

PAULA LORENA TEIXEIRA DE MOURA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME BIONANOCOMPÓSITO
ATIVO INCORPORADO COM ARGILA LAPONITA E NANOEMULSÃO DE ÓLEO
ESSENCIAL DE CARQUEJA (*Baccharis trimera*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M929d
2016
Moura, Paula Lorena Teixeira de, 1990-
Desenvolvimento e caracterização de filme
bionanocompósito ativo incorporado com argila laponita e
nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera*) /
Paula Lorena Teixeira de Moura. – Viçosa, MG, 2016.
ix, 47f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Embalagens.
3. Biopolímeros. 4. Essências e óleos essenciais. 5. Carqueja. 6.
Baccharis trimera. 7. Argila. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 664.09

PAULA LORENA TEIXEIRA DE MOURA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME BIONANOCOMPÓSITO
ATIVO INCORPORADO COM ARGILA LAPONITA E NANOEMULSÃO DE ÓLEO
ESSENCIAL DE CARQUEJA (*Baccharis trimera*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de agosto de 2016.

Washington Azevêdo da Silva
(Coorientador)

Nélio José de Andrade
(Coorientador)

Eber Antonio Alves Medeiros

Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre me proteger e iluminar meu caminho, me dando força e sabedoria.

Aos meus pais, Ernani e Tânia, pelo amor, incentivo, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Pedro e Barbara, pelo amor, paciência e amizade.

A toda minha maravilhosa família, Moura e Teixeira, pelo amor, carinho e incentivo.

Às minhas amigas de Viçosa e Sete Lagoas, por todo incentivo, paciência, amizade e apoio em todos os momentos.

Às amigas de república, minha segunda família, obrigada por todo o apoio, paciência, pela força que vocês me deram nesses anos, e também pelos inúmeros momentos de alegria, diversão, aprendizado, companheirismo e ensinamentos. Obrigada por tudo!

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização deste estudo.

À minha orientadora, Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade, orientação e confiança.

Aos meus coorientadores Washington Azêvedo da Silva e Nélio José de Andrade pela confiança, ensinamentos e incentivos.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira pela disponibilidade, atenção e ajuda na realização das análises.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação científica.

Aos colegas do LABEM, Eber, Miriane, Daniela, Michele, Johana, Adassa, Luciano, Taíla, Cicero, Allan e Mari pela convivência, amizade, bons momentos e ensinamentos valiosos.

Aos bolsistas e estagiários, Lais, Madê, Gabriel, Carol, Pedro, Lud, Quintão, Nelson, Ju e Rosi por toda a ajuda nas análises, ensinamentos, e os momentos de alegria e diversão.

Ao Fernando pela convivência, amizade e auxílio no laboratório.

Ao Luciano, pelos ensinamentos e grande ajuda na realização de análises.

À Miriane, Daniela e Mariana pela amizade, conselhos, companheirismo, ensinamentos, pela grande ajuda e por toda a paciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Paula Lorena Teixeira de Moura, filha de Tânia Mara Teixeira Moura e Ernani Santana de Moura, nasceu no dia 29 de outubro de 1990 na cidade de Sete Lagoas, Estado de Minas Gerais.

Em março de 2009, ingressou no curso de Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal de São João Del-Rei, graduando-se em Engenharia de Alimentos em 2013.

Em agosto de 2014, iniciou o curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, defendendo dissertação em agosto de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CARQUEJA (<i>Baccharis trimera</i>).....	3
RESUMO.....	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	8
4. CONCLUSÃO.....	12
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME ATIVO INCORPORADO COM ARGILA LAPONITA E NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CARQUEJA (<i>Baccharis trimera</i>).....	16
RESUMO.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4. CONCLUSÃO.....	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS	47

RESUMO

MOURA, Paula Lorena Teixeira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **Desenvolvimento e caracterização de filme bionanocompósito ativo incorporado com argila laponita e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera*)**. Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: Washington Azevêdo da Silva e Nélio José de Andrade.

Os plásticos derivados de petróleo representam um grande problema ambiental, devido à sua dificuldade de biodegradabilidade. Uma alternativa aos polímeros sintéticos é o uso de biopolímeros biodegradáveis, que são de fontes naturais, renováveis e de baixo custo. Os biopolímeros ainda têm seu uso limitado, devido às baixas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira. O uso dos nanocompósitos pode melhorar as propriedades dos filmes biodegradáveis. Atualmente, há um grande interesse pelos consumidores por alimentos mais saudáveis, seguros e livres de conservantes sintéticos. As nanoemulsões de óleos essenciais vêm conferindo maiores propriedades antimicrobianas aos óleos essenciais, sendo utilizadas para a produção de embalagens ativas, com o objetivo de estender a vida de prateleira e inibir a multiplicação ou eliminar micro-organismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos. Neste trabalho, foi desenvolvida uma embalagem ativa de hidroxipropilmetilcelulose, nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (OE) e argila laponita (LAP). Na primeira etapa, foi produzida a nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e caracterizada quanto à sua estabilidade físico-química. Avaliou-se o tamanho e a estabilidade da nanoemulsão durante sete dias de armazenamento, através das análises macroscópica, estresse térmico, diâmetro médio da gotícula, potencial zeta, índice de polidispersão e pH. A nanoemulsão apresentou-se estável sem a ocorrência de separação de fases, ou processos de instabilidade durante os sete dias de armazenamento. Na segunda etapa, avaliou-se a atividade antibacteriana do óleo essencial de carqueja sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Escherichia coli* (ATCC 11229), determinando sua concentração mínima inibitória. Posteriormente, os filmes foram desenvolvidos e avaliados por meio de análise da atividade antimicrobiana *in vitro*, espessura, propriedades mecânicas, microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilometria óptica, taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA), e análise termogravimétrica (TGA). O óleo essencial apresentou atividade antibacteriana sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com concentração mínima inibitória de 1% (m/v).

Quando avaliada a atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes, observou-se halo de inibição apenas para Gram-positiva (*S. aureus*). A espessura dos filmes não foi influenciada pela adição de LAP e OE. Quanto às propriedades mecânicas dos filmes, a resistência à tração e módulo de elasticidade foram influenciados apenas pela adição de OE. Já o alongamento na ruptura não foi afetado pela adição de OE e LAP. As análises de microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica revelaram a formação de gotículas de óleo essencial, fissuras e poros na superfície dos filmes. Os valores de TPVA diminuíram quando a concentração de OE e LAP foi aumentada. O OE e LAP não influenciaram na estabilidade térmica dos filmes. Resultados sugerem que o filme de hidroxipropilmetilcelulose incorporado com nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e argila laponita pode ser utilizado como embalagem ativa para aumentar a segurança e vida de prateleira dos alimentos.

ABSTRACT

MOURA, Paula Lorena Teixeira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2016. **Development and characterization of bionanocomposite active films with laponite clay and nanoemulsion of carqueja (*Baccharis trimera*) essential oil.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-advisers: Washington Azevêdo da Silva and Nélio José de Andrade.

Petroleum-based plastics are a major environmental problem because of their difficult degradability. An alternative to synthetic polymers is the use of biodegradable biopolymers, which are from natural sources, renewable and low cost. Biopolymers still have limited use due to the low mechanical, thermal and barrier properties. The use of nanocomposites can improve the properties of biodegradable films. Currently, there is a big interest by consumers for healthy foods, safe and free of synthetic additives. Nanoemulsions of essential oils provide major antimicrobial properties to essential oils, being used for the production of active packaging, aiming to extend the shelf life and inhibit the multiplication or eliminate pathogenic and spoilage microorganisms in food. In this work an active packaging was developed incorporated with nanoemulsion of carqueja essential oil (OE) and laponite clay (LAP). In the first stage, the nanoemulsions of carqueja essential oil were characterized as to their physical and chemical stability. The size and stability of the nanoemulsion were evaluated during seven days of storage through macroscopic analysis, thermal stress, average droplet diameter, zeta potential, polydispersity index and pH. The nanoemulsion was stable without the occurrence of phase separation, or instability processes during the seven days of storage. In the second stage, the antibacterial activity of carqueja essential oil on *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) and *Escherichia coli* (ATCC 11229) was evaluated, determining its minimum inhibitory concentration. The films were developed and characterized by *in vitro* antimicrobial activity, thickness, mechanical properties, scanning electron microscopy (SEM), optical profilometry, water transmission rate (WVTR) and thermal gravimetric analysis (TGA). The carqueja essential oil showed antibacterial activity of against *S. aureus* and *P. aeruginosa* with minimal inhibitory concentration of 1% (w/v). When evaluated *in vitro* antimicrobial activity of the films was observed zones of inhibition only for Gram-positive (*S. aureus*). The thickness of the films was not influenced by the addition of LAP and OE. The mechanical properties were influenced by addition of OE. The

SEM analysis and optical profilometry revealed the formation of essential oil droplets, fissures and pores on the surface of the films. The WVTR values decreased when increased the concentration of OE and LAP. The OE and LAP did not influence the thermal stability of the films. Results suggest that the hydroxypropyl methylcellulose film incorporated with nanoemulsions carqueja essential oil and laponite clay can be used as active packaging to increase the safety and shelf life of food.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, os consumidores estão cada vez mais optando por alimentos saudáveis, seguros, próximo ao natural e livre de conservantes sintéticos (SEVERINO *et al.*, 2015). A incorporação de agentes antimicrobianos naturais nas embalagens como óleo essencial, pode ser uma alternativa ao uso de aditivos sintéticos nos alimentos, pois além de inibir a multiplicação ou eliminar microorganismos patogênicos e deteriorantes, muitos óleos essenciais têm efeito antioxidante (TEIXEIRA *et al.*, 2013; SHANKAR *et al.*, 2014).

A crescente preocupação com os problemas ambientais principalmente devido ao acúmulo de resíduos plásticos provenientes de embalagens plásticas sintéticas tem impulsionado novas pesquisas na busca de materiais que sejam de fontes naturais, renováveis e biodegradáveis. Neste contexto, desencadeou-se um interesse no desenvolvimento de embalagens plásticas a partir de materiais biodegradáveis e renováveis. No entanto, o seu uso ainda é limitado, pois geralmente embalagens à base de biopolímeros são frágeis, quebradiças e apresentam baixas propriedades mecânicas, de barreira e térmicas. Assim, é necessário a incorporação de materiais que melhorem as propriedades desses filmes.

Uma das alternativas para melhorar as propriedades dos materiais é o uso da nanotecnologia. Na área de embalagens, a nanotecnologia pode ser aplicada na produção de nanocompósitos cujo objetivo é melhorar as propriedades mecânicas, de barreira e térmicas de embalagens biodegradáveis. A laponita é um tipo de argila sintética, não tóxica e biodegradável que vem sendo utilizada como reforço em embalagens (GAHARWAR *et al.*, 2011). A nanotecnologia também pode ser aplicada na produção de nanoemulsões com óleos essenciais para o desenvolvimento de embalagem ativa antimicrobiana, potencializando o efeito antimicrobiano dos óleos (MONTES *et al.*, 2013; OTONI *et al.*, 2014).

Considerando que os estudos a respeito dos efeitos antimicrobianos do óleo essencial de carqueja e das propriedades de reforço da argila laponita em embalagens ativas para alimentos ainda estão se iniciando, objetivou-se com este trabalho desenvolver uma embalagem ativa antimicrobiana biodegradável incorporada com nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e argila laponita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GAHARWAR, A. K. *et al.* Assessment of using Laponite ® cross-linked poly (ethylene oxide) for controlled cell adhesion and mineralization. **Acta Biomater**, v.7, p. 568-577, 2011.

MONTES, S. S.; NETA, L. G. S.; CRUZ, R. S. Óleos essenciais em embalagens para alimentos – Revisão de literatura de 2000 a 2012. **Revista Eletrônica da Ciência e Tecnologia**, v.5, n.1-2, p.1, 2013.

OTONI, C. G. *et al.* Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v.41, p. 188-194, 2014.

SEVERINO, R. *et al.* Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on green beans. **Food Control**, v.50, p. 215-222, 2015.

SHANKAR, J.; SANKUNNY, R.; KARUPPAYIL, M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

TEIXEIRA, B. *et al.* Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.43, p. 587-595, 2013.

