

SILVANIA FARIAS OLIVEIRA PONTES

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS
INCORPORADAS EM FILME DE METILCELULOSE PARA USO EM
ALIMENTOS**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

T

P814d
2013 Pontes, Sylvania Farias Oliveira, 1982-
Desenvolvimento de nanoemulsões de óleos essenciais
incorporadas em filme de metilcelulose para uso em alimentos / Sylvania
Farias Oliveira Pontes. - Viçosa, MG, 2013.
xv, 112f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Alimentos - Embalagens. 2. Essências e óleos essenciais.
3. Alimentos - Conservação. 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

SILVANIA FARIAS OLIVEIRA PONTES

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS
INCORPORADAS EM FILME DE METILCELULOSE PARA USO EM
ALIMENTOS**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 14 de outubro de 2013.

Maria Célia Lopes Torres

Miriam Fontes Araújo Silveira

Eber Antonio Alves Medeiros
(Coorientador)

João de Deus Souza Carneiro
(Coorientador)

Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Orientadora)

Aos meus amados filhos, Guilherme e Larissa, presentes de Deus na minha vida, alegria a cada amanhecer.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que sempre me protege e, me orienta por todos os meus caminhos.

Ao meu marido Leonardo Vieira Pontes que me conduziu a este caminho de aprofundamento de aprendizados, que desde quando meu professor na UESB me incentiva na busca dos questionamentos e conhecimentos.

Com muito carinho a toda minha família que, apesar da distância, estiveram presentes me apoiando, em especial aos meus pais Zoraide e Raimundo, e à minha querida irmã Cleidinéia, exemplos de vida.

À Professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, por ter disposição e muita paciência para me receber como sua orientada.

Aos meus co-orientadores que sempre me auxiliaram e se dedicaram para a conclusão deste trabalho, professor Eber Antonio Alves Medeiros e professor João de Deus Souza Carneiro.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela acolhida.

A todos os professores que participaram desta caminhada e a todos do corpo técnico-administrativo, em especial a Maria Geralda.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos amigos de curso de doutorado Lígia, Mônica, Maradini, Paula, Marcos, Rafael e Gabrielle, pelos inúmeros momentos de companheirismos.

Ao amigo Caio Gomide, meus sinceros agradecimentos, por ter trazido a idéia de nanoemulsões para nosso laboratório.

Aos membros da equipe do Laboratório de Embalagens, sou imensamente grata pela amizade, auxílio e ensinamentos, em especial à Cristiane Patrícia, Solange de Sousa, Roberta Carelli, Flávia Abreu, Paula Espitia, Márcia Antunes e Maria Célia Torres que foram minhas grandes amigas nestes momentos de caminhada em busca do conhecimento.

Muito obrigada.

BIOGRAFIA

Silvania Farias Oliveira Pontes, filha de Zoraide Farias Oliveira e de Raimundo Fernando Oliveira, nasceu em Ipiaú-Ba, Brasil, em 03 de Abril de 1982.

Em julho de 2006 concluiu o curso de Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-Ba.

Ingressou em março de 2007 no curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, concluindo-o em maio de 2009.

Ingressou em agosto de 2009 no curso de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, concluindo-o em outubro de 2013.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1. Material	9
2.2. Determinação da composição dos óleos essenciais	9
2.3. Preparo das nanoemulsões de óleos essenciais	10
2.4. Avaliação da estabilidade preliminar das nanoemulsões	10
2.5. Otimização do processo para obtenção de nanoemulsões	11
2.6. Efeito do volume de produção da nanoemulsão na estabilidade das gotículas de óleos essenciais	11
2.7. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões de óleos essenciais de cravo, de canela e de orégano	12
2.8. Análises físico-química	12
2.8.1. Avaliação de estabilidade macroscópica e de estresse térmico	12
2.8.2. Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais	13
2.8.3. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	13
2.8.4. Determinação da condutividade elétrica	13
2.8.5. Medidas de turbidez	14
2.9. Análises Microscópicas	14
2.9.1. Microscopia eletrônica de transmissão	14
2.9.2. Microscopia eletrônica de varredura	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1. Determinação da composição dos óleos essenciais	16
3.2. Avaliação da estabilidade preliminar das nanoemulsões	18
3.3. Otimização do processo para obtenção das nanoemulsões	20
3.4. Efeito do volume de produção da emulsão na estabilidade das nanoemulsões de óleo essencial de cravo	21

3.5. Avaliação da estabilidade e caracterização físico-química de nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo, canela e orégano.....	22
3.5.1. Avaliação macroscópica e teste de estresse térmico	22
3.5.2. Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais	22
3.5.3. Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH)	24
3.5.4. Determinação da condutividade elétrica	25
3.5.5. Medidas de turbidez	26
3.5.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	26
3.5.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	28
4. CONCLUSÕES	29
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 2.....	35
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1. Material	40
2.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	40
2.2.1. Preparo das soluções de óleos essenciais	41
2.2.2. Inoculação	41
2.3. Produção dos filmes ativos antimicrobianos.....	42
2.3.1. Preparo das nanoemulsões de óleos essenciais	42
2.3.2 Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais nas nanoemulsões.....	43
2.3.3. Preparo dos filmes.....	43
2.4. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos filmes ativos	45
2.5. Caracterização dos filmes	45
2.5.1. Espessura.....	45
2.5.2. Propriedades mecânicas	45
2.5.3. Taxa de permeabilidade ao vapor de água	46
2.5.4. Propriedades ópticas	46
2.5.4.1. Transparência	46
2.5.4.2. Análise de cor.....	47
2.5.5. Caracterização microscópica.....	47
2.5.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
2.5.5.2. Microscopia de força atômica (MFA).....	47
2.5.6. Hidrofobicidade da superfície	47

