse de verificar a aplicação dos filmes desenvolvidos em queijo muçarela e de acordo com as bactérias patogênicas associadas a este alimento, os ensaios no alimento foram conduzidos usando contaminação com a *Listeria monocytogenes* (Gram positiva) e *E. Coli* (Gram negativa). Os resultados quantitativos do ensaio em queijo muçarela são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Contagem de suspensões bacterianas na superfície dos queijos cobertos com o filme antimicrobiano desenvolvido com PHBV/óleo de orégano/sepiolita

Tempo (d)	<i>E. coli</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	Controle* (UFC/mL)	POSep (UFC/mL)	Controle* (UFC/mL)	POSep (UFC/mL)
0	2,71E+05	2,71E+05	1,27E+06	1,27E+06
3	1,01E+05	4,27E+04	1,23E+06	7,33E+05
6	9,67E+04	7,57E+04	3,53E+05	2,93E+05
9	4,67E+04	2,17E+04	**	**
12	1,03E+05	8,40E+04	2,33E+05	4,00E+04
15	1,24E+05	9,80E+04	2,00E+05	6,67E+04
30	1,23E+04	1,37E+04	4,43E+04	3,67E+04

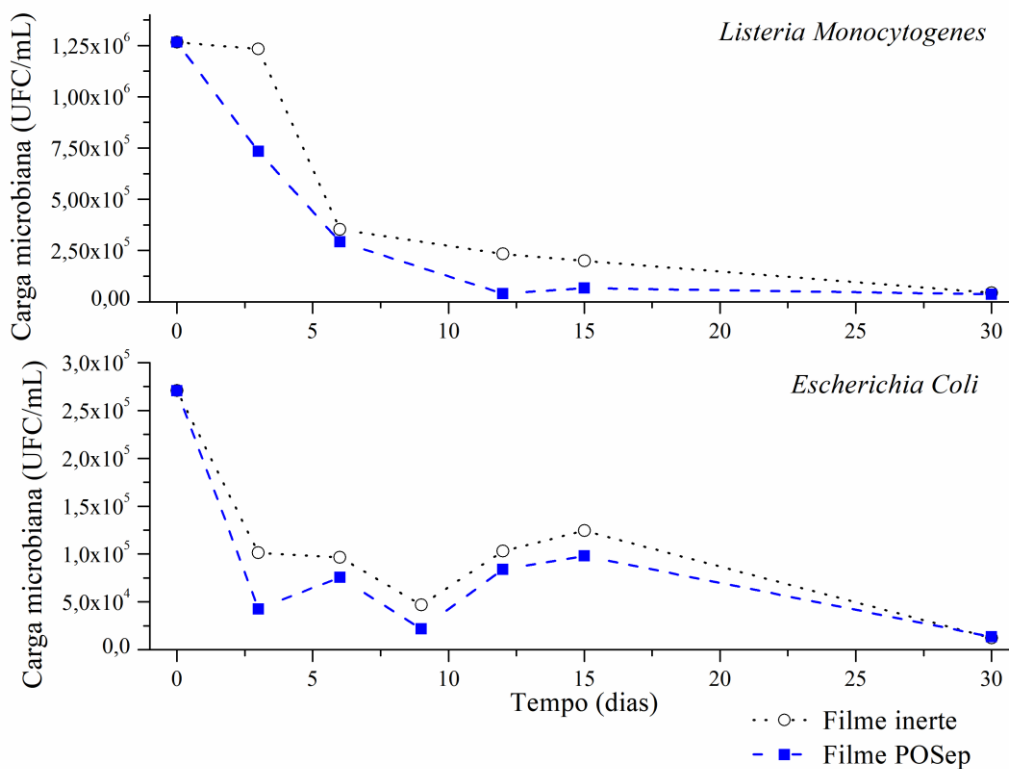
* Controle: Filme plástico sem incorporação de óleo essencial

** No dia 9, não houve coleta dos resultados para os filmes contra *Listeria Monocytogenes*.

As contagens de *E. coli* e de *L. monocytogenes* no tempo zero foram de $2,71 \times 10^5$ UFC/mL e $1,27 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Em intervalos de tempo selecionados, um grupo de amostras foi retirado da refrigeração para seguir com a contagem microbiológica. No ensaio, é possível perceber que a maior redução de inóculo no produto alimentício acontece nos tempos iniciais de contato, destacando a redução de uma ordem de grandeza após três dias nos queijos contendo *E. coli* com o filme antimicrobiano (POS) em comparação ao controle que manteve a contagem em 10^5 . Após esse período, a quantificação parece oscilar e não houve inibição satisfatória na contagem microbiológica avaliada nesse ensaio. A Figura 48

ilustra o resultado para ambas as bactérias.

Figura 48: Atividade antimicrobiana *in situ* dos filmes, por contato direto em queijo muçarela



Fonte: Próprio autor

Para os ensaios conduzidos com *L. Monocytogenes* o efeito parece um pouco diferente. Após três dias, há uma inibição na multiplicação de *L. monocytogenes* nos queijos em contato com o filme de PO-Sep, enquanto a contagem microbiológica observada nos queijos com o controle permanece alta. Somente após esse período a contagem microbiológica começa a ser reduzida nos filmes usados como controle.