Capítulo 1

ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CARQUEJA (*Baccharis trimera*)

RESUMO

Os óleos essenciais representam um possível ingrediente para substituição de conservantes sintéticos por apresentarem propriedades antimicrobianas contra patógenos presentes em alimentos. A nanotecnologia apresenta várias potencialidades de aplicação, dentre elas o uso de nanoemulsões para o desenvolvimento de embalagens ativas. Objetivou-se com o presente estudo desenvolver nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera*) e avaliar o tamanho e a estabilidade da nanoemulsão durante sete dias de armazenamento a 25 °C. A nanoemulsão de óleo essencial de carqueja na concentração de 5% (m/v) foram produzidas pelo método de alta energia de emulsificação em homogeneizador na velocidade de 20.000 rpm durante 5 minutos. A estabilidade físico-química da nanoemulsão foi avaliada por análise macroscópica, estresse térmico, diâmetro médio da gotícula, potencial zeta, índice de polidispersão e pH. Os resultados demonstram que a nanoemulsão apresentou-se estável sem a ocorrência de separação de fases, ou processos de instabilidade. O diâmetro das gotículas variou de 169 a 191 nm durante sete dias de armazenamento.

Palavras-chave: nanoemulsão, carqueja, antimicrobiano.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais vêm sendo utilizados em diversos setores industriais, dentre eles nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. No entanto, a incorporação direta dos óleos essenciais em alimentos ainda encontra certas limitações tecnológicas relacionadas com a natureza hidrofóbica, reativa e instável das moléculas bioativas que constituem os óleos essenciais o que dificulta a sua dispersão em produtos à base de água (DONSI *et al.*, 2012; DONSI e FERRARI, 2016). Assim, nanoemulsões estão sendo cada vez mais utilizadas para encapsular, proteger os ingredientes lipofílicos em alimentos (ACEVEDO-FANI *et al.*, 2015; BHARGAVA *et al.*, 2015).

Nanoemulsão consiste em um líquido imiscível disperso numa fase aquosa, utilizando um tensoativo adequado na interface óleo/água, cujo tamanho das gotículas estão em torno de 20 – 200 nm (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; SAGALOWICZ e LESER, 2010; OTONI *et al.*, 2014). A principal particularidade das nanoemulsões é a pequena dimensão da gotícula e da sua alta estabilidade contra a sedimentação, em comparação com emulsões convencionais, podendo melhorar a capacidade da atividade biológica de compostos lipofílicos (SOLANS *et al.*, 2005; ANTON *et al.*, 2008; McCLEMENTS e RAO, 2011; SOLANS e SOLÉ, 2012).

Para a formação de uma nanoemulsão, pode-se utilizar alta ou baixa energia de emulsificação. No processo de alta energia pode ser realizado por meio de dispositivos mecânicos, como os homogeneizadores de alta pressão e geradores de ultrassom, e os de baixa energia, a partir do potencial químico dos componentes (TADROS *et al.*, 2004; SOLANS e SOLÉ, 2012; ASSIS *et al.*, 2012).

As nanoemulsões com gotículas de óleos essenciais também podem ser utilizadas em embalagens ativas antimicrobianas, pois o óleo essencial em tamanho nanométrico confere maior efeito antimicrobiano quando comparado à utilização do óleo essencial diretamente nas embalagens (WEISS *et al.*, 2009; PONTES, 2013).

A incorporação de óleo essencial em polímeros que são solúveis em água como metilcelulose (MC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é dificultada devido à sua característica de hidrofobicidade. Nesse sentido, a utilização de nanoemulsões de óleos essenciais nestes polímeros pode ser uma alternativa promissora devido a sua melhor solubilidade em água quando encapsulado (PONTES, 2013).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho desenvolver nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera*) e caracterizar quanto à sua estabilidade físico-química durante sete dias de armazenamento, para posteriormente incorporar a nanoemulsão no filme de hidroxipropilmetilcelulose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Para o preparo da nanoemulsão do tipo óleo em água, utilizou-se como fase aquosa água desionizada e como fase oleosa, o óleo essencial de carqueja adquirido da Quinari[®] (Brasil). O tensoativo utilizado foi o Polissorbato 20 (Tween 20) (INLAB[®]).

2.2 Delineamento Experimental

Para as análises, diâmetro médio das gotículas, potencial zeta, índice de polidispersão e pH da nanoemulsão utilizou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com três repetições. A avaliação do estresse térmico e da estabilidade da nanoemulsão durante o armazenamento foi realizada por meio da análise descritiva. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, Brasil.

2.3 Preparo da nanoemulsão de óleo essencial

A nanoemulsão foi produzida de acordo com a metodologia de Otoni e colaboradores (2014) com modificações. A concentração de óleo essencial estabelecida para a produção da nanoemulsão foi de 5% (m/v). Adicionou-se 0,75% (m/v) do surfactante Tween 20 em 150 mL de água desionizada e homogeneizou-se com bastão de vidro até completa homogeneização dos constituintes da emulsão. Posteriormente, foi submetida ao método de alta energia de emulsificação utilizando um homogeneizador (ULTRA-TURRAX IKA[®] T25 digital) na velocidade de 20.000 rpm durante 5 min para redução do tamanho das gotículas.

2.4 Avaliação da estabilidade da nanoemulsão de óleo essencial de carqueja

A nanoemulsão de óleo essencial foi armazenada em béqueres em temperatura ambiente (25 °C), e avaliadas por análises macroscópicas (visuais), onde observou-se a homogeneidade com o objetivo de identificar possíveis processos de instabilidade, como a separação de fases. Na avaliação do estresse

térmico, amostras da nanoemulsão foram submetidas ao aquecimento em banho termostático (modelo 550, FISATOM) com temperatura inicial de 45 °C. A cada 30 min a temperatura foi elevada de 5 °C até alcançar a temperatura final de 85 °C, avaliando visualmente as amostras até a temperatura final. As amostras foram avaliadas macroscopicamente (visualmente), conforme metodologia descrita por PONTES (2013). Estas avaliações foram realizadas imediatamente após o preparo da nanoemulsão até o sétimo dia de armazenamento.

2.5 Diâmetro médio das gotículas, potencial zeta (ζ) e índice de polidispersão (PDI) da nanoemulsão

A nanoemulsão de óleo essencial foi diluída em água desionizada conforme procedimento descrito por Blanco (2011) e analisada quanto ao tamanho médio da gotícula, distribuição de tamanho, medida de potencial elétrico superficial (potencial zeta) e índice de polidispersão com auxílio de um Zetasizer Malvern NanoZS. As análises foram realizadas a temperatura ambiente de 25 °C, utilizando ângulo de detecção de 173° operando em comprimento de onda de 633 nm.

2.6 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Para medição do pH, 5 mL das amostras da nanoemulsão de óleo essencial de carqueja preparadas com as concentrações de 5% (m/v) de óleo essencial e 0,75% (m/v) de Tween 20 foram colocadas em um béquer. O sistema foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. As amostras foram analisadas à temperatura ambiente (25 °C), com imersão direta do eletrodo na amostra. Não foi necessária a diluição prévia, devido à fluidez da nanoemulsão (BRASIL, 2004).

2.7 Análise Estatística

Os dados das análises do diâmetro médio das gotículas, potencial zeta, índice de polidispersão e pH da nanoemulsão foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em nível de 5% de significância, e quando necessário utilizou-se análise de Regressão em nível de 5% e teste *t* de *Student* utilizando o programa MINITAB versão 17.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da estabilidade da nanoemulsão de óleo essencial de carqueja

A nanoemulsão de óleo essencial de carqueja apresentou estabilidade macroscópica (visual), não ocorrendo separação de fases durante os sete dias de armazenamento, apresentando aparência leitosa e esbranquiçada (Figura 1). Resultados similares também foram relatados por Seibert (2015), no qual as nanoemulsões de óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*, encontraram-se com aspecto branco leitoso, sem separação de fases ou sinais de instabilidade.

A estabilidade dessa nanoemulsão pode estar relacionada com a sua estabilização ésterica, principalmente quando se utilizam tensoativos não-iônicos (TADROS, 2004). Devido ao pequeno tamanho das gotículas, as nanoemulsões tornam-se resistentes a instabilidade física por cremação, sedimentação, floculação ou coalescência (GUIMERO, 2012).

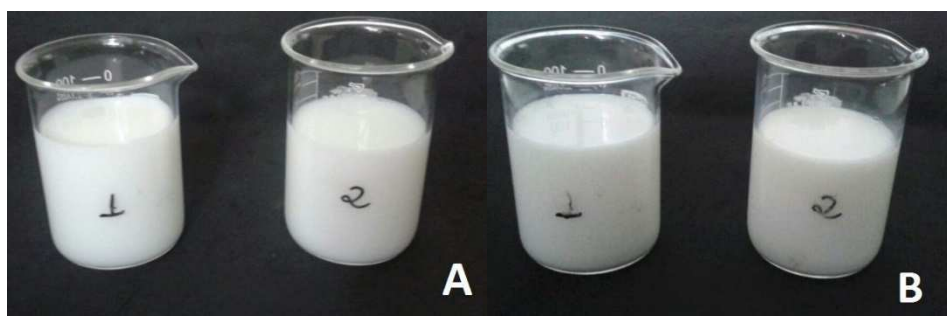


Figura 1. Nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (5 % m/v) no primeiro (A) e no sétimo dia de armazenamento a 25 °C (B).

Quando submetida ao estresse térmico, a nanoemulsão exibiu a mesma aparência obtida após o preparo, sem a ocorrência de separação de fases a 85 °C (Figura 2). Essa se apresentou estável, sem sinais de instabilidade macroscópica e resistente às condições de estresse térmico. Assim, esses resultados sugerem que a nanoemulsão pode ser utilizada para a produção de filmes que são submetidos ao aquecimento, sem que ocorra separação de fase.



Figura 2. Nanoemulsão de óleo essencial de carqueja antes do estresse térmico (A) e após o estresse térmico (B).

3.2 Diâmetro médio das gotículas e potencial zeta (ζ) da nanoemulsão

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no diâmetro médio das gotículas em função do tempo, ocorrendo aumento do diâmetro durante o tempo de armazenamento (Figuras 3 e 4).

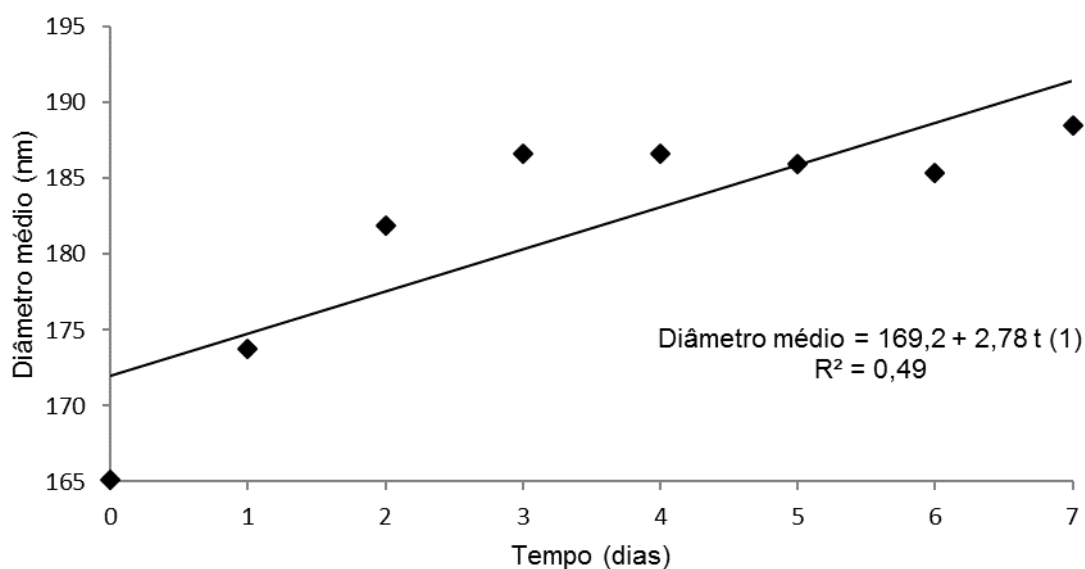


Figura 3. Variação do diâmetro médio das gotículas da nanoemulsão de óleo essencial de carqueja em função do tempo de armazenamento.

Foi possível observar uma relação linear e positiva entre o diâmetro das gotículas e o tempo de armazenamento (Figura 3). Para cada dia de armazenamento, ocorreu aumento de 2,78 nm no diâmetro da gotícula, variando de 169,2 nm a 191,4 nm após sete dias de armazenamento.

Esse aumento da gotícula ao longo do tempo pode ter ocorrido devido ao fenômeno denominado maturação de Ostwald, no qual às gotículas de óleo menores difundem-se através da fase contínua e se depositam em uma gotícula maior,

provocando um aumento da dimensão média das gotículas (TERJUNG *et al.* 2012; SEIBERT, 2015).