2.5.7. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	49
.....	49
2.6. Análises Estatísticas	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1. Determinação da concentração mínima inibitória	50
3.2. Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais nas nanoemulsões	52
3.3. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos filmes	53
3.4. Análises de Caracterização dos filmes	55
3.4.1. Espessura	55
3.4.2. Propriedades mecânicas	55
3.4.3. Taxa de permeabilidade ao vapor de água	57
3.4.4. Propriedades ópticas	58
3.4.4.1. Transparência	58
3.4.4.2. Análise de cor	59
3.4.5. Caracterização microscópica	60
3.4.5.1. Microscopia eletrônica de varredura	60
3.4.5.2. Microscopia de força atômica	61
3.4.6. Hidrofobicidade da superfície	63
3.4.7. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	65
.....	65
4. CONCLUSÕES	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CAPÍTULO 3	74
1. INTRODUÇÃO	76
2. MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1. Material	79
2.2. Produção dos filmes ativos antimicrobianos	79
2.2.1. Preparo das nanoemulsões de óleos essenciais	79
2.2.2. Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais nas nanoemulsões	80
2.2.3. Preparo dos filmes	80
2.3. Sistema de acondicionamento dos pães de forma nas embalagens ativas	81
2.3.1. Produção dos pães de forma	81
2.3.2. Acondicionamento dos pães nas embalagens antimicrobianas individuais	82
2.4. Avaliação microbiológica dos pães de forma acondicionados nos diferentes filmes antimicrobianos	84

2.4.1. Preparo das amostras de pães de forma para análise microbiológica	84
2.4.2. Contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	84
2.4.3. Contagem de leveduras e bolores	84
2.5. Avaliação das propriedades físico-química dos pães de forma ao longo do armazenamento	85
2.5.1. Textura	85
2.5.2. Umidade	85
2.5.3. Acidez	85
2.5.4. Potencial hidrogeniônico (pH)	85
2.5.5. Análise de cor	85
2.6. Grupo de Foco	86
2.6.1. Recrutamento	86
2.6.2. Sessões de Grupo de Foco	86
2.7. Análises estatísticas dos resultados	88
3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1. Determinação do diâmetro das gotículas das nanoemulsões óleo/água	89
3.2. Avaliação microbiológica dos pães	90
3.2.1. Contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	90
3.2.2. Contagem de leveduras e bolores	90
3.4. Avaliação da qualidade dos pães ao longo do armazenamento	95
3.4.1. Textura	95
3.4.2. Umidade	96
3.4.3. Acidez	97
3.4.4. Potencial Hidrogeniônico (pH)	98
3.4.5. Análise de cor	99
3.5. Avaliação Sensorial	101
3.5.1. Grupo de foco	101
4. CONCLUSÕES	106
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CONCLUSÕES GERAIS	112

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de cravo.....	16
Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de orégano.....	17
Figura 3. Cromatograma do óleo essencial de canela.....	18
Figura 4. Nanoemulsões de óleo essencial de cravo. A - nanoemulsões instáveis e B - nanoemulsões estáveis.	19
Figura 5. Superfície de Resposta para o diâmetro de gotículas de óleo essencial em nanoemulsão.....	20
Figura 6. Distribuição de diâmetro de gotículas das nanoemulsões O/A: A – nanoemulsão do óleo essencial de canela; B - nanoemulsão do óleo essencial de cravo; C- nanoemulsão do óleo essencial de orégano.....	23
Figura 7. Variação da condutividade elétrica de nanoemulsões de óleos essenciais de orégano e canela em função do tempo de armazenamento.	25
Figura 8. Micrografias das nanoemulsões dos diferentes óleos essenciais, obtidas através do MET. A: canela; B: cravo; C: orégano.	27
Figura 9. Micrografias das nanoemulsões dos diferentes óleos essenciais, obtidas por MEV. A: canela; B: cravo; C: orégano.	28

CAPITULO 2

Figura 1. Processo de produção dos filmes. A e C: Soluções filmogênicas nas placas de vidro; B e D: filmes obtidos após secagem das soluções filmogênicas.	44
Figura 2. Halos de inibição característicos formados em resposta a ação antimicrobiana dos filmes de metilcelulose incorporados com nanoemulsões O/A para avaliação antimicrobiana dos fungos: A - <i>Aspergillus niger</i> ; B- <i>Penicillium spp.</i>	53
Figura 3. Características das placas sem formação de halos em resposta a ação antimicrobiana dos filmes de metilcelulose controle para a avaliação antimicrobiana dos fungos: A - <i>Aspergillus niger</i> ; B- <i>Penicillium spp.</i>	54
Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de filmes de metilcelulose: (A)- filme controle; (B)- filme com emulsões (O/A) do óleo essencial de cravo; (C)- filmes com nanoemulsões (O/A) do óleo essencial de cravo; (D)- filme com emulsão O/A do óleo essencial de orégano; (E) - filme com nanoemulsão O/A do óleo essencial de orégano.....	61