Embalagens ativas de acetato de celulose contendo óleo de pimenta rosa também apresentaram o mesmo efeito de redução, conforme descrito por Dannenberg et al. (2017). As contagens mais baixas foram observadas no dia 3 e os autores associam que a rápida liberação de óleo essencial em até 3 dias justifica-se pela afinidade existente entre os componentes apolares do óleo e o sistema utilizado (queijo muçarela), que é composto por aproximadamente 21% de lipídios (DANNENBERG et al., 2017). Esse recurso facilitaria a migração do óleo do interior do filme até a superfície do produto, permitindo uma melhor dispersão do antimicrobiano no alimento.

Algumas considerações podem ser feitas a respeito da limitação do ensaio para esse tipo de produto alimentício. Numericamente, não houve uma redução significativa do inóculo presente nos queijos em contato com os filmes antimicrobianos. Essa baixa redução pode estar associada à limitação de liberação do óleo de orégano na matriz de PHBV/Sepiolita, tais como: (i) a liberação do óleo de orégano é lenta, devido à lenta difusão do óleo na matriz; (ii) nas temperaturas de refrigeração, a difusão do óleo pode ser ainda menor do que a proposta nos ensaios de dissolução (simuladas a 25 °C); (iii) os filmes são dimensionados em quadrados de mesmo tamanho, entretanto não é possível garantir a uniformidade na distribuição de óleo nas amostras. Esses fatores podem justificar o desempenho favorecido dos filmes antimicrobianos nos primeiros dias de análise (3 dias), onde o óleo essencial está mais próximo a superfície e, conseqüentemente, mais disponível para a liberação e contato com o produto alimentício.

Alguns trabalhos usando óleos essenciais em aplicações voltadas a laticíneos também destacam algumas limitações na condução dos ensaios: Inouye et al. em 2003 compararam a atividade antimicrobiana de quatro óleos essenciais na forma de vapor e por contato com a solução bacteriana. Todos os óleos testados (óleo de casca de canela, óleo de tomilho, lavanda e perilla) apresentaram atividade antimicrobiana. No entanto, o crescimento dos organismos foi inibido mais eficientemente pelo contato gasoso do que pelo contato com a solução, indicando a contribuição significativa do efeito direto do vapor na atividade antimicrobiana (INOUE et al., 2003). Han et al. (2014) destacam que a liberação do óleo de alecrim e tomilho a partir de sachês de amido, em contato com queijos, também depende da umidade dentro das embalagens, uma vez que os compostos voláteis são volatilizados dos sachês em função da umidade relativa dentro da embalagem e da temperatura (HAN et al., 2014). Os autores também ressaltam que o sachê antimicrobiano contendo alecrim e tomilho não foi capaz de eliminar totalmente a *Listeria monocytogenes*. No entanto, os queijos que tiveram contato com os sachês tiveram redução no crescimento da bactéria (HAN et al., 2014).

Em contrapartida, Dannenberg e autores (2017) desenvolveram um filme de acetato de celulose contendo óleo essencial de pimenta rosa. Os autores avaliaram a atividade antimicrobiana dos filmes em contato com queijos. Os testes *in situ* demonstraram que a afinidade entre as moléculas apolares do óleo essencial e o componente lipídico do queijo permitiu que o óleo presente no polímero migrasse

para o alimento, garantindo o uso como embalagem ativa por contato direto (DANNENBERG et al., 2017). Essas diferentes abordagens demonstram que a atividade antimicrobiana deve ser estudada caso a caso, avaliando os diferentes óleos essenciais nos diferentes polímeros.

Além das características relacionadas aos óleos, vale destacar as limitações relacionadas às bactérias. A temperatura de refrigeração de 6 °C usada no ensaio microbiológico simula o acondicionamento e a condição de prateleira dos queijos. Essa temperatura é mais propícia ao desenvolvimento da *Listeria monocytogenes*, uma bactéria psicrófila, que consegue se desenvolver bem em ambientes com temperaturas entre -0,4 e 45 °C (ROBERTS et al., 2020). Entretanto, em relação à *E. coli*, a temperatura ótima de crescimento está em 37 °C. Essa característica pode justificar a dificuldade de crescimento e até mesmo a morte de *E. coli* no contato com ambos os filmes avaliados.

Apesar das limitações encontradas na execução deste ensaio microbiológico, é possível destacar a tendência dos filmes de POSep em reduzir a contagem microbiológica em ensaios conduzidos com suspensão bacteriana forçada. Nenhum aumento na contagem microbiológica foi observado, tanto nos ensaios adaptados seguindo a JIS 2801:2000 quanto nos ensaios antimicrobianos usando o produto alimentício de interesse – queijo muçarela. Os filmes avaliados foram capazes de inibir a multiplicação das bactérias amostradas, tornando a contagem baixa em relação ao controle. Portanto, pode-se considerar que o filme desenvolvido ao longo do projeto responde às propriedades antimicrobianas desejadas, com resultados satisfatórios em ensaios *in situ*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo apresentado avaliou dois parâmetros para o desenvolvimento de filmes antimicrobianos: a seleção adequada da carga inorgânica e a escolha do aditivo antimicrobiano, tendo como referência o uso de óleos essenciais como agentes naturais no controle de bactérias deteriorantes em embalagens para alimentos. Foram avaliadas as nanopartículas de haloisita, caulinita e sepiolita. As nanopartículas utilizadas apresentaram o efeito de barreira esperado quando incorporadas à matriz de PHBV. Entretanto, destaca-se os filmes com sepiolita que obtiveram os melhores resultados quanto ao aumento do módulo, aumento da estabilidade térmica e liberação controlada quando associada ao óleo essencial em meio simulador de alimentos lácteos. Esse ajuste da propriedade nos filmes de PHBV e sepiolita deve-se, principalmente, a interação entre nanopartícula e polímero e a morfologia da sepiolita, que favorece a dispersão da carga.