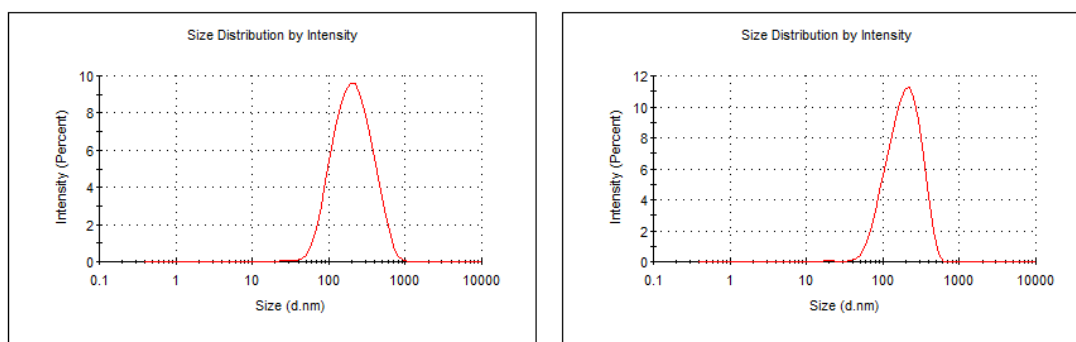


Figura 4. Distribuição do diâmetro de gotículas das nanoemulsões no primeiro dia e após sete dias respectivamente.

O aumento do diâmetro das gotículas também foi observado por Su e Zhong (2016) que estudaram a estabilidade de nanoemulsões de limão com caseinato de sódio e Tween 20 durante 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente (25 °C). Os autores verificaram que o diâmetro da gotícula aumentou significativamente de $98,37 \pm 18,46$ nm para $124,34 \pm 2,29$ nm após o armazenamento.

Donsi *et al.* (2011) produziram nanoemulsões de D-limoneno com tensoativo Tween 20 e mono-oleato de glicerol, utilizando homogeneização de alta pressão. Eles obtiveram um diâmetro médio das gotículas de $154,6 \pm 1,4$ nm.

O índice de polidispersão (PDI) indica como o tamanho da partícula está distribuído (OTONI *et al.*, 2014). A nanoemulsão de óleo essencial de carqueja apresentou valor médio de PDI de $0,3 \pm 0,02$ não ocorrendo variação desse valor ($p > 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento. Segundo Nemen e Lemos-Senna (2011) valores menores que 0,3 indicam homogeneidade da distribuição dos tamanhos (sistema monodisperso). O índice de polidispersão apresentou-se baixo, indicando uma estreita distribuição dos tamanhos das gotículas (distribuição monomodal), mais uniformes (homogêneos), portanto apresentando maior estabilidade. A redução do tamanho da gotícula e PDI poder melhorar ou afetar propriedades das nanoemulsões, como a estabilidade, cor, viscosidade, formação de creme, dentre outras (QIAN e McCLEMENTS, 2011).

OTONI *et al.* (2014) encontraram valores de PDI semelhante, em torno 0,20 a 0,30 para nanoemulsões de cinamaldeído, que demonstra padrão de distribuição de tamanho estreito.

Avaliando o potencial zeta da nanoemulsão, verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de potencial zeta da nanoemulsão durante o tempo de armazenamento. O valor médio da carga elétrica foi de $-13,78 \pm 0,74$ mV após sete dias. O potencial zeta caracteriza a carga de superfície das partículas da nanoemulsão (SARI *et al.*, 2015; CHEONG *et al.*, 2016), sendo uma medida das forças de repulsão entre as partículas. Se o valor absoluto do potencial zeta da partícula for inferior a 30 mV, a nanoemulsão exibirá uma estabilidade fraca com tendência a aglomeração ou floculação. E se os valores absolutos forem superiores a 30 mV a nanoemulsão tenderá a ser estável devido à repulsão eletrostática (HEURTAULT *et al.*, 2003). Apesar da carga superficial da nanoemulsão estar abaixo de 30 mV, o pequeno tamanho das gotículas apresentado foi suficiente para evitar fenômenos de instabilidade ao longo do tempo de armazenamento, o que pode ser confirmado na análise de estabilidade da nanoemulsão.

Outro fator que pode ter contribuído para maior estabilidade das nanoemulsão é o uso de tensoativos não-iônicos como o Tween 20, que reduzem a tensão interfacial, conferindo estabilização estérica entre os glóbulos, reduzindo a possibilidade de agregação e de coalescência, evitando assim processos de instabilidade (TADROS *et al.*, 2004).

Guerra-Rosas *et al.* (2016) avaliaram o potencial zeta de nanoemulsões de pectina de alta metoxilação com diferentes óleos essenciais ao longo do tempo de armazenamento. Os autores verificaram que os valores de potencial zeta encontrados foram inferiores a 30 mV, apresentando valor médio de $-15,20 \pm 1,60$ e $-14,40 \pm 0,57$ mV para óleo de mandarin e capim-limão, respectivamente. Apesar disso, as nanoemulsões mantiveram-se constantes, sem apresentar instabilidade durante o tempo de armazenamento.

Cheong *et al.* (2016) encontraram valores de potencial zeta de $-16,7$ mV para a amostra de nanoemulsão de óleo essencial de kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) com emulsificante goma arábica. Porém, os autores observaram que a baixa repulsão eletrostática entre as gotículas resultou na instabilidade da nanoemulsão, ocorrendo floculação e cremação após uma semana de armazenamento à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

A nanoemulsão de óleo essencial de carqueja apresentou valor médio do pH de $3,51 \pm 0,16$ não ocorrendo variações ($p > 0,05$) com o tempo de armazenamento. Resultados similares foram encontrados por Seibert (2015) que ao produzir nanoemulsão de óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*, obteve pH próximo de 3,0.

Nanoemulsões são física e quimicamente mais estáveis em pH de 6,5 a 8,0 (FRONZA *et al.*, 2004), assim, baixos valores de pH sugerem diminuição da estabilidade das nanoemulsões (MARUNO, 2009). Apesar do valor do pH da nanoemulsão ter sido baixo, esta permaneceu estável sem a ocorrência de separação de fases durante todo o período de armazenamento. Isto sugere que uma degradação química dos componentes como a liberação de ácidos carboxílicos tanto da fase oleosa como do conjunto de tensoativos, deve ter ocorrido, pois ambos são compostos de ácidos graxos (MARUNO, 2009).

Nanoemulsões formuladas por Maruno (2009) com óleo de gergelim e framboesa, apresentaram uma redução progressiva do pH para menos que 4,0 devido a degradação química dos componentes como a liberação de ácidos carboxílicos da fase oleosa e tensoativos.

4. CONCLUSÃO

Foi possível produzir nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (5% m/v) estável, apresentando aparência leitosa, sem separação de fases ou sinais de instabilidade.

O diâmetro médio das gotículas aumentou ao longo do tempo, porém o pequeno tamanho das gotículas foi suficiente para evitar os fenômenos de instabilidade. Os valores de potencial zeta e pH não apresentaram variações ao longo do tempo de armazenamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO-FANI, A. *et al.* Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v.47, p.168-177. 2015.

ANTON, N.; BONOIT, J-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. **Journal of Controlled Release**, v.128, p.185-199. 2008.

ASSIS, L. M. de. *et al.* Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.15, n.2, p.99-109. 2012.

BHARGAVA, K. *et al.* Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, v.47, p.69-73. 2015.

BLANCO, M. A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico ah plus™**. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de pós-graduação e pesquisa de engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília. 2004.

CHEONG, A. M. *et al.* Improvement of physical stability properties of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil-in-water nanoemulsion. **Industrial Crops and Products**. v.80, p.77-85. 2016.

DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v.159, p.342-350. 2012.

DONSÍ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **Food Science and Technology**, v.44, p.1908–1914. 2011.

DONSI, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v.233, p.106-120. 2016.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistema de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.23, n.4, p.558-566. 2004.

GUERRA-ROSAS, M. I. *et al.* Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v.52, p.438-446. 2016.

GUMIERO, V. C. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões à base de óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*) e extratos vegetais (*Areca catechu*, *Glycyrrhiza glabra* e *Portulaca oleracea*) para uso pós-sol**. 2011. 164p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.13, p.245-251. 2008.

HEURTAULT, B. *et al.* Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v.24, n.23, p.4283-4300. 2003.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras de pele**. 2009. 166p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

McCLEMENTS, D.J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, p.285-330. 2011.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v.34, n.3, p.408-413. 2011.

OTONI, C, G. *et al.* Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya/puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v.41, p.188-194. 2014.

PONTES, S. F. O. **Desenvolvimento de nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas em filme de metilcelulose para uso em alimentos**. 2013. 112 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

QIAN, C.; McCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, v.25 (5), p.1000-1008. 2011.

SAGALOWICZ, L.; LESER, M.E. Delivery systems for liquid food products. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.15, p.61-72. 2010.

SARI, T. P. *et al.* Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. **Food Hydrocolloids**, v.43, p.540-546, 2015.

SEIBERT, J. B. **Desenvolvimento de nanoemulsão a partir de óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: avaliação da sazonalidade e atividades biológicas**. 2015. 83p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.10, p.105-110. 2005.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, n.17, p. 246-254. 2012.

SU, D.; ZHONG, Q. Lemon oil nanoemulsions fabricated with sodium caseinate and Tween 20 using phase inversion temperature method. **Journal of Food Engineering**, v.171, p.214-221. 2016.

TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108, p. 303-318. 2004.

TERJUNG, N. *et al.* Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. **Food Function**, v.3, p. 290-301. 2012.

WEISS, J. *et al.* Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. In: Barbosa-Cánovas, G.V., Mortimer, A., Lineback, D., Spiess, W., Buckle, K. (Eds.), **IUFoST World Congress Book: Global Issues in Food Science and Technology**. Elsevier Inc., Amsterdam. 2009.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME ATIVO INCORPORADO COM ARGILA LAPONITA E NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CARQUEJA (*Baccharis trimera*)

RESUMO

A utilização de substâncias naturais, como os óleos essenciais e de nanomateriais são alternativas interessantes para preservação de alimentos e melhoria das características físicas das embalagens. Diante disso, foram estudados os efeitos da argila laponita (LAP) e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (OE) sobre as propriedades térmicas, de barreira, mecânicas e microscópicas de filme de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) produzido pelo método *casting*. Avaliou-se também a atividade antimicrobiana do óleo essencial de carqueja (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 % m/v) e dos filmes com nanoemulsão de óleo essencial “*in vitro*” sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, pela formação de halos de inibição. Observou-se que houve atividade antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* e *S. aureus*, apresentando efeito antibacteriano a partir de 1% (m/v), e não foi observado efeito sobre *E. coli*. Ao avaliar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” dos filmes observou-se que ocorreu inibição apenas para a bactéria *S. aureus*. A espessura dos filmes não foi influenciada pela adição de LAP e OE. Quanto às propriedades mecânicas, a resistência à tração e o módulo de elasticidade diminuíram com adição de OE. O alongamento na ruptura não foi influenciado pela adição de LAP e OE. A taxa de permeabilidade ao vapor d’água diminuiu nos tratamentos com maiores concentrações de LAP e OE. As imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura e da perfilometria óptica dos filmes revelaram estruturas heterogêneas com presença de gotículas da nanoemulsão, fissuras e poros nos filmes. A LAP e o OE nas concentrações estudadas não influenciaram na decomposição térmica do filme de HPMC. Os resultados demonstram que a incorporação de nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e argila laponita influenciou nas propriedades dos filmes de HPMC podendo ser utilizado com embalagem ativa para manter a qualidade e prolongar a vida de prateleira dos alimentos.

Palavras-chave: hidroxipropilmetilcelulose, laponita, carqueja.

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos houve uma crescente demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis e seguros, principalmente quando o assunto é a utilização de conservantes sintéticos em alimentos, muitos preferem alimentos naturais e livres de aditivos químicos (PONTES, 2013; SEVERINO *et al.*, 2015). Conseqüentemente há um grande interesse em antimicrobianos naturais por parte da indústria, como alternativa aos antimicrobianos sintéticos convencionais para aumentar a vida de prateleira e inibir a multiplicação ou eliminar micro-organismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos (CALO *et al.*, 2015).

Dentre os aditivos naturais, os óleos essenciais (OE) têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos, podendo atuar como aromatizantes e aditivos alimentares por possuírem efeito antioxidante e antimicrobiano (DIAS, 2011; SILVA *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2013). No entanto, a incorporação direta dos óleos essenciais em alimentos ainda encontra certas limitações tecnológicas relacionadas com a natureza hidrofóbica, reativa e instável das moléculas bioativas que constituem os óleos essenciais, além dos efeitos sobre características sensoriais (DONSI *et al.*, 2012).