Figura 5. Microscopia de Força Atômica (AFM) de filmes de metilcelulose controle (A e B); incorporados com emulsões aquosas dos óleos essenciais de cravo (C e D); com nanoemulsões do óleo essencial de cravo (E e F); incorporados com emulsões aquosas dos óleos essenciais de orégano (G e H) e com nanoemulsões do óleo essencial de orégano (I e J).....	62
---	----

CAPITULO 3

Figura 1. Filme obtido após polimerização e secagem.	81
Figura 2. Fluxograma da produção dos pães de forma.	82
Figura 3. Sistema de acondicionamento dos pães de forma. A: Folha de polipropileno metalizada; B: fixação da fita dupla face; C: Fixação dos filmes incorporados com as emulsões; D: acondicionamento dos pães de forma.	83
Figura 4. Distribuição dos diâmetros de gotículas dos óleos essenciais de cravo (A) e orégano (B) em nanoemulsões aquosas.	89
Figura 5. Crescimento de leveduras e bolores ao longo do armazenamento de pães de forma embalados nos diferentes filmes ativos durante 15 dias de armazenamento a 25 °C.	91
Figura 6. Pães de forma sem adição de conservantes (A e B); utilizando-se conservante tradicional (C e D); utilizando-se filmes incorporados com EC (E e F); com filmes incorporados com NC (G e H); utilizando-se filmes incorporados com EO (I e J); com filmes incorporados com NO (K e L); após 15 dias de armazenamento a 25 °C.	93
Figura 7. Variação da textura (N) das amostras de pães de forma ao longo de 15 dias de armazenamento a 25 °C.	95
Figura 8. Variação da acidez (% ácido acético) das amostras de pães de forma durante o armazenamento a 25°C por 15 dias.....	98
Figura 9. Variação do pH das amostras de pães de forma durante o armazenamento a 25°C por 15 dias.....	99

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1. Níveis codificados e decodificados das variáveis independentes usados nos ensaios.....	11
---	----

CAPITULO 2

Tabela 1. Composição dos filmes. EC - filmes incorporados com emulsões do óleo essencial de cravo; NC - filmes incorporados com nanoemulsões do óleo essencial de cravo; EO- filmes incorporados das emulsões do óleo essencial de orégano; NO- filmes incorporados das nanoemulsões do óleo essencial de orégano e C - filme sem incorporação de óleo essencial (controle).....	45
Tabela 2. Concentração mínima inibitória para o fungo <i>Aspergillus niger</i> em resposta a diferentes concentrações dos óleos essenciais de cravo e orégano.....	50
Tabela 3. Concentração mínima inibitória para o fungo <i>Penicillium</i> spp. em resposta a diferentes concentrações dos óleos essenciais de cravo e orégano.....	50
Tabela 4. Valores médios de diâmetro das gotículas dos óleos essenciais de cravo e de orégano nas nanoemulsões O/A.....	53
Tabela 5. Propriedades mecânicas de filmes de metilcelulose (C) incorporados com emulsões tradicionais (EC e EO), e com nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano (NC e NO).....	56
Tabela 6. Valores médios da análise de colorimetria dos filmes de metilcelulose (C) incorporados com emulsões tradicionais (EC e EO), e com nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano (NC e NO) nas coordenadas de cor L*; a* e b*.....	59

CAPITULO 3

Tabela 1. Composição dos filmes produzidos: EC - filmes incorporados com emulsões do óleo essencial de cravo; NC - filmes incorporados com nanoemulsões do óleo essencial de cravo; EO- filmes incorporados com emulsões do óleo essencial de orégano; NO- filmes incorporados com nanoemulsão de orégano e C- filme sem incorporação de óleo essencial (controle).....	81
Tabela 2. Valores médios de umidade(%) das amostras de pães de forma ao longo do armazenamento.....	97

RESUMO

PONTES, Silvania Farias Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2013. **Desenvolvimento de nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas em filme de metilcelulose para uso em alimentos.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: Eber Antonio Alves Medeiros e João de Deus Souza Carneiro.