Além disso, as nanopartículas foram combinadas ao óleo essencial de orégano para avaliação da contagem microbiológica quando em contato direto com uma suspensão de bactérias. Os ensaios seguiram o procedimento da JIS 2801, norma utilizada para avaliação antimicrobiana em filmes poliméricos. A incorporação do óleo essencial de orégano nos diferentes filmes foi capaz de gerar resultados favoráveis para a aplicação como antimicrobianos. Entretanto, destaca-se novamente os filmes de POSeP como os materiais mais eficazes em bactérias Gram negativas (*E. coli*) e Gram positivas (*S. aureus*), alcançando inibição da carga microbiológica.

Quando avaliados os diferentes óleos essenciais, é possível identificar que a composição química influencia diretamente na interação com os demais componentes dos filmes. Esse efeito é destacado nos ensaios de liberação dos óleos, onde a entrega do aditivo antimicrobiano depende fortemente da interação do óleo com o polímero e desse conjunto com o meio simulador do alimento. Embora o óleo de manjerição apresente parâmetro de solubilidade próximo ao do PHBV, indicando afinidade entre as matrizes, o coeficiente de partição alto torna a liberação do aditivo mais lenta para o meio. Essa característica afetou também os ensaios antimicrobianos *in situ*, reduzindo seu potencial de inibição microbiana.

O nanocompósito de POSeP apresenta-se como mais promissor para a aplicação em embalagens de alimentos, impedindo o crescimento das bactérias

testadas. Para corroborar essa discussão, os filmes de POsep foram submetidos a ensaios *in situ* em queijo muçarela, usando contaminação com *Listeria monocytogenes* e *E. coli*. A aplicação como embalagem para queijos foi selecionada devido ao aroma expressivo dos óleos, que pode contribuir positivamente na aromatização deste produto alimentício, facilitando a aceitação do consumidor. Os resultados indicaram um desempenho satisfatório dos filmes de POsep em relação aqueles usados como controle, mantendo a contagem microbiológica baixa ao longo dos 30 dias de ensaio. Sendo assim, os filmes produzidos contendo PHBV, nanopartícula de sepiolita e óleo essencial de orégano se mostraram adequados para aplicação como material de embalagem com propriedades antimicrobianas e propriedades físico-químicas ajustadas, com o objetivo de manter as características sensoriais do alimento e garantir a segurança do produto.

7 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, o autor colaborou cientificamente com o desenvolvimento dos seguintes artigos em periódicos científicos e participação em eventos da área:

7.1 ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

COSTA, RENATA CERRUTI DA; INEICHEN, ANA PAULA; TEIXEIRA, CRISTIANO DA SILVA; BELLETTINI, ISMAEL CASAGRANDE; CARLI, LARISSA NARDINI. Release of oregano essential oil from PHBV films in simulated food conditions. *Polímeros: ciência e Tecnologia*, v. 32, p. e2022028, 2022.

DA COSTA, RENATA C.; DAITX, TALES S.; MAULER, RAQUEL S.; DA SILVA, NATÁLIA M.; MIOTTO, MARÍLIA; CRESPO, JANAINA S.; CARLI, LARISSA N. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-based nanocomposites for antimicrobial active food packaging containing oregano essential oil. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 26, p. 100602, 2020.

7.2 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS DA ÁREA

COSTA, R. C.; OLIVEIRA P. R.; BOBERMIN, D. M.; DAITX, T. S.; MIOTTO, M.; CARLI, L. N. Potential application of essential oils in PHBV/clay films in antimicrobial cheese packaging. XX B-MRS Meeting em Foz Iguaçu-PR – setembro de 2022.

COSTA, R. C.; INEICHEN, A. P.; TEIXEIRA, C. S.; BELLETTINI, I. C.; CARLI, L. N. Release of oregano essential oil in simulated food conditions from PHBV biodegradable films. 16º Congresso Brasileiro de Polímeros - CBPol, 2021, Ouro Preto.

COSTA, R. C.; CRESPO, J. S.; MIOTTO, M. ; CARLI, L. N. Nanocompósitos de PHBV/argila/óleo essencial de orégano aplicados a embalagens ativas com propriedades antimicrobianas. 15º Congresso Brasileiro de Polímeros - CBPol, 2019, Bento Gonçalves.