A formação de nanoemulsões com gotículas de óleos essenciais podem potencializar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, além de melhorar sua estabilidade (McCLEMENTS e RAO, 2011; SOLANS e SOLÉ, 2012) podendo ser utilizadas em embalagens antimicrobianas, pois o nanoencapsulamento dos compostos bioativos confere maior efeito antimicrobiano quando comparado à utilização do óleo essencial diretamente nas embalagens (WEISS *et al.*, 2009; PONTES, 2013).

Estudos revelam que o óleo essencial de carqueja apresenta atividade antibacteriana, antiesquistossomida e antioxidante (AVANCINI *et al.*, 2000; SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2012; KARAM *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2014). A carqueja é utilizada na medicina popular para o controle ou tratamento de várias doenças (VERDI *et al.*, 2005). As folhas são consumidas na forma de chás, com indicação para problemas no trato gastrointestinal, fígado, doenças renais, verminoses, antiprotozoários, inflamações, anemia, além disso, tem outros efeitos biológicos como antioxidante e anti-inflamatória (VERDI *et al.*, 2005; BORELLA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2011; KARAM *et al.*, 2013).

Associado à preocupação com a qualidade dos alimentos, tem-se também preocupado com os problemas e impactos ambientais gerados por materiais de embalagens plásticas sintéticas, desencadeando um interesse no desenvolvimento de filmes comestíveis e biodegradáveis para aumentar a vida de prateleira, e ao mesmo tempo diminuir os resíduos de embalagens (THARANATHAN, 2003; SORRENTINO *et al.*, 2007; AZEREDO, 2009; DUNCAN, 2011; RHIM e KIM, 2014; ANMANI e RHIM, 2014). Dentre os polissacarídeos mais estudados estão os derivados hidrossolúveis de celulose, como a metilcelulose e a hidroxipropilmetilcelulose (PASTOR *et al.*, 2011), que têm grande potencial de aplicação em diversas áreas devido a sua biodegradabilidade, solubilidade em água e capacidade de formação de filmes (TOSATI, 2013). O uso de polímeros biodegradáveis ainda é limitado devido a problemas relacionados ao seu desempenho e processamento (LOPES *et al.*, 2014), os quais podem ser melhorados por meio da adição de materiais de reforços formando os nanocompósitos (AZEREDO, 2009).

Os nanocompósitos poliméricos exibem elevadas propriedades de barreira a gases e vapor de água, aumento da resistência mecânica e melhor resistência ao calor em comparação com seus polímeros puros e compósitos convencionais (SORRENTINO *et al.*, 2007; SILVESTRE *et al.*, 2011; RHIM *et al.*, 2013; MIHINDUKULASURIYA e LIM, 2014; KOTAL e BHOWMICK, 2015). Estes vêm sendo considerados uma alternativa promissora, pois melhoram as propriedades dos filmes à base de biopolímeros (SORRENTINO *et al.*, 2007; RHIM e KIM, 2014).

Diversos são os materiais pesquisados para a produção de nanocompósitos, dentre eles a laponita, que é uma argila sintética do grupo das esmectitas obtida a partir da purificação de diatomitas (PEROTTI *et al.*, 2011; PEROTTI *et al.*, 2014; KOTAL e BHOWMICK, 2015). As principais características desta argila são sua alta pureza, dispersão incolor, produção de géis claros, dispersa rapidamente em água, não é afetada pela alta temperatura, não tóxica, biodegradável e de baixo custo (BKY, 2014; LI *et al.*, 2015).

Assim, objetivou-se com este trabalho desenvolver e caracterizar o filme a base de hidroxipropilmetilcelulose produzido pelo método *casting* e avaliar o efeito da adição da argila laponita e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja quanto às propriedades antimicrobianas, mecânicas, térmicas e de barreira dos filmes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes, utilizou-se estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Escherichia coli* (ATCC 11229); disponíveis no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa. Para solubilização do óleo essencial utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO), adquirido da Labsynth[®].

Para o preparo da nanoemulsão do tipo óleo em água, utilizou-se como fase aquosa, água desionizada e como fase oleosa, o óleo essencial de carqueja adquirido da Quinari[®] (Brasil). O tensoativo utilizado foi o Polissorbato 20 (Tween 20) (INLAB[®]).

Para o preparo dos filmes utilizou-se hidroxipropilmetilcelulose (Sigma-Aldrich, USA), argila Laponita (Colormix[®], Brasil), glicerol (Labsynth, Brasil) e água desionizada.

2.2 Delineamento Experimental

Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) com dois fatores para estudar os efeitos combinados das nanoemulsões de óleo essencial de carqueja (OE) e argila laponita (LAP) sobre as propriedades dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), com cinco repetições no ponto central e avaliados pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

O modelo de regressão empregado foi o quadrático completo. Para melhores resultados no modelo de regressão, utilizou-se método de exclusão de variáveis “(stepwise)” a partir da análise da estatística t das variáveis, conforme realizado por Li (2012). Neste procedimento, todas as variáveis são incluídas no modelo e vão sendo retiradas uma a uma, em função da contribuição significativa dada pela análise da significância da estatística t. A técnica consiste em eliminar as variáveis não significativas, que correspondem àquelas que apresentam o menor valor da estatística t, em valor absoluto, por se tratar das variáveis de menor importância (HAIR Jr *et al.*, 2009). Para as variáveis significativas, procedeu-se a análise de correlação para quantificar o grau de correlação com a variável resposta. As

análises de microscopia eletrônica de varredura, perfilometria e análise termogravimétrica foram submetidas à análise descritiva.

2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de carqueja

2.3.1 Micro-organismos

Os três micro-organismos foram ativados a partir de cepas congeladas, das quais foram retiradas com alça de platina (2X) e colocadas em tubos contendo 5 mL de meio TSB (*Tryptic Soy Broth*, Difco Laboratories). Após 24 h de incubação a 35 ± 2 °C, uma alíquota de cada micro-organismo foi estriada, com alça de platina, em placa contendo ágar TSA (*Tryptone Soya Agar*, Himedia Laboratories), e incubada novamente por 24 h. Após este período, várias colônias de cada uma das cepas foram suspensas em solução salina 0,85 %, utilizando-se como padrão a escala de 0,5 de McFarland (concentração final de aproximadamente 10^8 UFC·mL⁻¹). Em seguida, várias diluições foram realizadas até chegar à concentração final de 10^5 UFC·mL⁻¹.

2.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial de carqueja para os diferentes micro-organismos avaliados foi realizada por meio do método de difusão em ágar conforme padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). As bactérias (10^5 UFC·mL⁻¹) foram inoculadas (100 µL) sobre a superfície da placa contendo ágar (*Mueller-Hinton*, Difco Laboratories). Sobre a superfície do ágar inoculado foram feitos poços ($\emptyset = 1$ cm) onde se colocou o óleo essencial nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 % (m/v). O DMSO foi utilizado como solvente para diluição do óleo essencial. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da medição do diâmetro da zona de inibição em torno dos poços (mm). Todas as concentrações foram avaliadas com três repetições em duplicata.

2.5 Desenvolvimento dos filmes bionanocompósitos ativos

Para o desenvolvimento dos filmes, primeiramente realizou-se a dispersão da laponita. A dispersão da laponita foi feita de acordo com a metodologia de Valencia e colaboradores (2015) com modificações. A laponita em diferentes concentrações foi adicionada em 150 mL de água desionizada e dispersa sob agitação vigorosa utilizando o homogeneizador (ULTRA-TURRAX[®] T25 digital) na velocidade de 20.000 rpm durante 30 min em temperatura ambiente (25 °C).

Os filmes foram desenvolvidos de acordo com a metodologia de Pontes (2013) com modificações. A nanoemulsão com a laponita foi aquecida em forno micro-ondas por 30 s. Após o aquecimento, adicionaram-se 7,5 g de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e 0,3 g de glicerol. A solução foi homogeneizada em agitador magnético com rotação de 500 rpm durante 5 min. Posteriormente, a solução foi vertida em placa de vidro com bordas de dimensões 20 x 32 cm, e secou-se em temperatura ambiente por 72 h para garantir a total evaporação do solvente e formação do filme. Os tratamentos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose incorporados com argila laponita e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja.

Tratamentos	LAP (%)*	OE (%)*
1	0,73	3,72
2	4,27	3,72
3	0,73	4,78
4	4,26	4,78
5	0,0	4,25
6	5,0	4,25
7	2,50	3,50
8	2,50	5,0
9	2,50	4,25
10	2,50	4,25
11	2,50	4,25
12	2,50	4,25
13	2,50	4,25

*Argila laponita (LAP) e nanoemulsões de óleo essencial de carqueja (OE).

2.6 Atividade antimicrobiana “*in vitro*” dos filmes

Inóculos de cada micro-organismo foram preparados conforme o item 2.3.1. As bactérias (10^5 UFC·mL⁻¹) foram inoculadas (100 µL) sobre a superfície da placa contendo ágar (*Mueller-Hinton*, Difco Laboratories). Sobre a superfície do ágar inoculado colocaram-se discos ($\varnothing = 1$ cm) dos filmes ativo com os diferentes tratamentos. Em seguida incubaram-se as placas a 35 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da medição do diâmetro da zona de inibição em torno dos filmes (mm).

2.7 Caracterização dos filmes

2.7.1 Espessura

A espessura média dos filmes (μm) foi mensurada com auxílio de micrômetro digital (Mitutoyo, modelo 547-401). As medidas foram realizadas em dois corpos de prova de cada tratamento em três repetições, realizando-se as medidas em dez pontos aleatórios (CAMILLOTO, 2009).

2.7.2 Propriedades Mecânicas

Os filmes produzidos foram submetidos a testes mecânicos para avaliação da resistência à tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo elástico (MPa) de acordo com a norma ASTM D882–91 (ASTM, 2009), utilizando-se a Máquina Universal de Testes Mecânicos (INSTRON Corporation, modelo 3367). Foram testados 5 corpos de prova (17,5 cm x 2,5 cm) de cada tratamento com cinco repetições no ponto central. A máquina foi operada com carga de 1kN, velocidade de separação das garras de 12,5 mm·min⁻¹ e distância inicial de 50 mm (ASTM, 2009).

2.7.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias da superfície dos filmes foram realizadas com auxílio de Microscópio Eletrônico de Varredura (Model TM3000, Hitachi High-Tech) com aumento de 100 X, no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para avaliar os diferentes tipos de estruturas formadas na superfície dos nanocompósitos. Foram preparadas

amostras de 0,5 cm² de cada filme. Em seguida, foram fixadas em *stubs* cobertas com uma camada de carbono (entre 20 e 30 nm) com auxílio de uma pinça (CAMILLOTO, 2009).

2.7.4 Perfilometria Óptica

As microtopografia da superfície dos diferentes filmes foram avaliadas utilizando-se Perfilometro óptico 3D (BRUKER, modelo CONTOUR GTK), realizada no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil. A técnica utiliza a interferometria de luz visível. Para cada tratamento, foram realizadas varreduras com aumento de 5 X em imagens 2D e 3D.

2.7.5 Taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)

A taxa de permeabilidade a vapor d'água (TPVA) dos filmes foi determinada por meio do método dessecante, seguindo a ASTM E 96/ E 96M – 05 (ASTM, 2005) com algumas modificações. Foram utilizadas cápsulas circulares ($\varnothing = 77,0$ mm) com paredes impermeáveis, contendo 30 g de cloreto de cálcio anidro com granulometria entre 600 e 2,36 μm . Os filmes foram vedados com parafina na junção filme/cápsula. As cápsulas foram acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio com o objetivo de manter a umidade relativa em torno de 75 %. O ganho de massa associado à umidade permeada pelo filme foi avaliado por meio gravimétrico. A TPVA foi expressa em $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$.

2.7.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A taxa de decomposição dos filmes foi realizada com auxílio de um analisador térmico DTG (SHIMADZU, mod. 60), onde cerca de 10 mg de amostra dos nanocompósitos foram aquecidos na faixa de temperatura de 40 °C a 600 °C com razão de aquecimento de 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ para cada amostra. A vazão de nitrogênio foi mantida em 60 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ (DING *et al.*, 2015).

2.8 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em nível de 5% de significância, e quando necessário utilizou-se análise de Regressão em nível de 5% e teste *t* de *Student* e *Tukey* utilizando o programa MINITAB[®] versão 17.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de carqueja foi avaliada para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* pelo teste de difusão em ágar, possibilitando a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial.