Objetivando minimizar o impacto ambiental causado pelos polímeros convencionais, alternativas de uso de polímeros biodegradáveis como metilcelulose vem sendo proposto. Aliado a isso, a produção de filmes incorporados com antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais podem promover uma melhoria na segurança e vida útil dos alimentos. Objetivou-se com este trabalho desenvolver nanoemulsões do tipo óleo/água de óleos essenciais e incorporá-las em filme de metilcelulose para a produção de embalagens ativas, bem como, avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* e em pães de forma e, as propriedades mecânicas e de barreira destes filmes. Além de caracterizá-los em relação as propriedades ópticas, espectroscopia transformada de Fourier (FTIR), observar as estruturas dos filmes obtidos através das técnicas de microscopias eletrônica de varredura e de força atômica. Para o estudo *in vivo*, fatias de pães de formas foram acondicionadas nos filmes e tiveram a qualidade microbiológica, físico-química e sensorial estudados. Nas condições utilizadas para a produção das nanoemulsões contendo 1,5% de Tween 80 e 2,0% de óleo essencial, potência de 400 W e com frequência de 20 kHz por 10 minutos no homogeneizador ultrassônico, nanoemulsões de óleos essenciais foram formadas e apresentaram diâmetro variando de 120 a 230 nm, sem apresentar sinais de instabilidade macroscópicos (visuais). Observou-se que, as incorporações das nanoemulsões nos filmes possibilitaram a ação antimicrobiana para os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium spp in vitro* e, foram efetivos na redução das contagens de leveduras e bolores em fatias de pães de forma por 15 dias de armazenamento. Notou-se a extensão da vida de prateleira dos pães de forma para 10 dias, sem a visibilidade de desenvolvimento fúngico. Quanto às propriedades mecânicas, a incorporação da nanoemulsões de óleos essenciais não afetou a resistência à tração, mas acarretou no aumento do alongamento, além disso, promoveu modificações no módulo de elasticidade, tornando-os menos rígidos. A taxa de permeabilidade ao vapor de água e a hidrofobicidade de superfície dos filmes não foram alteradas pela incorporação das nanoemulsões. Os filmes mostraram excelentes características de transparência no comprimento de onda de 210 nm e de acordo com os parâmetros de cor L*, a* e b* os filmes apresentaram coloração amarela clara. As imagens do microscópio eletrônico de

varredura e da microscopia de força atômica revelaram estruturas das gotículas esféricas de diâmetro na faixa de 150 a 250 nm, sendo que estes diâmetros foram similares aos obtidos na análise de espalhamento de luz. De acordo com a análise dos espectros do FTIR, observou-se que as interações entre o polímero e as nanoemulsões foram bem semelhantes independentes da formação ou não de nanoemulsões, mas, diferentes pela composição de cada óleo. Quanto à qualidade físico-química e sensorial dos pães embalados, ao longo do armazenamento, notou-se que as amostras de pães de forma foram se tornando mais duros, e seu teor de umidade sofreu variações que se correlacionaram diretamente com as variações no parâmetro de textura. Os parâmetros de pH, acidez e cor das amostras de pães não foram afetados pela incorporação das nanoemulsões dos óleos essenciais. Por meio das sessões de grupo de foco, percebeu-se que as utilizações das embalagens antimicrobianas interferiram negativamente nas características sensoriais dos pães de forma e, assim, acarretaram em rejeição destes. Além disto, notou-se ainda que a expressão “embalagem ativa” é um conceito inovador, e pouco conhecido pelos consumidores de pão de forma, necessitando de mais divulgação para ampliar o conhecimento deste conceito, além de elucidar possíveis dúvidas sobre este sistema de embalagens.

ABSTRACT

PONTES, Sylvania Farias Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2013. **Development of nanoemulsions of essential oils incorporated methylcellulose film for use in food.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coadviser: Eber Antonio Alves Medeiros and João de Deus Souza Carneiro.

Aiming minimize the environmental impact induced by conventional polymers, alternatives like biodegradable polymers use, as methylcellulose, has been proposed. In addition, film production incorporated with natural antimicrobials, as essential oils, can promote an improvement in foods safety and shelf life. The purposes of this work was to develop essential oils nanoemulsions, like oil/water, and incorporate themselves to methylcellulose films aiming to produce active packaging; evaluate the *in vitro* and in loaf bread antimicrobial effect and the mechanicals and barriers properties of this film. In addition to the optical properties characterization, Fourier transform spectroscopy and the obtained films structures observation through the Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy were techniques applied in this work. For the *in vivo* study, slices of loaf breads were placed in films and had the microbiological, physico-chemical and sensory qualities evaluated. The conditions employed for the nanoemulsions production containing 1.5% of Tween 80 and 2.0% essential oil were: 400 W of potency and 20 kHz of frequency for 10 minutes in ultrasonic homogenizer. Under these conditions essential oils nanoemulsions were formed and exhibited diameter ranging from 120 to 230 nm, without presenting signs of macroscopic instability (visual). It was observed that the nanoemulsions incorporations in films allowed the antimicrobial activity for *Aspergillus niger* and *Penicillium* spp *in vitro* and were effective reducing yeast and mold counts in sliced loaf breads during 15 days storage. A 10 days prolongation of loaf breads shelf life was noted and no molds development was observed. Regarding the mechanical properties, the essential oils nanoemulsions incorporation do not affected the resistor tensile but resulted in an elongation increasing. In addition it promoted changes in elasticity modulus by making them less rigid. The water vapor rate of permeability and the films surface hydrophilicity were not changed by the nanoemulsions incorporation. At a 210 nm wavelength, the films demonstrated excellent transparency characteristics and according to color parameters L*, a * and b* films exhibited clear yellow staining. Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy pictures showed structures of the spherical droplets whose diameter ranged between 150 and 250 nm. Similar sizes were found in scattered light analysis. According to FTIR spectrum analysis it was observed

that the interactions between the polymer and the nanoemulsions were very similar regardless of the presence or absence of the nanoemulsions formations but were different in each oil composition. The analyses of Physico-chemical and sensory qualities of packed breads, throughout the storage period, showed that the loaf breads hardened and their moisture content ranged directly correlated with the parameter texture variation. Breads samples pH, acidity, and color parameters were not affected by the essential oils nanoemulsions incorporations. Focus group sessions revealed that antimicrobial packaging uses negatively interfered in loaf breads sensory characteristics resulting in their rejection. It was also observed that the expression "active packaging" is a breakthrough concept and unfamiliar for loaf breads consumers. Disclosures are necessary to improve this new concept understanding, besides elucidating possible doubts about this packaging system.