COSTA, R. C.; TECH, M. E. M.; DAITX, T. S.; MAULER, R. S.; CARLI, L. N. Efeito de aditivos na cristalização não isotérmica do poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) - PHBV. 15º Congresso Brasileiro de Polímeros - CBPol, 2019, Bento Gonçalves.

CERRUTI, R. C.; DAITX, T. S.; MAULER, R. S.; CRESPO, J. S.; MIOTTO, M.; CARLI, L. N. Release of oregano essential oil from PHBV active films containing nanoclays. 35th International Conference of the Polymer Processing Society - PPS, 2019, Çesme-Izmir.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 343–350, jul. 2012.

AIJUKA, M.; BUYS, E. M. Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: Implications for food safety and public health. **Food Microbiology**, v. 82, p. 363–370, set. 2019.

ALKAN, M.; TEKIN, G.; NAMLI, H. FTIR and zeta potential measurements of sepiolite treated with some organosilanes. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 84, n. 1–3, p. 75–83, set. 2005.

ALTAN, M.; YILDIRIM, H. Comparison of Antibacterial Properties of Nano TiO₂ and ZnO Particle Filled Polymers. **Acta Physica Polonica A**, v. 125, n. 2, p. 645–647, jan. 2011.

AMOR, G. et al. Basil Essential Oil: Composition, Antimicrobial Properties, and Microencapsulation to Produce Active Chitosan Films for Food Packaging. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 121, jan. 2021.

AOYAGI, Y.; YAMASHITA, K.; DOI, Y. Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[ε-caprolactone], and poly[(S)-lactide]. **Polymer Degradation and Stability**, p. 7, 2002.

ARRIETA, M. P. et al. Ternary PLA–PHB–Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. **European Polymer Journal**, v. 50, p. 255–270, jan. 2014.

ASBAHANI, A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1, p. 220–243, 10 abr. 2015.

APJOK, R. et al. Active packaging based on cellulose-chitosan-Ag/TiO₂ nanocomposite for storage of clarified butter. **Cellulose**, v. 26, n. 3, p. 1923–1946, 1 fev. 2019.

ARFA, A. B. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149–154, 1 ago. 2006.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. **Food Control**, v. 76, p. 1–12, 1 jun. 2017.

ASBAHANI, A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1, p. 220–243, 10 abr. 2015.

ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R.; RODOLFO JULIANI, H. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, Part 1, p. 664–671, 1 mar. 2015.

ASMATULU, R. et al. Drug-Carrying Magnetic Nanocomposite Particles for Potential Drug Delivery Systems. **Journal of Nanotechnology**, v. 2009, 28 out. 2009.

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. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 232–239, 1 maio 2012.

BRANDOLT, S. D. F. et al. Synergistic Effect Between Different Clays and Plasticizer on the Properties of PHBV Nanocomposites. **Polymer Composites**, 19 fev. 2019.

CAMPOS-REQUENA, V. H. et al. Polymer/clay nanocomposite films as active packaging material: Modeling of antimicrobial release. **European Polymer Journal**, v. 71, p. 461–475, out. 2015a.

CAMPOS-REQUENA, V. H. et al. The synergistic antimicrobial effect of carvacrol and thymol in clay/polymer nanocomposite films over strawberry gray mold. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 390–396, nov. 2015b.

CARLI, L. N. et al. Morphological and structural characterization of PHBV/organoclay nanocomposites by small angle X-ray scattering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 2, p. 932–937, 1 mar. 2013.

CARLI, L. N. et al. The effects of silane coupling agents on the properties of

PHBV/halloysite nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 87, p. 311–319, 1 jan. 2014.

CARLI, L. N. et al. Biopolymer nanocomposites based on poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) reinforced by a non-ionic organoclay. **Polymer International**, v. 64, n. 2, p. 235–241, 1 fev. 2015.

CARLI, L. N.; CRESPO, J. S.; MAULER, R. S. PHBV nanocomposites based on organomodified montmorillonite and halloysite: The effect of clay type on the morphology and thermal and mechanical properties. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 42, n. 11, p. 1601–1608, 1 nov. 2011.

CASTRO-MAYORGA, J. L. et al. The impact of zinc oxide particle morphology as an antimicrobial and when incorporated in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) films for food packaging and food contact surfaces applications. **Food and Bioproducts Processing**, v. 101, p. 32–44, 1 jan. 2017.

CHAUDHARY, R. G. et al. Metal/Metal Oxide Nanoparticles: Toxicity, Applications, and Future Prospects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 37, p. 4013–4029, 2019.

CHEE, J. Y. et al. The Potential Application of *Cupriavidus necator* as Polyhydroxyalkanoates Producer and Single Cell Protein: A Review on Scientific, Cultural and Religious Perspectives. **Applied Food Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 19–34, 2 jan. 2019.

CHOI, J. S.; PARK, W. H. Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate). **Polymer Testing**, v. 23, n. 4, p. 455–460, 1 jun. 2004.

COELHO, M. C. et al. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53–59, 17 nov. 2014.

CONTE, A. et al. Innovative Active Packaging Systems to Prolong the Shelf Life of Mozzarella Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 5, p. 2126–2131, 1 maio 2007.