De acordo com os resultados, o dimetilsulfóxido (DMSO) sem o óleo essencial, não apresentou formação de halo inibitório sobre a placa, indicando que o DMSO não influenciou na atividade antimicrobiana do óleo. O óleo essencial de carqueja apresentou efeito antimicrobiano apenas para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. E para ambos os micro-organismos, a partir de 1% (m/v) de óleo essencial foram observadas atividade antibacteriana significativa ($p < 0,05$), no entanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações de óleo essencial, 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 % (m/v), na formação de halo de inibição, obtendo valor médio do diâmetro de $24,63 \pm 2,89$ mm para *S. aureus* e $16,77 \pm 1,67$ mm para *P. aeruginosa* (Figura 1). Para *E. coli*, o óleo essencial de carqueja não apresentou atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 1).

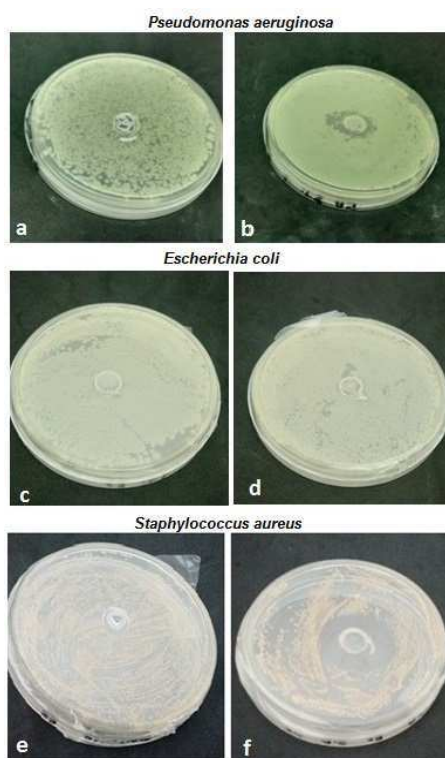


Figura 1. Teste de difusão em ágar do óleo essencial de carqueja sobre os micro-organismos *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* nas concentrações de 0,5 % (a, c, e) e 8% (b, d, f).

Baseado nos resultados pode-se observar que *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram suscetíveis à ação do óleo essencial de carqueja, a partir da concentração de 1,0 % (m/v), sendo esta a concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial de carqueja (Tabela 2).

Tabela 2. Diâmetro dos halos de inibição (mm) em função das diferentes concentrações de óleo essencial de carqueja.

Concentração (m/v)	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
0,5 %	0,0 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^a
1,0 %	20,32 ± 2,08 ^a	19,54 ± 1,95 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
2,0 %	25,60 ± 6,75 ^a	15,60 ± 0,83 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
4,0 %	23,73 ± 6,54 ^a	14,63 ± 1,51 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
6,0 %	24,25 ± 1,29 ^a	16,74 ± 0,02 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
8,0 %	29,25 ± 1,32 ^a	17,37 ± 0,42 ^a	0,0 ± 0,0 ^a

*Os valores de concentração seguidos da mesma letra, não apresentaram diferença significativa, pelo teste de Tukey, a nível de 5%.

Observou-se que *P. aeruginosa* foi sensível ao óleo essencial de carqueja, apesar de alguns estudos demonstrarem que esta bactéria é menos sensível à ação de muitos óleos vegetais e fitoquímicos bioativos (BURT, 2004; EMORIGLU *et al.*, 2010; ATEF *et al.*, 2015).

Alguns autores observaram que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes do que as Gram-positivas aos óleos essenciais porque possuem uma membrana exterior em torno da parede celular composta por polissacarídeos hidrofílicos que limita a difusão dos compostos hidrofóbicos, por exemplo, os óleos essenciais e os seus principais constituintes (INOUYE *et al.*, 2001; BURT; 2004; PELISSARI *et al.*, 2009; MARTUCCI *et al.*, 2015).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais ainda não são completamente compreendidos. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar as ações dos compostos químicos contidos nos óleos essenciais (BURT, 2004).

Devido ao caráter lipofílico dos óleos essenciais, os seus componentes ligam-se aos outros lipídeos da membrana celular dos micro-organismos modificando sua estrutura, ocasionando alterações na permeabilidade da membrana levando à morte da célula (SHANKAR *et al.*, 2014).

Outra forma de ação dos óleos essenciais, possivelmente é por meio dos compostos fenólicos que podem desnaturar proteínas e romper a membrana celular, resultando na inibição das propriedades funcionais da célula, alteração da sua permeabilidade, ocasionando danos citoplasmáticos e interferindo no sistema de geração de energia celular (ATP) (BURT; 2004; BAJPAI *et al.*, 2012) podendo resultar em morte celular (LI *et al.*, 2011).

Avancini *et al.* (2000) avaliando a atividade antimicrobiana do decocto de *B.trimera*, observaram que as bactérias Gram-positivas, dentre elas, *S.aureus*, foram mais sensíveis que as Gram-negativas. Segundo Moura *et al.* (2014) os compostos antimicrobianos da carqueja possivelmente são mais efetivos sobre bactérias Gram-positivas.

Atef *et al.* (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *Satureja hortensis* (savory) contra quatro espécies microbianas (*L.monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*). Os dados obtidos indicaram que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis ao óleo essencial do que as Gram-negativas.

Martucci *et al.* (2015) estudaram a eficiência dos óleos essenciais de lavanda e orégano contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, e a maior inibição foi observada contra *S. aureus*.

É importante ressaltar que estudos da atividade antimicrobiana do óleo essencial de carqueja na literatura ainda são pouco explorados. Assim, os resultados do presente trabalho, indicam que o óleo essencial de carqueja apresenta atividade antibacteriana promissora contra certas bactérias de origem alimentar.

3.2 Aparência dos filmes

Observou-se a presença de aglomerados brancos visíveis nos filmes contendo nanoemulsão de óleo essencial e laponita nas concentrações acima de 2,5% (T2, T4, T6, T7, T8, T9), possivelmente, a presença da laponita proporcionou aglomeração do óleo essencial no filme. Além disso, foi possível observar que houve maior absorção do óleo essencial nesses tratamentos, sem a presença de óleo na superfície dos filmes, indicando que não ocorreu separação de fases. Nos filmes contendo óleo essencial e menores concentrações de laponita (T1, T3 e T5), observou-se que ficaram mais homogêneos, sem a presença de aglomerados brancos (Figura 2). No entanto, foi possível observar a presença de óleo essencial na superfície do filme, indicando separação de fases.

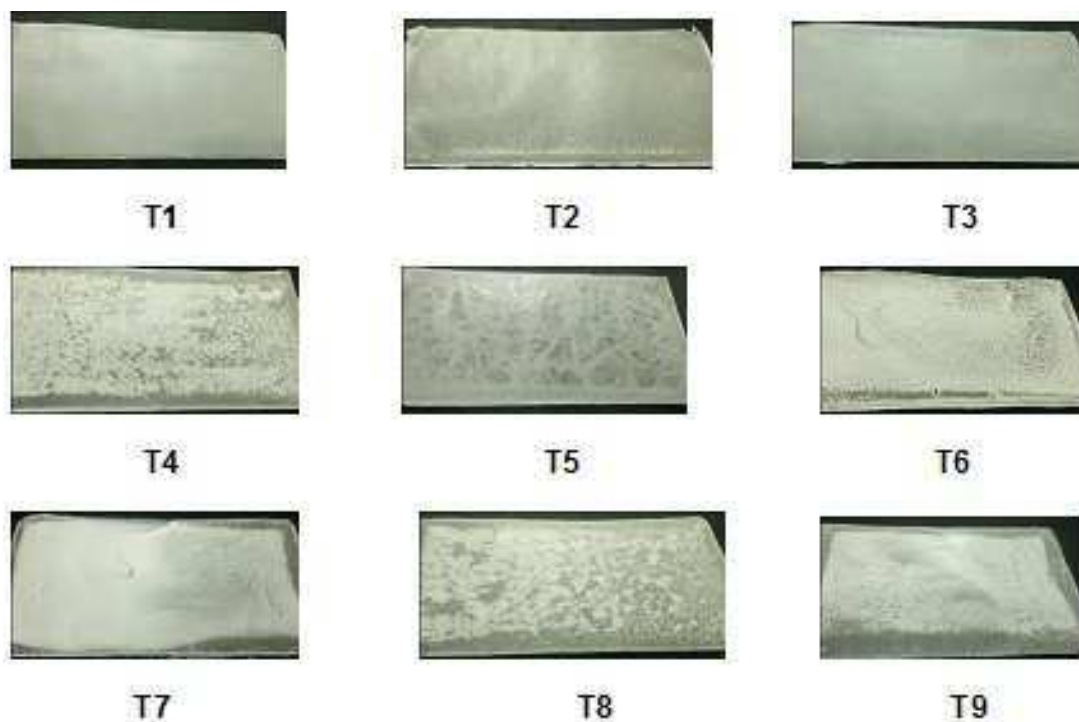


Figura 2. Filmes de hidroxipropilmetilcelulose incorporados com concentrações de nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e argila laponita. (T1) LAP0,73%OE3,72%; (T2) LAP4,27%OE3,72%; (T3) LAP0,73%OE4,78%; (T4) LAP4,26%OE4,78%; (T5) LAP0%OE4,25%; T(6) LAP5,0%OE4,25%; (T7) LAP2,5%OE3,5%; (T8) LAP2,5%OE5,0%; (T9) LAP2,5%OE4,25%.

3.3 Atividade antimicrobiana “*in vitro*” dos filmes

Os filmes com diferentes concentrações de nanoemulsão de óleo essencial apresentaram atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* (Figura 3). No entanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações, obtendo-se halo de inibição médio com diâmetro de $22,06 \pm 2,63$ mm. Para *E. coli* e *P. aeruginosa* os filmes não apresentaram efeito antibacteriano (Figura 3).



Figura 3. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” (pela formação de halo de inibição) dos filmes incorporados com nanoemulsão de óleo essencial de carqueja sobre *S. aureus* (a) *P. aeruginosa* (b) e *E. coli* (c).

Os filmes incorporados com nanoemulsão de óleo essencial de carqueja não apresentaram efeito antimicrobiano para *P. aeruginosa*. Possivelmente, isso pode ter ocorrido devido o óleo essencial estar ligado na matriz polimérica, diminuindo a difusão dos compostos ativos.

P. aeruginosa é uma Gram-negativa conhecida por possuir elevado nível de resistência a maior parte dos agentes antimicrobianos, devido a uma barreira muito restritiva da sua membrana externa (MANN *et al.*, 2000).

A maior resistência entre as bactérias Gram-negativas poderia ser atribuída à diferença na membrana celular desses grupos bacterianos, que apresentam uma membrana exterior constituída por polissacarídeos hidrofílicos que atuam como barreira aos compostos hidrofóbicos (OTONI *et al.*, 2014; ATEF *et al.*, 2015). Por outro lado, esta membrana não está presente em micro-organismos Gram-positivos, o que proporciona e facilita o contato com as substâncias antimicrobianas, conseqüentemente ocorre um maior efeito inibidor do composto ativo (OTONI *et al.*, 2014).

Lopes *et al.* (2014) desenvolveram filmes de base celulósica incorporados com aldeído cinâmico e determinaram a atividade antimicrobiana dos mesmos. Os autores observaram inibição da bactéria *S. aureus* em todas as concentrações (5, 10 e 20 % m/v) de aldeído cinâmico testadas com formação de halos. Para *E. coli* não houve formação do halo de inibição do crescimento nos filmes avaliados.

Emiroglu *et al.* (2010) determinaram a atividade antimicrobiana de filmes de proteína de soja incorporados com óleo essencial de timol e orégano sobre quatro patógenos alimentares incluindo *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Entre as bactérias testadas, *S. aureus* foi à bactéria mais sensível e *P. aeruginosa* apresentou resistência aos óleos essenciais.

Dashipour *et al.* (2015) desenvolveram filmes de carboximetilcelulose contendo óleo essencial de *Zataria multiflora* e estudaram o seu efeito antimicrobiano em *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*. Os resultados mostraram efeito inibidor significativo do óleo essencial em ambas às bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

De acordo com os estudos feitos por Klangmuang e Sothornvit (2016) filmes nanocompósitos à base de HPMC incorporados com óleo essencial de ervas tailandesas foram mais eficazes na inibição de Gram-positivas (*S. aureus*) do que Gram-negativas (*E. coli*).

Os resultados destes estudos demonstram que a nanoemulsão de óleo essencial de carqueja incorporada em filmes de hidroxipropilmetilcelulose pode controlar a multiplicação de micro-organismos patogênicos, dentre eles *Staphylococcus aureus*. Como não houve diferença significativa entre os tratamentos, poderia ser utilizado o filme com menor concentração de óleo essencial a fim de garantir a segurança microbiológica do alimento a ser embalado.