INTRODUÇÃO GERAL

A questão do crescente acúmulo de resíduo não biodegradável nos centros urbanos, aliado às dificuldades de reciclagem da maioria das embalagens, têm gerado sérias preocupações à sociedade e grande interesse para solucionar esta problemática, já que esses fatores constituem grandes problemas ambientais. Desta forma, o desenvolvimento e aplicação de filmes de metilcelulose, como embalagens para alimentos, poderiam fornecer uma alternativa viável e correta ecologicamente.

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como: milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, e outros, sendo na sua maioria biodegradáveis. As fontes renováveis são assim conhecidas por possuírem um ciclo de vida mais curto comparados com as fontes fósseis, como o petróleo, o qual leva milhares de anos para se formar (BRITO *et al.*, 2011).

A embalagem alimentícia constitui uma ferramenta complementar para a conservação de alimentos, podendo garantir que todos os procedimentos adotados para a obtenção de um produto final de qualidade serão assegurados, seja pela proteção contra agentes externos causadores de deterioração do alimento que a embalagem confere ou através de uma interação desejável entre o produto e embalagem. Esta tecnologia, em que ocorre uma interação desejável, entre produto e embalagem é denominada embalagem ativa.

Embalagem ativa é aquela que, através da utilização de um agente ativo incorporado no material polimérico ou adicionado as embalagens, promove funções adicionais às embalagens alimentícias. Estas embalagens podem absorver oxigênio, umidade ou etileno, ou mesmo, adicionar aos alimentos agentes ativos que podem contribuir para a sua conservação e melhoria da qualidade, como substâncias antioxidantes, antimicrobianas e aromáticas.

Dentre os sistemas de embalagens ativas, as embalagens antimicrobianas vêm ganhando destaque. Dentre os agentes antimicrobianos usados destacam-se compostos voláteis como óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008), ácidos orgânicos (SCHIRMER *et al.*, 2009), enzimas como lisozima (MECITOGLU *et al.*, 2006; GEMILI *et al.*, 2009) e estruturas peptídicas como as bacteriocinas nisina e pediocina (SETTANNI e CORSETTI, 2008).

A deterioração de alimentos por ação de micro-organismos é umas das principais causas de perdas da qualidade e segurança de alimentos. Assim, a vida de prateleira de produtos perecíveis, como carne, pescados, legumes e produtos de panificação é

limitada principalmente por crescimento da microbiota.

Neste contexto, o emprego dos óleos essenciais, na produção de filmes ativos aplicados em sistema de embalagens antimicrobianas para alimentos, mostra-se como uma tecnologia interessante, uma vez que, a atividade antimicrobiana de substâncias naturais, como os óleos essenciais, é conhecida há muito tempo, mas, atualmente pesquisas para a aplicação destas substâncias nas diversas indústrias têm aumentado significativamente e, com isso, novas possibilidades de exploração do uso destas substâncias têm surgido. Além disso, os consumidores estão a cada dia buscando um estilo de vida mais saudável e, assim, vêm se tornando mais exigentes no que se refere à utilização de conservantes químicos nos alimentos, muitos optam pelo consumo de produtos naturais e livres de aditivos químicos.

Os óleos essenciais são substâncias naturais de origem vegetal classificados como GRAS (Generally Regarded As Safe - Geralmente Considerado Como Seguro), o que os tornam atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregados em concentrações relativamente elevadas (PEREIRA *et al.*, 2006). Podem ser usados como agentes saborizantes em produtos de panificação, doces, sorvetes, bebidas e chicletes (BURT, 2004; ROJASGRAÜ *et al.*, 2006). Além de serem utilizados como agentes antimicrobianos, têm esta sua atividade antimicrobiana associada a presença de terpenóides e compostos fenólicos, como carvacrol, eugenol e timol (BURT, 2004).

Hoje em dia, os recentes desenvolvimentos alcançados pela nanotecnologia estão sendo considerados em várias áreas de pesquisa, uma vez que a manipulação da matéria em escala nanométrica oferece inúmeras oportunidades. No setor de alimentos, as pesquisas em nanotecnologia têm-se focado na inovação de materiais de embalagem ativos e inteligentes, assim como no desenvolvimento de nanocarregadores, bem como ingredientes e aditivos em tamanho nanométrico ou nanoencapsulados (CHAUDHRY *et al.*, 2010).

A nanotecnologia é uma ciência emergente que tem atraído o interesse de pesquisadores devido ao seu grande potencial de aplicação e por se tratar de uma tecnologia revolucionária, na qual uma nova dimensão de partículas – a nanométrica – tem sido manipulada por profissionais num cenário multidisciplinar, tendo ênfase nos campos da física, química, biologia, ciência dos materiais, eletrônica e até em medicina humana (FERNANDES e FILGUEIRAS, 2008). Neste sentido, nanoemulsões são descritas como sistemas de entrega de ingredientes lipofílicos, nanoencapsulados numa matriz, com um tamanho de gotículas extremamente pequeno (SOLANS *et al.*, 2005;

MASON *et al.*, 2006; McCLEMENTS, 2011).