CRÉTOIS, R. et al. Microstructure and barrier properties of PHBV/organoclays bionanocomposites. **Journal of Membrane Science**, v. 467, p. 56–66, out. 2014.

DAITX, T. S. et al. Effects of the organic modification of different clay minerals and their application in biodegradable polymer nanocomposites of PHBV. **Applied Clay Science**, v. 115, p. 157–164, 1 out. 2015.

DASAN, Y. K.; BHAT, A. H.; AHMAD, F. Polymer blend of PLA/PHBV based bionanocomposites reinforced with nanocrystalline cellulose for potential application as packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1323–1332, 10 fev. 2017.

DÍEZ-PASCUAL, A. M.; DÍEZ-VICENTE, A. L. ZnO-reinforced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) bionanocomposites with antimicrobial function for food packaging. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 12, p. 9822–9834, 25 jun. 2014.

FANG, Z. et al. Active and intelligent packaging in meat industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 60–71, mar. 2017.

DA SILVA, W. M. F. et al. Basil Essential Oil: Methods of Extraction, Chemical Composition, Biological Activities, and Food Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 15, n. 1, p. 1–27, 1 jan. 2022.

DANNENBERG, G. DA S. et al. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314–318, ago. 2017.

European Commission. (2009). Commission regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union, L135, 3e11.

FANG, Z. et al. Active and intelligent packaging in meat industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 60–71, mar. 2017.

FARMAHINI-FARAHANI, M. et al. Surface morphological analysis and water vapor barrier properties of modified Cloisite 30B/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

hydroxyvalerate) composites. **Applied Clay Science**, v. 135, p. 27–34, 1 jan. 2017.

FDA (2013). Code of federal regulations part 182: Substances generally recognized as safe sec. 182.20 essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). Cfr-code of federal regulations title 21, Vol. 3. US Food and Drug Administration, Department of Health And Human Services.

FDA, 2021. Outbreak investigation of *Listeria monocytogenes* – Hispanic-style fresh and soft cheeses (2021).

FERNÁNDEZ-PAN, I. et al. Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 60–68, 1 out. 2015.

FERREIRA, B. M. P. et al. Plasma surface treatments of poly(l-lactic acid) (PLLA) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV). **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 3, p. 806–813, abr. 2009.

FIGUEROA-LOPEZ, K. J. et al. Antimicrobial and Antioxidant Performance of Various Essential Oils and Natural Extracts and Their Incorporation into Biowaste Derived Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Layers Made from Electrospun Ultrathin Fibers. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, p. 144, 23 jan. 2019.

FROST, R.; DING, Z. Controlled Rate Thermel Analysis and Differential Scanning Calorimetry of Sepiolites and Palygorskites. **Thermochimica Acta**, v. 397, p. 119–128, 21 fev. 2003.

GARCIA-GONZALEZ, L. et al. Sustainable autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) from CO₂ using a two-stage cultivation system. **Catalysis Today**, Biomass valorization into fuels, energy, materials and chemicals (UBIOCHEM-IV). v. 257, p. 237–245, 15 nov. 2015.

GHYSELS, S. et al. Targeted poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) bioplastic production from carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 858–868, 1 fev. 2018.

GOGOLEWSKI, S. et al. The effect of melt-processing on the degradation of selected

polyhydroxyacids: polylactides, polyhydroxybutyrate, and polyhydroxybutyrate-co-valerates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 40, n. 3, p. 313–322, 1 jan. 1993.

GONZÁLEZ-AUSEJO, J. et al. Effect of the addition of sepiolite on the morphology and properties of melt compounded PHBV/PLA blends. **Polymer Composites**, v. 40, n. S1, p. E156–E168, 1 jan. 2019.

GUPTA, P. et al. Preparation of *Thymus vulgaris* (L.) essential oil nanoemulsion and its chitosan encapsulation for controlling mosquito vectors. **Scientific Reports**, v. 12, p. 4335, 14 mar. 2022.

HAMICHE, S. et al. Eucalyptol-based green extraction of brown alga *Zonaria tournefortii*. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 10, p. 97–102, dez. 2018.

HAMID, A.; RISIKAT, A.; SURURAH, A. Food: Its preservatives, additives and applications. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, v. 1, p. 36–47, 1 jan. 2012.

HAN, J. H. et al. Retardation of *Listeria Monocytogenes* Growth in Mozzarella Cheese Using Antimicrobial Sachets Containing Rosemary Oil and Thyme Oil: Antimicrobial sachets of essential oils.... **Journal of Food Science**, v. 79, n. 11, p. E2272–E2278, nov. 2014.

HASHEMI, S. M. B.; MOUSAVI KHANEGHAH, A. Characterization of novel basil-seed gum active edible films and coatings containing oregano essential oil. **Progress in Organic Coatings**, v. 110, p. 35–41, set. 2017.

HEMALATHA, T. et al. Efficacy of chitosan films with basil essential oil: perspectives in food packaging. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 4, p. 2160–2170, dez. 2017.

HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, jun. 2013.

IGGUI, K. et al. A biodegradation study of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/organoclay nanocomposites in various environmental conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 119, p. 77–86, 1 set. 2015.

INOUYE, S. et al. Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 1, p. 33–41, 1 jan. 2003.