3.4 Espessura

A espessura dos filmes não variou ($p > 0,05$) em função dos tratamentos, apresentando valor médio de $265,0 \pm 0,03 \mu\text{m}$. A uniformidade das espessuras dos filmes é desejável para a realização das comparações entre os tratamentos nas análises de caracterizações (PONTES, 2013).

3.5 Propriedades Mecânicas

Os parâmetros de tração mais estudados são a resistência à tração (TS) como uma medida da resistência do filme, módulo de elasticidade (EM) que está relacionado com a rigidez do filme e a porcentagem de alongamento na ruptura (E%), ou seja, a capacidade de estiramento do filme sobre a ruptura.

Os resultados encontrados com base no delineamento composto central rotacional, mostraram que a resistência à ruptura e o módulo de elasticidade não foram afetados ($p > 0,05$) pelas diferentes concentrações de LAP, porém foi afetada ($p < 0,05$) pelas diferentes concentrações de nanoemulsão de óleo essencial de carqueja. O alongamento de ruptura não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) no intervalo estudado (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes de DCCR, na avaliação das propriedades mecânicas do filme de hidroxipropilmetilcelulose com concentrações de laponita e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja.

Parâmetros	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
Resistência à tração (MPa)	$20,10 - 2,89 \cdot \text{OE} (\%)$	0,3780	0,971
Along. Ruptura (%)	MÉDIA = $42,22 \pm 8,18$	-	-
M. Elasticidade (MPa)	$537,9 - 68,2 \cdot \text{OE} (\%)$	0,5008	0,981

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

Com relação aos parâmetros de resistência à tração e módulo de elasticidade, foi possível observar por meio das equações, uma relação linear e negativa entre estes parâmetros e a concentração de nanoemulsão de óleo essencial de carqueja das formulações dos filmes. Quanto maior a concentração de OE, menor foi a resistência à tração e o módulo de elasticidade dos filmes (Figura 4). Conforme apresentado nas Figuras 4 e 5, os filmes contendo 3,5 e 3,72% de OE apresentaram os maiores valores para resistência, próximos a 10,0 MPa e 300,0 MPa para elasticidade.

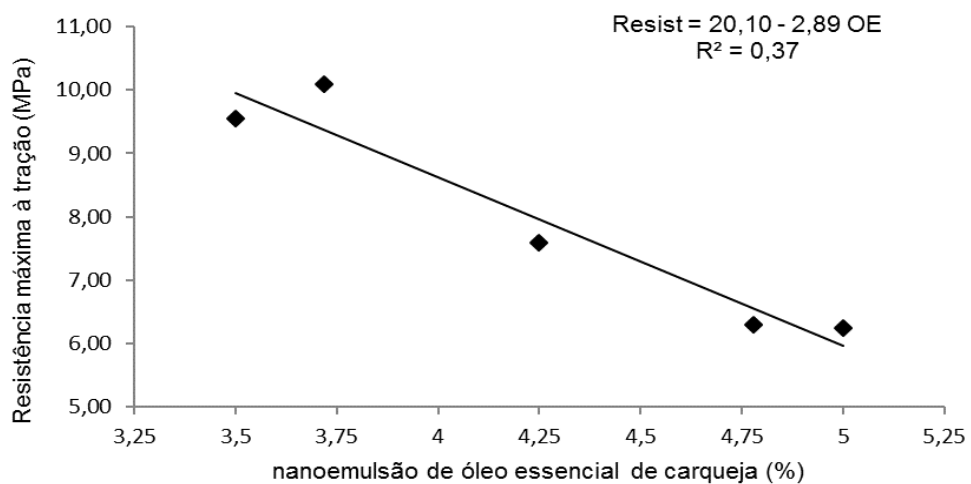


Figura 4. Efeito das diferentes concentrações de nanoemulsões de óleo essencial de carqueja na resistência mecânica de filmes de HPMC.

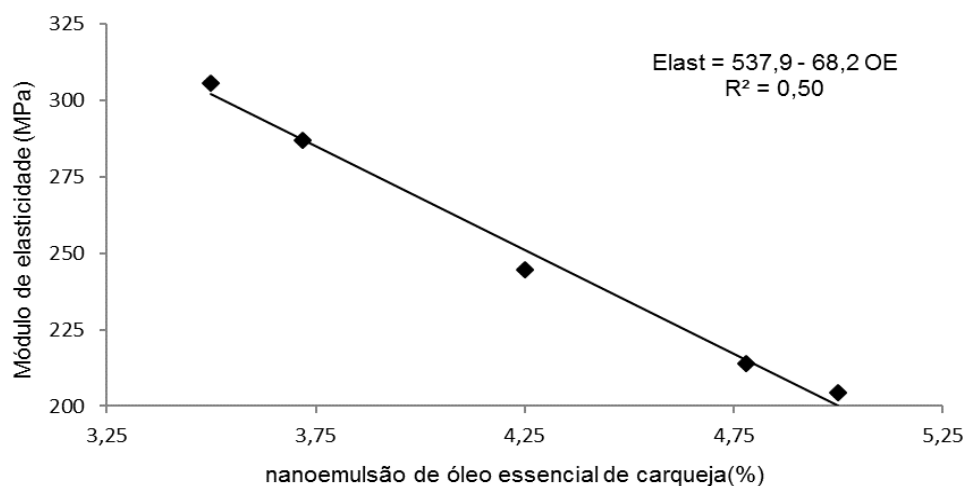


Figura 5. Efeito das diferentes concentrações de nanoemulsões de óleo essencial de carqueja no módulo de elasticidade de filmes de HPMC.

O efeito da incorporação de óleo essencial sobre as propriedades de tração de filmes é bastante variável e irá depender das interações específicas entre os componentes do óleo e da matriz do polímero (ATARES e CHIRALT, 2016).

O enfraquecimento é causado, principalmente, devido à estrutura heterogênea causada pela adição de lipídeos, porém prever o seu efeito é difícil devido à composição complexa dos óleos essenciais (ATEF *et al.*, 2015; ATARES e CHIRALT, 2016).

Resultados semelhantes foram obtidos em filmes de HPMC com óleo essencial de chá verde, em que observaram uma diminuição significativa no módulo de elasticidade e da resistência à tração. Quanto ao alongamento na ruptura não foi observado nenhum efeito significativo (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2009).

O parâmetro alongamento na ruptura, não apresentou nenhuma significância ($p > 0,05$), obtendo uma média de $42,22 \pm 8,18$ % entre os tratamentos estudados. Segundo alguns autores, o óleo essencial pode atuar como plastificante, conferindo aos filmes maior capacidade de sofrer alongamento sem ruptura (LOPES, 2013; ATEF *et al.*, 2015; ACEVEDO-FANI *et al.*, 2015; KLANGMUANG e SOTHORNVIT, 2016).

Klangmuang e Sothornvit (2016) incorporaram óleos essenciais de ervas tailandesas em filmes de hidroxipropilmetilcelulose, o que proporcionou aumento do alongamento na ruptura dos filmes. A hipótese dos autores é de que os óleos essenciais podem atuar como plastificante, resultando na diminuição da resistência à tração e aumento no alongamento. Assim, o tipo de óleo essencial pode afetar as propriedades mecânicas de filmes nanocompósitos a base de HPMC de forma diferente.

Otoni *et al.* (2016) estudaram as propriedades mecânicas de filmes comestíveis de proteína isolada de soja incorporados com micro e nanoemulsões de carvacrol e cinamaldeído. Os autores observaram reduzida resistência à tração e módulo de elasticidade e aumento do alongamento na ruptura.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopias da superfície dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose incorporados com nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e laponita foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) que estão representadas na Figura 6.

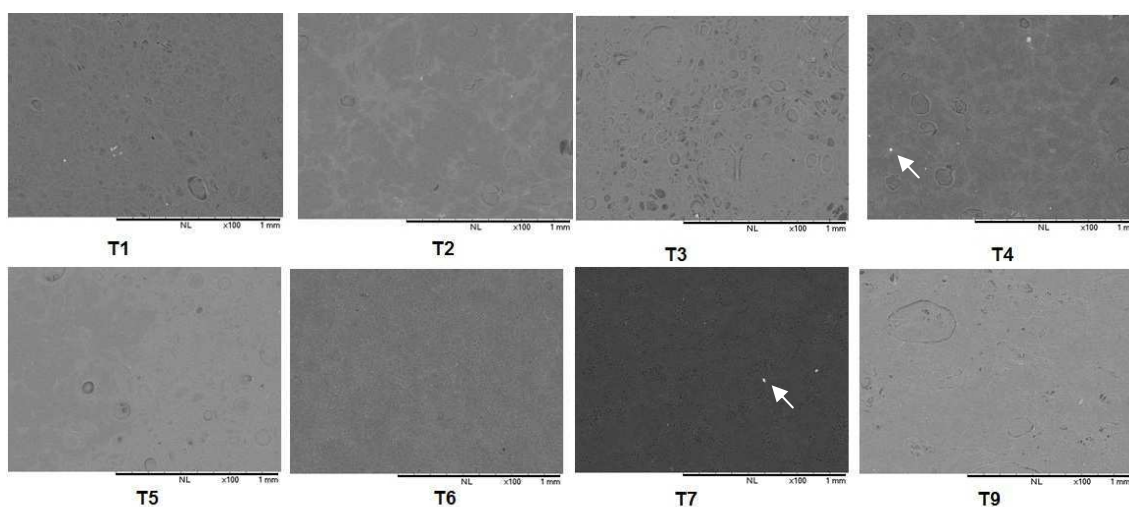


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose incorporados com argila laponita (LAP) e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (OE) na resolução 100 X. **T1** (LAP0,73%OE3,72%); **T2** (LAP4,27%OE3,72%); **T3** (LAP0,73%OE4,78%); **T4** (LAP4,26%OE4,78%); **T5** (LAP0%OE4,25%); **T6** (LAP5%OE4,25%); **T7** (LAP2,5%OE3,5%); **T10** (LAP2,5%OE4,25%).

Os filmes apresentaram estrutura heterogênea, com gotículas de óleo de diferentes tamanhos dispersas na matriz polimérica. Os resultados obtidos também foram encontrados por diversos autores (ATARES *et al.*, 2011; ZUNIGA *et al.*, 2012; JOUKI *et al.*, 2014).

Todos os filmes apresentaram gotículas de diâmetros variados, com uma distribuição de tamanho heterogênea e forma esférica, exceto os filmes 6 (LAP5%OE4,25%) e 7 (LAP2,5%OE3,5%) onde as gotículas de óleo essencial estavam menores e com distribuição mais homogênea.

Foi possível observar nos filmes 1 (LAP0,73%OE3,72%), 2 (LAP4,27%OE3,72%) 4 (LAP4,26%OE4,78%) e 7 (LAP2,5%OE3,5%) a presença de pequenos pontos brancos sobre a superfície dos filmes, o que pode ser atribuído a certa quantidade de polímero não dissolvido.

Segundo Atarés e Chiralt (2016) a microestrutura final dos filmes é influenciada pelo arranjo estrutural e interações entre os componentes presentes e a sua dispersão no filme. Além disso, a fase de secagem desempenha um papel importante, pois fenômenos de desestabilização das gotículas, floculação e coalescência podem ocorrer.

Nas imagens de microscopia na escala utilizada, não foi possível observar a presença da argila laponita nos filmes, indicando que a mesma apresenta tamanho menor.

3.7 Perfilometria óptica

As fotomicrografias da superfície dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose incorporados com nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e laponita foram obtidas por perfilometria óptica e estão representadas na Figura 7.