Nanoemulsões estão ganhando importância no setor de alimentos, devido à sua ampla gama de aplicações potenciais (FLANAGAN e SINGH, 2006; WEISS *et al.*, 2006), como sistemas de entrega em alimentos líquidos (SAGALOWICZ e LESER, 2010) ou produtos hortícolas e frutas minimamente processadas (VARGAS *et al.*, 2008; SOZER e KOKINI, 2009; ROJAS-GRAÜ *et al.*, 2010.).

A aplicação de nanoemulsões com de óleos essenciais para a produção de filmes ativos antimicrobianos à base de metilcelulose pode potencializar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais e melhorar a incorporação destes agentes em matriz polimérica, devido ao encapsulamento das substâncias lipofílicas em um surfactante e, também, a maior área superficial de contato por volume.

Assim, aplicar estes filmes antimicrobianos para preservação de pães de forma, poderá ser uma alternativa viável, já que o pão constitui um dos alimentos mais populares e consumidos devido, em parte, à tradição familiar, às inúmeras alternativas de acompanhamentos, ao sabor leve e agradável e ao baixo custo. Assim, um produto com maior vida útil e com as características sensoriais de sabor e aroma diferenciados podem ser obtidos.

O consumidor representa o destino final de todo e qualquer produto que se desenvolva. Todo empreendimento tem como objetivo final a aceitação e a satisfação de um consumidor. Este fato leva a crer que o esforço primordial de um empreendimento deve ser voltado ao estudo e à percepção dos fatores que determinam o comportamento do consumidor em relação a um produto (DELLA LUCIA, 2008).

Objetivou-se com este trabalho desenvolver nanoemulsões do tipo óleo/água de óleos essenciais e incorporá-las em filme de metilcelulose para a produção de embalagens ativas, bem como, avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* e em pães de forma e as propriedades mecânicas e de barreira destes filmes. Além de caracterizá-los em relação às propriedades ópticas, espectroscopia transformada de Fourier e, observar as estruturas dos filmes obtidos através das técnicas de Microscopias Eletrônica de Varredura e de Força Atômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475.2008.
- BRITO, G.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.; MÉLO, T. Biopolímeros, polímeros Biodegradáveis e Polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processo**, v.6.2, p.127–139, 2011.
- 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.
- CHAUDHRY, Q., WATKINS, R., CASTLE, L. Nanotechnologies in the Food Arena: New Opportunities, New Questions, New Concerns. In: HAUDHRY, Q., CASTLE, L., WATKINS, R. (Eds.). **Nanotechnologies in Food. Cambridge: The Royal Society of Chemistry**, p. 1–17, 2010.
- DELLA LUCIA, S. M. **Métodos estatísticos para avaliação da influência de características não sensoriais na aceitação, intenção de compra e escolha do consumidor**. 2008. 116p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- FERNANDES, M.F.M., FILGUEIRAS, C.A.L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil e seus macro-desafios. **Química Nova**, v.31, n.8, p. 2205-2213, 2008.
- FLOROS, J.D., DOCK, L.L., HAN, J.H. Active packaging technologies and applications. **Food Cosmetics and Drug Packaging**, v. 20, p. 10–17, 1997.
- FLANAGAN, J., SINGH, H. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46(3), p. 221–237, 2006.
- GEMILI, S., YEMENICIOGLU, A., ALTINKAYA, S.A. Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. **Journal of Food Engineering**. v. 90 p. 453–462, 2009.
- MASON, T. G., WILKING, J. N., MELESON, K., CHANG, C. B., GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics Condensed Matter**, 18(41), R635–R666, 2006.
- McCLEMENTS, D. J. EDIBLE NANOEMULSIONS: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7(6), p. 2297–2316, 2011.
- MECITOGLU, Ç., YEMENICIOGLU, A., ARSLANOGLU, A., ELMACI, Z.S., KOREL, F., ÇETIN, A.E. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. **Food Research International**. v. 39, p. 12–21, 2006.
- PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências e Agrotecnologia**, v.30, n.4, p.731–738, 2006.

- ROJAS-GRAÜ, M. A., SOLIVA-FORTUNY, R., MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings: past, present and future. **Stewart Postharvest Review**, v. 6(3), 1–5, 2010.
- ROJAS-GRAÜ, M. A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MARTÍN-BELLOSO, O.; MCHUGH, T. H. Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 9262–9267, 2006.
- SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E. Delivery systems for liquid food products. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 15(1-2), 61–72, 2010.
- SCHIRMER, B.C., HEIBERG, R., EIE, T., MØRETRØ, T., MAUGESTEN, T., CARLEHØG, M., LANGSRUD, S. A novel packaging method with a dissolving CO₂ headspace combined with organic acids prolongs the shelf life of fresh salmon. **International Journal of Food Microbiology**. v. 133, p. 154–160, 2009.
- SETTANNI, L., CORSETTI, A. Review: Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 121, p. 123–138, 2008.
- SOLANS, C., IZQUIERDO, P., NOLLA, J., AZEMAR, N., GARCIA-CELMA, M. J. Nanoemulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.10 (3-4), p.102–110, 2005.
- SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, 27(2), 82–89, 2009.
- VARGAS, M., PASTOR, C., CHIRALT, A., McCLEMENTS, D. J., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 48(6), p. 496–511, 2008.
- WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, v.71(9), p.R107–R116, 2006.