IŞIK, I. et al. Characterization and utilization of nodular sepiolite (meerschaum) from Eskisehir (Turkey). **Applied Clay Science**, v. 49, n. 1, p. 29–32, 1 jun. 2010.

JIS Z 2801:2000. Antimicrobial products e Test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Standards Association.

JOST, V.; LANGOWSKI, H.-C. Effect of different plasticisers on the mechanical and barrier properties of extruded cast PHBV films. **European Polymer Journal**, v. 68, p. 302–312, jul. 2015.

JOUSSEIN, E. et al. Halloysite clay minerals —a review. **Clay Minerals**, v. 40, n. 04, p. 383–426, dez. 2005.

KANEHASHI, S. et al. Analysis of permeability; solubility and diffusivity of carbon dioxide; oxygen; and nitrogen in crystalline and liquid crystalline polymers. **Journal of Membrane Science**, v. 365, n. 1, p. 40–51, 1 dez. 2010.

KARADAYI, M.; YILDIRIM, V.; GÜLLÜCE, M. Antimicrobial Activity and Other Biological Properties of Oregano Essential Oil and Carvacrol. **Anatolian Journal of Biology**, v. 1, n. 2, p. 52–68, 31 dez. 2020.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 197–203, 1 jan. 2006.

KHALAJ, M.-J. et al. Study of physical and mechanical properties of polypropylene nanocomposites for food packaging application: Nano-clay modified with iron nanoparticles. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p. 41–48, 1 maio 2016.

KLANGMUANG, P.; SOTHORNVIT, R. Barrier properties, mechanical properties and antimicrobial activity of hydroxypropyl methylcellulose-based nanocomposite films

incorporated with Thai essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 609–616, 1 dez. 2016.

KSOUDA, G. et al. Composition, antibacterial and antioxidant activities of Pimpinella saxifraga essential oil and application to cheese preservation as coating additive. **Food Chemistry**, v. 288, p. 47–56, 1 ago. 2019.

KUMAR, S. et al. Bionanocomposite films of agar incorporated with ZnO nanoparticles as an active packaging material for shelf life extension of green grape. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01867, 1 jun. 2019.

KYASA, S. K. Investigating Terpenoid Constituents in Commercial Essential Oils to Learn and Practice GC–MS and Literature Research Skills. **Journal of Chemical Education**, v. 97, n. 7, p. 1966–1969, 14 jul. 2020.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 81, p. 9, 2015.

LI, Y. et al. Direct green extraction of volatile aroma compounds using vegetable oils as solvents: Theoretical and experimental solubility study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 724–731, dez. 2014.

LI, Z.; LOH, X. J. Recent advances of using polyhydroxyalkanoate-based nanovehicles as therapeutic delivery carriers. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 3, p. n/a-n/a, 1 maio 2017.

LIGHTFOOT VIDAL, S. et al. Synthesis and characterization of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate nanoparticles for encapsulation of quercetin. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 31, n. 5, p. 439–452, 1 set. 2016.

LIU, Q.-S. et al. Reducing the formation of six-membered ring ester during thermal degradation of biodegradable PHBV to enhance its thermal stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 1, p. 18–24, 1 jan. 2009.

LOTFI, M. et al. Nanostructured chitosan/ monolaurin film: Preparation, characterization and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* on

ultrafiltered white cheese. **LWT**, v. 92, p. 576–583, jun. 2018.

LUO, S.; NETRAVALI, A. N. A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, n. 1, p. 59–66, 1 jan. 2003.

MAHCENE, Z. et al. Home-made cheese preservation using sodium alginate based on edible film incorporating essential oils. **Journal of Food Science and Technology**, 1 set. 2020.

MALMIR, S. et al. Morphology, thermal and barrier properties of biodegradable films of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) containing cellulose nanocrystals. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 93, p. 41–48, 1 fev. 2017.

MARTURANO, V. et al. Light-Responsive Nanocapsule-Coated Polymer Films for Antimicrobial Active Packaging. **Polymers**, v. 11, n. 1, p. 68, jan. 2019.

MAZUR, K. E. et al. Mechanical, thermal and hydrodegradation behavior of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) composites with agricultural fibers as reinforcing fillers. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 31, p. 390, 1 abr. 2022.

MEDINA-JARAMILLO, C. et al. Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 187–194, nov. 2017.

MEIRA, S. M. M. et al. A novel active packaging material based on starch-halloysite nanocomposites incorporating antimicrobial peptides. **Food Hydrocolloids**, v.63, p. 561–570, 1 fev. 2017.

MELLENDEZ-RODRIGUEZ, B. et al. Electrospun Antimicrobial Films of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Containing Eugenol Essential Oil Encapsulated in Mesoporous Silica Nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, p. 227, 2019.

MIHALY-COZMUTA, A. et al. Preparation and characterization of active cellulose-based papers modified with TiO₂, Ag and zeolite nanocomposites for bread

packaging application. **Cellulose**, v. 24, n. 9, p. 3911–3928, 1 set. 2017.

MOTELICA, L. et al. Innovative Antimicrobial Chitosan/ZnO/Ag NPs/Citronella Essential Oil Nanocomposite-Potential Coating for Grapes. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 12, 4 dez. 2020.