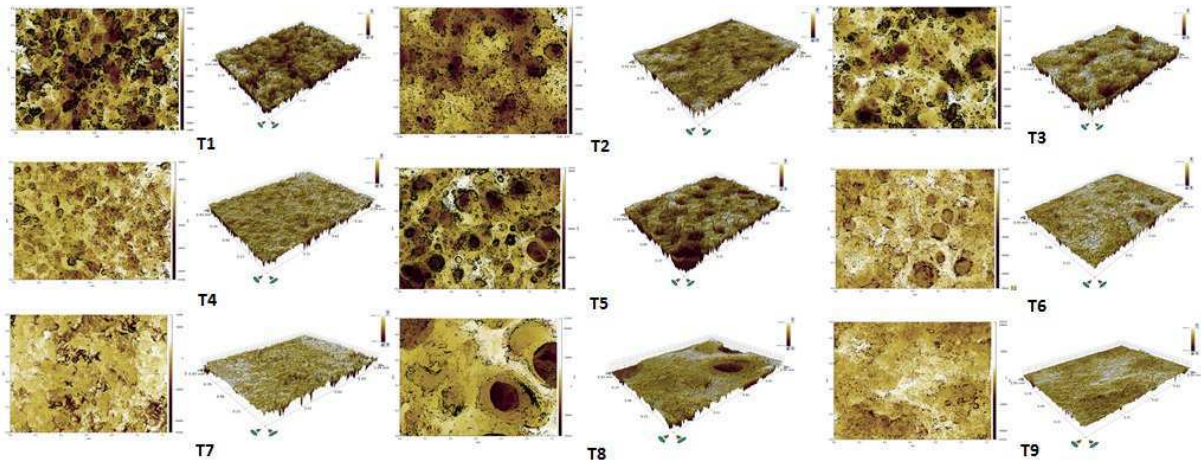


Figura 7. Fotomicrografias dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) incorporados com argila laponita (LAP) e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (OE) em 2D e 3D com aumento de 5 X obtidas por Perfilometria. **T1** (LAP0,73%OE3,72%); **T2** (LAP4,27%OE3,72%); **T3** (LAP0,73%OE4,78%); **T4** (LAP4,26%OE4,78%); **T5** (LAP0%OE4,25%); **T6** (LAP5,0%OE4,25%); **T7** (LAP2,50%OE3,50%); **T8** (LAP2,50%OE5,0%); **T9** (LAP2,50%OE4,25%). Escala: 1,24mm x 0,93 mm.

Os filmes incorporados com nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e com menores concentrações de laponita (T1, T3, T5, T7) apresentaram gotículas de óleo essencial, fissuras e poros. Isso pode estar relacionado com a evaporação do óleo essencial durante o processo de secagem dos filmes, promovendo a formação de poros. Diversos autores relatam que filmes incorporados com óleo essencial apresentam superfície porosa devido à evaporação do óleo durante o processo de secagem (VILLACRÉS *et al.*, 2014; JOUKI *et al.*, 2014; DASHIPOUR *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2016). Os filmes com maiores concentrações de laponita apresentaram superfície mais homogênea, com a presença de poucos poros ou fissuras (T2, T4, T6). Segundo Ghadiri *et al.* (2013) e Gaharwar *et al.* (2011) a adição de laponita em matrizes poliméricas reduz a porosidade e o tamanho desses poros. Os filmes T8 e T9 apresentaram superfície homogênea, com poucos poros, porém grandes.

3.8 Taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)

A TPVA dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose foi afetada ($p < 0,05$) pelas diferentes concentrações de nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e argila laponita. A seguir está apresentada a Equação 1 (Tabela 4), obtida pela análise de regressão, e a Figura 8, com o gráfico de contorno ajustado.

Tabela 4. Estimativas dos coeficientes de DCCR, da presença de LAP e OE na TPVA dos filmes de HPMC.

TPVA	Equação	R ²	FAJ ^a
(g·m ⁻² ·dia ⁻¹)	$1567 - 138,9 \text{ LAP}(\%) - 585 \text{ OE}(\%) + 2,85(\%) \text{ LAP}(\%) * \text{LAP}(\%) + 58,0 \text{ OE}(\%) * \text{OE}(\%) + 28,6 * \text{LAP}(\%) * \text{OE}(\%)$	0,6420	0,384

*Significativo pelo teste t de *Student* ($p < 0,05$)

^a FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

De acordo com os resultados encontrados, a maior barreira à água foi obtida para filmes contendo suas concentrações máximas de nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (4,78 – 5,0%) e de laponita (4,26 – 5,0%), obtendo valores de TPVA menores que 100,0 g/m²·dia². Filmes com concentrações de 4,25% de OE e LAP entre 0 e 2,5% apresentaram valores de TPVA entre 100 e 120,0 g/m²·dia², e maiores valores de TPVA foram obtidos para filmes com concentrações menores de OE (3,5 – 3,78%) e de LAP (0 e 0,73%).

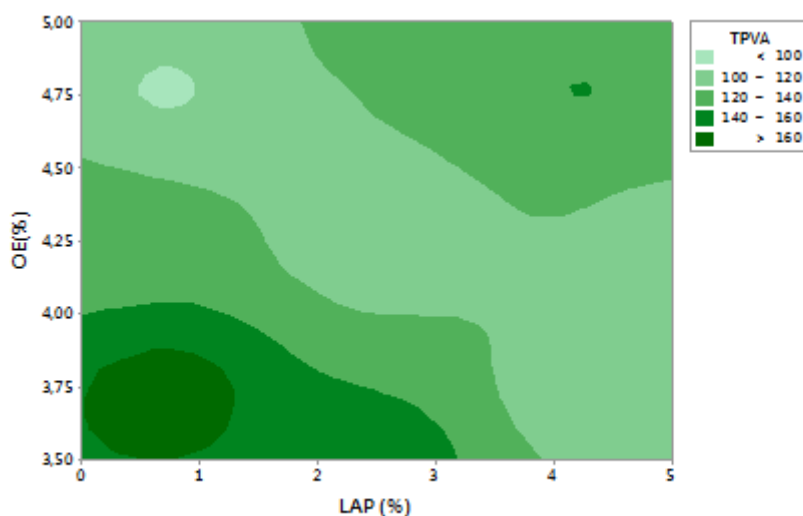


Figura 8. Taxa de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose incorporados com argila laponita (LAP) e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (OE). Análise de contorno da TPVA em função da concentração de LAP e OE.

A incorporação de óleo essencial em matrizes poliméricas hidrofílicas pode causar a redução da TPVA, resultando na melhoria das suas propriedades de barreira ao vapor de água (ATARES e CHIRALT, 2016; KLANGMUANG e SOTHORNVIT, 2016).

Segundo Acevedo-Fani *et al.* (2015) os óleos essenciais são conhecidos por diminuir a TPVA dos filmes à base de polissacarídeos. A presença do óleo essencial na estrutura do filme melhora as propriedades de barreira à água devido ao aumento da tortuosidade, criando uma resistência ao vapor de água através do filme.

Sánchez-González *et al.* (2009) desenvolveram filmes de HPMC com óleo essencial de chá verde, e observaram que a incorporação do óleo essencial reduziu a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de HPMC. Resultado semelhante foi alcançado por Choi *et al.* (2016) que relataram que os óleos essenciais de orégano e bergamota aumentaram a hidrofobicidade de filmes de HPMC, desempenhando um papel importante na propriedade de barreira a água.

A presença da argila laponita em filmes pode resultar em um caminho mais tortuoso, dificultando a difusão da molécula permeante através do filme, diminuindo assim a permeabilidade dos filmes (LI *et al.*, 2015; MIHINDUKULASURIYA e LIM, 2014).

Li *et al.* (2015) desenvolveram filmes de gelatina incorporados com laponita e observaram o efeito da concentração de laponita nas propriedades dos filmes. À medida que a concentração de laponita aumentou nos filmes, observou-se redução significativa na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina, melhorando as propriedades de barreira dos mesmos.

A redução da permeabilidade ao vapor de água também foi observada no estudo de Mondal *et al.* (2013) onde desenvolveram-se filmes de HPMC incorporados com argila MMT. O aumento da propriedade de barreira ao vapor de água dos filmes nanocompósitos (polímero/argila) é atribuído principalmente ao caminho tortuoso para a difusão do vapor de água, devido às camadas de argila impermeáveis distribuídas na matriz do polímero, aumentando o comprimento do caminho de difusão.

A taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) é uma das propriedades mais importantes para embalagens de alimentos. Dependendo do alimento a ser embalado, o filme deve ser capaz de evitar ou reduzir a transferência de umidade entre o alimento e o ambiente (DASHIPOUR *et al.*, 2015).

Assim, a presença da nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e argila laponita combinada no filme proporcionou a redução da permeabilidade ao vapor de água dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose.

3.9 Análise termogravimétrica (TGA)

A curva termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) dos filmes de HPMC incorporados com argila laponita e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja estão representados na Figura 9.

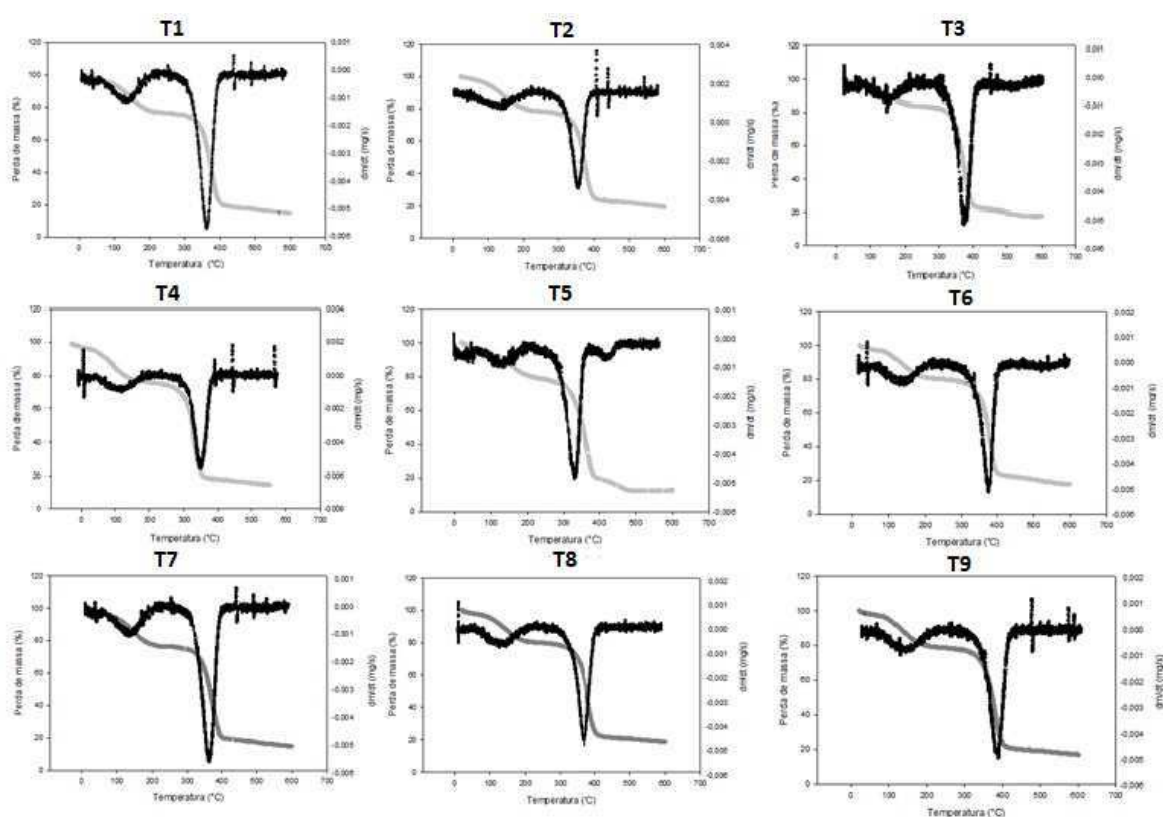


Figura 9. Curva de termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) dos filmes de hidroxipropilmetilcelulose incorporados com argila laponita (LAP) e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja (OE). **T1** (LAP0,73%OE3,72%); **T2** (LAP4,27%OE3,72%); **T3** (LAP0,73%OE4,78%); **T4** (LAP4,26%OE4,78%); **T5** (LAP0%OE4,25%); **T6** (LAP5,0%OE4,25%); **T7** (LAP2,50%OE3,50%); **T8** (LAP2,50%OE5,0%); **T9** (LAP2,50%OE4,25%).

A decomposição térmica dos filmes de HPMC incorporados com nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e argila laponita apresentaram comportamento semelhante com três estágios principais de perda de massa. O primeiro estágio térmico ocorreu entre as temperaturas de 15 e 100 °C, com perda de massa de aproximadamente 8%, que correspondeu à perda de água não ligada

quimicamente na nanoemulsão e à presença de umidade nos filmes de HPMC (MONDAL *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2015).

A pequena diminuição de massa neste estágio pode estar relacionada com a elevada capacidade de retenção de água do HPMC e a incorporação de óleo essencial nos filmes (MONDAL *et al.*, 2013). Segundo Tongnuanchan *et al.* (2014), o óleo essencial tem efeito sobre a perda de massa, pois devido o seu caráter hidrofóbico pode ocasionar redução da difusão da água nos filmes.