CAPÍTULO 1

ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO (*SYZYGIVM AROMATICUM*), DE CANELA (*CINNAMOMUN ZEYLANICUM*) E DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*).

RESUMO

A produção de nanoemulsões de óleos essenciais estáveis constitui uma tecnologia importante, com várias potencialidades de aplicações. Na área de embalagens para alimentos, as nanoemulsões podem ser utilizadas na produção de filmes ativos e em revestimentos comestíveis. Objetivou-se com o presente trabalho desenvolver nanoemulsões de óleos essenciais de cravo, canela e orégano e avaliar o tamanho e a estabilidade das nanoemulsões produzidas em diferentes volumes e armazenadas por até 72 horas. Nanoemulsões de óleos essenciais de cravo, canela e de orégano foram produzidas por via mecânica em homogeneizador ultrassônico. A estabilidade físico-química das nanoemulsões foram avaliadas por meio das medidas do diâmetro das gotículas formadas, pH, condutividade elétrica e turbidez. A análise da estrutura e a confirmação do diâmetro das gotículas foram realizadas utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. As condições utilizadas para a produção das nanoemulsões contendo 1,5% de Tween 80 e 2,0% de óleo essencial foram: potência de 400 W e frequência de 20 kHz por 10 minutos no homogeneizador ultrassônico. Nanoemulsões de óleos essenciais foram formadas e apresentaram diâmetro das gotículas variando de 120 a 230 nm estáveis por até 72 horas.

1. INTRODUÇÃO

As nanoemulsões são uma classe de nanoemulsões cujo tamanho de gotículas está em torno de 20 - 500 nm (FERNANDEZ *et al.*, 2004; SOLÉ *et al.*, 2006; PEY *et al.*, 2006). Podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho de gotícula é inferior a 200 nm, ou leitosa quando o tamanho está entre 200 e 500 nm (CAPEK, 2004).

Nanoemulsões podem ser produzidas usando alta energia de emulsificação com métodos de homogeneização de alta pressão ou ultra-som, ou usando baixa energia de emulsificação, os quais empregam as propriedades químicas do sistema para criar nanogotículas a partir de uma microemulsão matriz (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004; ANTON *et al.*, 2007; SOLÉ *et al.*, 2010).

Os métodos de obtenção das nanoemulsões, pertencentes ao grupo de alta energia de emulsificação, têm potencial para utilização nas indústrias de alimentos devido tanto à disponibilidade de equipamentos para uso em nível industrial, quanto à capacidade para produzir sistemas nanoemulsificados sem a adição de solventes orgânicos (SALVIA-TRUJILLO *et al.*, 2013). O ultra-som está apto para produzir nanoemulsões com ocorrência reduzida de "processamento excessivo" (JAFARI *et al.*, 2007; LEONG *et al.*, 2009), com baixa polidispersidade e com maior estabilidade, quando comparadas com as nanoemulsões preparadas por outros dispositivos mecânicos (ABISMAÏL, *et al.*, 1999; IZQUIERDO *et al.*, 2005).

A caracterização de formulações em nano-sistemas coloidais requer diversas técnicas básicas como o aspecto visual, pH, diâmetro médio de partícula, superfície de carga de partículas, estabilidade química dos componentes, fornecendo informações úteis (KLANG e VALENTA, 2011). Adicionalmente, para determinação de tamanho de partículas são empregadas técnicas, tais como, de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de microscopia eletrônica de transmissão (MET) que permitem, também, observar a morfologia, tamanho e estrutura das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais vêm sendo aplicados nos diversos setores industriais, como a indústria farmacêutica e de cosméticos, por exemplo. No entanto, a incorporação direta de óleos essenciais em alimentos, ainda, encontra limitações tecnológicas relacionadas com a natureza hidrofóbica, reativa e instável das moléculas bioativas que constituem o óleo essencial (DONSÍ *et al.*, 2012). Além disso, devido à baixa solubilidade em água,

os componentes dos óleos essenciais precisam ser encapsulados em sistemas de carregamento adequados, a fim permanecerem ativos (WEISS *et al.*, 2009).

Estudos realizados por DONSI *et al.*, (2011) enfocaram o encapsulamento de óleos essenciais em sistemas nanométricos de carregamento para incorporação em sucos de frutas. Há interesse considerável no desenvolvimento de sistemas de carregamento para encapsular, proteger e libertar componentes lipofílicos bioativos (PARADA e AGUILERA, 2007, LEE e McCLEMENTS, 2010; LI e McCLEMENTS, 2010).