MOULA ALI, A. M.; SANT'ANA, A. S.; BAVISETTY, S. C. B. Sustainable preservation of cheese: Advanced technologies, physicochemical properties and sensory attributes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 129, p. 306–326, 1 nov. 2022.

MURESAN, A. et al. AROMATHERAPEUTIC CHARACTERISTICS OF COTTON FABRICS TREATED WITH ROSEMARY ESSENTIAL OIL. p. 8, [s.d.].

NARISHETTY, S. T. K.; PANCHAGNULA, R. Effect of l-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 1, p. 59–70, jan. 2005.

NGUYEN VAN LONG, N.; JOLY, C.; DANTIGNY, P. Active packaging with antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 73–90, mar. 2016.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. **Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food**, p. 89, 15 jan. 2011.

OTERO, V. et al. Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). **Food Control**, v. 42, p. 296–302, ago. 2014.

ÖNER, M.; İLHAN, B. Fabrication of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biocomposites with reinforcement by hydroxyapatite using extrusion processing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 65, p. 19–26, 1 ago. 2016.

OTONI, C. G. et al. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. **Food Research International**, v. 83, p. 60–73, maio 2016.

PATRÍCIO SILVA, A. L. et al. Increased plastic pollution due to COVID-19 pandemic:

Challenges and recommendations. **Chemical Engineering Journal**, v. 405, p. 126683, 1 fev. 2021.

PEREIRA, E. D. et al. Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. **Polímeros**, v. 26, n. 2, p. 137–143, jun. 2016.

PERSICO, P. et al. Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. **Polymer Engineering & Science**, v. 49, n. 7, p. 1447–1455, jul. 2009.

POLA, C. C. et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 9, p.69–78, set. 2016.

PUGGAL, S. et al. A Review on Polymer Nanocomposites: Synthesis, Characterization and Mechanical Prop. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 9, 4 jan. 2016.

QIU, X. et al. Polyimide/kaolinite composite films: Synthesis and characterization of mechanical, thermal and waterproof properties. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 4, p. 2021–2028, jul. 2014.

RADHESHKUMAR, C.; MÜNSTEDT, H. Antimicrobial polymers from polypropylene/silver composites—Ag⁺ release measured by anode stripping voltammetry. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, n. 7, p. 780–788, jul. 2006.

RADÜNZ, M. et al. Chemical composition and in vitro antioxidant and antihyperglycemic activities of clove, thyme, oregano, and sweet orange essential oils. **LWT**, v. 138, p. 110632, mar. 2021.

RAMOS, M. et al. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 513–519, 1 abr. 2012.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 1 dez. 2014.

REQUENA, R.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Release kinetics of carvacrol and eugenol from poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) films for food packaging applications. **European Polymer Journal**, v. 92, p. 185–193, 1 jul. 2017.

RHIM, J.-W.; PARK, H.-M.; HA, C.-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1629–1652, out. 2013.

ROBERTS, B. N. et al. *Listeria monocytogenes* Response to Anaerobic Environments. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 210, mar. 2020.

ROJAS-GRAÜ, M. A. et al. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 3, p. 634–641, 1 ago. 2007.

RUIPING, L.; CHUNYE, L.; XITAO, L. Adsorption of tungstate on kaolinite: adsorption models and kinetics. **RSC Advances**, v. 6, n. 24, p. 19872–19877, 2016.

RUIZ-HITZKY, E. et al. Fibrous clays based bionanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10, p. 1392–1414, 1 out. 2013.

SANCHEZ-GARCIA, M. D.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M. Morphology and barrier properties of solvent cast composites of thermoplastic biopolymers and purified cellulose fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 235–244, 24 jan. 2008.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 4, p. 240–244, 1 jun. 2000.

SENATOV, F. et al. Polyhydroxybutyrate/Hydroxyapatite Highly Porous Scaffold for Small Bone Defects Replacement in the Nonload-bearing Parts. **Journal of Bionic Engineering**, v. 14, n. 4, p. 648–658, 1 out. 2017.

SHAKIL, O.; MASOOD, F.; YASIN, T. Characterization of physical and biodegradation properties of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate/sepiolite nanocomposites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 173–183, 1 ago. 2017.

SHEMESH, R. et al. Novel LDPE/halloysite nanotube films with sustained carvacrol release for broad-spectrum antimicrobial activity. **RSC Advances**, v. 5, n. 106, p. 87108–87117, 2015.

SILVA, M. M.; LIDON, F. FOOD PRESERVATIVES – AN OVERVIEW ON APPLICATIONS AND SIDE EFFECTS. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 366–373, 7 jan. 2016.

SINGH, P. K.; SEN, A. K. S.; VIDYARTHI, A. S. DIVERSIFIED APPLICATIONS OF POLYHYDROXYALKANOATES. **BIOPHARM JOURNAL**, v. 2, n. 1, p. 14–26, 5 mar. 2017.

SIRACUSA, V. et al. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 12, p. 634–643, dez. 2008.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 695–702, 1 dez. 2016.

SOTELO-BOYÁS, M. E. et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 15–20, 1 abr. 2017.