No segundo estágio ocorreu a volatilização dos compostos voláteis do óleo essencial de carqueja, na faixa de temperatura de 110 a 190 °C. De acordo com a literatura, as perdas de peso durante o processo de aquecimento dos óleos essenciais, são devido à evaporação dos componentes voláteis, e não a sua degradação térmica (CHIU *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-RIVERA *et al.*, 2016). González-rivera *et al.* (2016) analisaram termicamente cinco óleos essenciais (alecrim, lavanda, sálvia, sementes de funcho e botões de cravo) e observaram que as curvas termogravimétricas de todos os óleos estudados apresentaram perda de massa abaixo de 175 °C, indicando a evaporação dos óleos. Segundo Portella *et al.* (2014) a evaporação do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet foi entre 100 a 225 °C que corresponde a volatilização dos compostos voláteis do óleo.

No último estágio, a principal perda de massa para todos os filmes analisados ocorreu na faixa de 300 a 400 °C que foi caracterizado como a degradação térmica do HPMC e glicerol, ocorrendo degradação das regiões cristalinas e a quebra dos monômeros, envolvendo a despolimerização das cadeias poliméricas (DAMASIO, 2015).

Mondal *et al.* (2013) observaram que os filmes de HPMC decompõe-se na faixa de 250-400 °C e segundo Espitia *et al.* (2014) a decomposição do glicerol ocorre aproximadamente a 300 °C.

De acordo com os resultados, a laponita não influenciou na estabilidade térmica dos filmes à base de HPMC. Isto pode ser observado comparando o tratamento 5 com os demais, onde o tratamento com a ausência de laponita apresentou mesma característica de degradação dos demais tratamentos. As concentrações de laponita foram baixas (0 – 5 % m/m), por isso, provavelmente a laponita não influenciou na decomposição térmica dos filmes.

Perotti (2013) também investigou a influência de materiais lamelares nas propriedades de físico-química do amido termoplástico. Para a produção dos nanocompósitos o autor utilizou laponita nas concentrações de 2,5 % e 5,0 % m/m. Ao realizar a análise termogravimétrica, observou que as curvas termogravimétricas eram semelhantes, indicando não haver mudanças significativas nas propriedades térmicas dos filmes, e não foi encontrado evidências de um efeito protetor da argila laponita sobre a fase polimérica.

4. CONCLUSÃO

O óleo essencial de carqueja apresentou efeito antimicrobiano para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com concentração mínima inibitória de 1% (m/v).

Os filmes ativos antimicrobianos incorporados com nanoemulsão de óleo essencial de carqueja apresentaram atividade *in vitro* sobre *S. aureus*.

Os filmes apresentaram-se heterogêneos, com aglomerados brancos, gotículas de óleo essencial, fissuras e poros.

A espessura dos filmes de HPMC não foi influenciada pela adição de argila laponita e nanoemulsão de óleo essencial de carqueja.

A laponita não afetou as propriedades mecânicas dos filmes no intervalo estudado. A resistência à tração e módulo de elasticidades dos filmes foram afetadas pela adição de OE.

O efeito da combinação de LAP e OE apresentou melhorias quanto à propriedade de barreira ao vapor de água dos filmes.

A adição de laponita nas concentrações estudadas não influenciou na estabilidade térmica da matriz polimérica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO-FANI, A. *et al.* Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 168-177. 2015.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Test Method for Tensile Properties Thin Plastic Sheeting**, D882-09 Philadelphia: ASTM, p. 11. 2009.

ASTM – AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for Water Vapor Transmission of Materials**. E 96/E 96 M - 05. Philadelphia: ASTM, p. 11. 2005.

ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 51-62. 2016.

ATARÉS, L.; PEREZ-MASIA, R.; CHIRALT, A. The role of some antioxidants in the HPMC film properties and lipid protection in coated toasted almonds. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 649-656. 2011.

ATEF, M.; REZAEI, M.; BEHROOZ, R. Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 150-157, 2015.

AVANCINI. C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. C. de. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) DC, compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia = Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Belo Horizonte, v. 52, n. 3, p. 230-234. 2000.

AZEREDO, H. M. C. de. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, p. 1240-1253. 2009.

BAJPAI, V. K., BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734. 2012.

BORELLA, J. C. *et al.* Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16 (4), p. 557-561. 2006.

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

BYK. **Technical Information B-RI 21 Laponite**. Disponível em: <http://www.byk.com/fileadmin/byk/additives/product_groups/rheology/former_rockwool_additives/technical_brochures/BYK_B-RI21_LAPONITE_EN.pdf> Acesso em 04 de janeiro de 2016.

CALO, J. R. *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119. 2015.

CAMILLOTO, G. P. **Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa incorporada com produto à base de triclosan para aplicação em carne bovina.** 2009. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CHIU, H. H. *et al.* Constituents of volatile organic compounds of evaporating essential oil. **Atmospheric Environment**, v. 43, n. 36, p. 5743-5749. 2009.

CHOI, W. S.; SINGH, S.; LEE, Y. S. Characterization of edible film containing essential oils in hydroxypropyl methycellulose and its effect on quality attributes of 'Formosa' plum (*Prunus salicina* L.). **Food Science and Technology**, v. 70, p. 213-222. 2016.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.** Norma aprovada - Oitava Edição. M2- A8, 23, 1, 2003.

DAMASIO, R. A. P. **Caracterização e aplicações de celuloses nanofibrilada (CNF) e nanocristalina (CNC).** 2015. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

DIAS, N. A. A. **Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculados com *Clostridium perfringens* tipo A.** 2011. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DASHIPOUR, A. *et al.* Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 606-613. 2015.

DING, C.; ZHANG, M.; LI, G. Preparation and characterization of collagen/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) blend film. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 194-201. 2015.

DONSI, F. *et al.* Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 342-350. 2012.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, p. 1-24. 2011.

EMIROGLU, Z. K. *et al.* Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v.86, p. 283-288. 2010.

ESPITIA, P. J. P. *et al.* Optimal antimicrobial formulation and physical-mechanical properties of edible films based on açai and pectin for food. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 2, p. 38-49. 2014.

GAHARWAR, A. K. *et al.* Assessment of using Laponite cross-linked poly(ethylene oxide) for controlled cell adhesion and mineralization. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 568-577. 2011.

GHADIRI, M. *et al.* Physico-chemical, mechanical and cytotoxicity characterizations of Laponite®/ alginate nanocomposite. **Applied Clay Science**, v.85, p.64-73, 2013.

GONZÁLEZ-RIVERA, J. *et al.* Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 308-318. 2016.

HAIR Jr, J. F. *et al.* **Análise Multivariada de Dados**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and the major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.47, 565-573. 2001.

JOUKI, M. *et al.* Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 9-19. 2014.

KANMANI, P.; RHIM, J. W. Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 258-266. 2014.

KARAM, T. K. *et al.* Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 280-286. 2013.

KLANGMUANG, P.; SOTHORNVIT, R. Barrier properties, mechanical properties and antimicrobial activity of hydroxypropyl methycellulose-based nanocomposite films incorporated with Thai essential oils. **Food Hydrocolloids**, 2016. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.06.018.

KOTAL, M.; BHOWMICK, A. K. Polymer nanocomposites from modified clays: Recent advances and challenges. **Progress in Polymer Science**. v. 51, p. 127-187, 2015.

LI, X. **A simulation evaluation of backward elimination and stepwise variable selection in regression analysis**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Estatística – Faculdade de Artes e Ciências – Universidade do Estado do Kansas, Manhattan. 2012.

LI, M.; MUTHAIYAN, A. *et al.* Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.12, p. 1240-1254. 2011.

LI, X. *et al.* Fabrication of gelatin laponite composite films: Effect of the concentration of laponite on physical properties and the freshness of meat during storage. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 390-398. 2015.

LOPES, F. A. *et al.* Desenvolvimento e caracterização de filmes de base celulósica incorporados com aldeído cinâmico. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 33-40. 2014.

MANN, C. M.; COX, S. D.; MARKHAM, J. L. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Applied Microbiology**, v. 30, p. 294-297. 2000.

MARTINS, P. *et al.* Thermal characterization of orange, lemongrass and basil essential oils. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 463-468. 2011.

MARTUCCI, J. F. *et al.* Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 205-213. 2015.

MIHINDUKULASURIYA, S. D. F.; LIM, L. T. Nanotechnology development in foods packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 149-167. 2014.

MONDAL, D. *et al.* Effect of clay concentration on morphology and properties of hydroxypropylmethylcellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 57-63. 2013.

MOURA, G. S. *et al.* Atividade antimicrobiana e indutora de fitoalexinas do hidrolado de carqueja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n.2, supl. I, p. 309-315. 2014.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 285-330. 2011.

NOGUEIRA, N. P. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 513-522. 2011.

OLIVEIRA, R. N. *et al.* *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 135-143. 2012.

OTONI, C. G. *et al.* Mechanical and water barrier properties of isolated soy protein composite edible films as affected by carvacrol and cinnamaldehyde micro and nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 72-79. 2016.

OTONI, C. G. *et al.* Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya/puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 188-194. 2014.

PASTOR, C. *et al.* Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropylmethylcellulose edible coatings containing propolis extract. **Postharvest Biology and Technology**. v., 60, p. 64-70. 2011.

PEROTTI, G. F. **Nanocompósitos orgânico-inorgânicos de polímero biodegradável e estruturas lamelares**. 2013. 184 p. Tese (Doutorado em Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PEROTTI, G. F. *et al.* Bacterial cellulose – laponite clay nanocomposites. **Polymer**, v. 52, p. 167-163. 2011.

PEROTTI, G. F. *et al.* Biopolymer-clay nanocomposites: Cassava starch and synthetic Clay cast films. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 2, p. 320-330. 2014.

PONTES, S. F. O. **Desenvolvimento de nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas em filme de metilcelulose para uso em alimentos**. 2013. 112 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

PORTELLA, A. C. P. *et al.* Caracterização físico-química do óleo essencial da *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 844-849. 2014.

RHIM, J-W.; KIM, Y.T. Biopolymer-based composite packaging materials with nanoparticles. **Innovations in Food Packaging**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00017-5>. 2014.

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

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. *et al.* Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2102-2109. 2009.

SEVERINO, R. *et al.* Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on green beans. **Food Control**, v. 50, p. 215-222. 2015.

SHANKAR, J.; SANKUNNY, R.; KARUPPAYIL, M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

SILVA, F. G. *et al.* Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.18, n.5, p. 990-997. 2007.

SILVA, F. *et al.* Avaliação do teor de óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Em diferentes embalagens durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 54-58. 2013.

SILVESTRE, C.; DURACCIO, D.; CIMMINO, S. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 1766-1782. 2011.

SIMÕES-PIRES, C. A. *et al.* Isolation and online identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatization. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 307-314. 2005.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, n. 17, p. 246-254. 2012.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 84-95. 2007.

TEIXEIRA, B. *et al.* Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595. 2013.

TOSATI, J. V. **Determinação da taxa de respiração de tomate cereja e da permeabilidade à gás de filme comestível a base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)**. 2013. 106p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2013.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Structural, morphological and thermal behavior characterizations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 33-43. 2014.

VALENCIA, G. A. *et al.* Nanocomposite- forming solutions based on cassava starch and Iaponite: Viscoelastic and rheological characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 174-181. 2015.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, p. 71-78. 2003.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94. 2005.

VILLACRÉS, R. A. E.; FLORES, S. K.; GERSCHENSON, L. N. Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and glycerol contents on physical properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 36, p.108-117. 2014.

WEISS, J. *et al.* Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. In: Barbosa-Cánovas, G.V., Mortimer, A., Lineback, D., Spiess, W., Buckle, K. (Eds.),

IUFoST World Congress Book: Global Issues in Food Science and Technology.
Elsevier Inc., Amsterdam. 2009.

ZUNIGA, R.N. *et al.* Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methycellulose films: Effect of their microstructure. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1147-1158. 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível produzir nanoemulsão de óleo essencial de carqueja na concentração de 5 % (m/v). A nanoemulsão foi estável, sem apresentar separação de fases ou sinais de instabilidade durante os sete dias de armazenamento. O óleo essencial de carqueja inibiu os micro-organismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

O filme ativo inibiu apenas *S. aureus* no teste de difusão em ágar. Portanto, o estudo sugere à aplicação deste filme em alimentos sujeitos a contaminação por este micro-organismo.

As propriedades mecânicas dos filmes foram afetadas pela adição de nanoemulsão de óleo essencial de carqueja e não foram afetadas pela adição de laponita. A adição de laponita e nanoemulsão de óleo essencial nos filmes reduziu a taxa de permeabilidade ao vapor d'água, e não influenciaram na estabilidade térmica dos filmes. A partir dos resultados encontrados neste estudo, observou-se que a argila laponita nas concentrações estudadas não atuou como reforço no filme. Diante disso, o estudo sugere a utilização de concentrações de laponita acima de 5% m/m.