SOUZA, V. G. L. et al. In vitro bioactivity of novel chitosan bionanocomposites incorporated with different essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111563, nov. 2019.

SOUZA, V. G. L. et al. Eco-Friendly ZnO/Chitosan Bionanocomposites Films for Packaging of Fresh Poultry Meat. **Coatings**, v. 10, n. 2, p. 110, fev. 2020.

STOILOVA, I. et al. Chemical Composition, Olfactory Evaluation and Antioxidant Effects of an Essential Oil of *Origanum Vulgare* L. from Bosnia. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 7, 1 jul. 2008.

SUN, J. et al. Nanocomposite coatings based on copper and the products of polyethylene destruction, features of their formation, structure and antibacterial

properties. **RSC Advances**, v. 6, n. 35, p. 29220–29228, 2016.

SZCZEPANIK, B. et al. The effect of chemical modification on the physico-chemical characteristics of halloysite: FTIR, XRF, and XRD studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1084, p. 16–22, mar. 2015.

TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, p. 103580, 1 set. 2019.

TAWAKKAL, I. S. M. A.; CRAN, M. J.; BIGGER, S. W. Release of thymol from poly(lactic acid) based antimicrobial films containing kenaf fibres as natural filler. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 629–637, 1 mar. 2016.

TORRES-GINER, S. et al. Melt processability, characterization, and antibacterial activity of compression-molded green composite sheets made of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) reinforced with coconut fibers impregnated with oregano essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, p. 39–49, set. 2018.

TRIAUX, Z. et al. Deep eutectic solvent–based headspace single-drop microextraction for the quantification of terpenes in spices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 4, p. 933–948, fev. 2020.

TSIRAKI, M. I.; SAVVAIDIS, I. N. Effect of Packaging and Basil Essential Oil on the Quality Characteristics of Whey Cheese “Anthotyros”. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 1, p. 124–132, 1 jan. 2013.

UZ, M.; ALTINKAYA, S. A. Development of mono and multilayer antimicrobial food packaging materials for controlled release of potassium sorbate. **LWT -Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2302–2309, 1 dez. 2011.

VERGARO, V.; LVOV, Y. M.; LEPORATTI, S. Halloysite clay nanotubes for resveratrol delivery to cancer cells. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 9, p. 1265–1271, set. 2012.

VILLANUEVA, M. E. et al. Antimicrobial surface functionalization of PVC by a guanidine based antimicrobial polymer. **Materials Science and Engineering: C**, v.

67, p. 214–220, out. 2016.

WANG, S. et al. Characteristics and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/organophilic montmorillonite (PHBV/OMMT) nanocomposite. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, n. 1, p. 69–76, 1 jan. 2005.

WANG, Y. et al. Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres. **Materials Letters**, v. 61, n. 4, p. 1071–1076, 1 fev. 2007.

WESTLAKE, J. R. et al. Biodegradable Active Packaging with Controlled Release: Principles, Progress, and Prospects. **ACS Food Science & Technology**, v. 2, n. 8, p. 1166–1183, 19 ago. 2022.

WU, Q. et al. Mechanical properties of nanomaterials: A review. **Nanotechnology Reviews**, v. 9, n. 1, p. 259–273, 1 jan. 2020.

XU, T. et al. Retention and release properties of cinnamon essential oil in antimicrobial films based on chitosan and gum arabic. **Food Hydrocolloids**, v. 84, p. 84–92, nov. 2018.

YANG, Z. et al. Host-guest complexes of estragole with β -cyclodextrin: an experimental and theoretical investigation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 32, n. 2, p. 102–111, 1 mar. 2017.

YENDLURI, R. et al. Application of halloysite clay nanotubes as a pharmaceutical excipient. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 521, n. 1, p. 267–273, 15 abr. 2017.

YONG, H.; LIU, J. Active packaging films and edible coatings based on polyphenol-rich propolis extract: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 2106–2145, 2021.

YU, H.-Y. et al. Reinforcement of transparent poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by incorporation of functionalized carbon nanotubes as a novel bionanocomposite for food packaging. **Composites Science and Technology**, v. 94,

p. 96–104, 9 abr. 2014.

YU, J. T.; BOUWER, E. J.; COELHAN, M. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. **Agricultural Water Management**, v. 86, n. 1–2, p. 72–80, nov. 2006.

ZABIHZADEH KHAJAVI, M. et al. Strategies for Producing Improved Oxygen Barrier Materials Appropriate for the Food Packaging Sector. **Food Engineering Reviews**, v. 12, n. 3, p. 346–363, 1 set. 2020.

ZHANG, Y. et al. Applications and interfaces of halloysite nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 119, p. 8–17, 1 jan. 2016.

ZHANG, Y. et al. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, set. 2010.

ZHU, P. et al. Solubility and solution thermodynamics of thymol in six pure organic solvents. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 92, p. 198–206, 1 jan. 2016.

ZYGOURA, P. D.; PALEOLOGOS, E. K.; KONTOMINAS, M. G. Changes in the specific migration characteristics of packaging–food simulant combinations caused by ionizing radiation: Effect of food simulant. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, n. 8, p. 902–910, ago. 2011.