Assim sendo, nanoemulsões com gotículas de óleos essenciais podem ter novas aplicabilidades. Na área de alimentos, poderão ser utilizadas nos sistemas de embalagens ativas antimicrobianas, conferindo maior efeito antimicrobiano quando comparado à utilização do óleo essencial diretamente nas embalagens, isto porque quando os materiais estão em tamanho nanométrico, geralmente, apresentam maior área superficial de contato em relação ao seu volume. A produção de nanoemulsões com nanogotículas de óleos essenciais apresenta-se como nova possibilidade de aplicação destes óleos essenciais em alimentos.

Muitos polímeros utilizados em embalagens de alimentos como metilcelulose (MC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) são solúveis em água. Para a produção de embalagens ativas com incorporação de óleos essenciais nestas matrizes poliméricas torna-se difícil, devido em parte a sua característica de apolaridade e incompatibilidade com água. Assim, a utilização das nanoemulsões de óleos essenciais nestes polímeros podem melhorar a incorporação dos óleos essenciais na rede polimérica, devido a melhor solubilidade em água quando encapsulado.

Diante das potencialidades de aplicações e de funcionalidade dos sistemas nanométricos, objetivou-se com o presente trabalho desenvolver nanoemulsões de óleos essenciais de cravo, canela e orégano e avaliar o diâmetro e a estabilidade das nanogotículas produzidas em diferentes volumes e armazenadas por até 72 horas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Embalagens para Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa - Minas Gerais, Brasil. Utilizou-se o Delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições.

2.1. Material

Para o preparo das nanoemulsões do tipo óleo em água utilizou-se como fase aquosa, água desionizada e como fase oleosa, óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*), de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) ou de orégano (*Origanum vulgare*), adquiridos da FERQUIMA[®].

Utilizou-se, também, o tensoativo hidrofílico Polissorbato 80 (Tween 80) (Sigma[®]), com valor de Balanço Hidrofílico Lipofílico (BHL) igual a 15,0.

2.2. Determinação da composição dos óleos essenciais

A análise qualitativa da composição do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa GC-MS (modelo 17 A, Shimadzu, Japão, 2006) acoplada a espectrômetro de massa. Para registro e análise dos cromatogramas, o aparelho é acoplado a um microcomputador, utilizando-se o programa GC Solution. Os compostos foram separados e identificados em uma coluna capilar DB-5 (Agilent Technologies[®]) com dimensões 30 m x 250 µm x 0,25 µm.

Para a separação cromatográfica, utilizou-se 1 µL de amostra de cada óleo essencial diluída em 10 mL de diclorometano (1%), injetado-a com auxílio de seringa de 10 µL em sistema Split = 10. O gás hélio com fluxo de 1 mL·min⁻¹ foi utilizado como carreador.

As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C (mantida por 2 minutos), aumentando em 8 °C por minuto até atingir 260 °C, totalizando 27 minutos de análise.

A avaliação dos teores dos constituintes do óleo essencial foi realizada através da biblioteca do espectrômetro de massa acoplado ao GC, escolhendo como critério de seleção para a identificação dos compostos, aqueles que apresentarem similaridade acima de 93%. A massa do composto foi varrida no intervalo de massa de 40 a 400 (m/z).

2.3. Preparo das nanoemulsões de óleos essenciais

Os óleos essenciais e o tensoativo nas diferentes concentrações testadas em cada um dos estudos conduzidos foram adicionados na fase aquosa. A mistura foi homogeneizada com um bastão de vidro até a completa homogeneização dos constituintes da emulsão e submetida ao método de alta energia de emulsificação, utilizando-se o homogeneizador ultrassônico (Modelo DES500, Unique Group), com a micro-ponta na frequência ultrassônica de 20 kHz, variando-se o tempo de processamento e a potência do equipamento de acordo a faixa avaliada em cada estudo específico.

2.4. Avaliação da estabilidade preliminar das nanoemulsões

Objetivando obter nanoemulsões estáveis (sem separação de fases) e com diâmetro das gotículas de óleos essenciais na escala nano, formulações de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) foram produzidas com o óleo essencial de cravo e tensoativo Tween 80, nas concentrações de 2, 10 e 18% e 2, 6 e 10%, respectivamente, realizando-se as combinações dos fatores: tempo de homogeneização de 5, 10 e 15 minutos e potência do homogeneizador ultrassônico de 50, 250 e 400 W. As formulações foram avaliadas por análises macroscópicas (visuais), estresse térmico e diâmetro de gotículas.

A partir dos resultados obtidos nas análises realizadas, novas combinações foram feitas: concentração de óleo essencial de cravo de 2,5, 4,0 e 8%, tensoativo Tween 80 nas concentrações de 1,5; 5,75 e 10% e potência de homogeneização de 250, 350 e 400 W, o tempo da homogeneização no ultrassônico foi fixado em 10 minutos. Todas as formulações foram preparadas no volume de 100 mL. As formulações foram analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0), quanto à estabilidade (avaliação visual e estresse térmico) e ao diâmetro das gotículas de óleos essenciais obtidas.

Como critério de seleção, para a determinação da faixa de concentração de tensoativo e de óleo essencial para obtenção das nanoemulsões a serem produzidas nos estudos posteriores, eliminou-se as concentrações de óleo essencial e tensoativos em que promoveram a separações de fases (instabilidade) nas nanoemulsões. Além disto, concentrações de óleo essencial e de tensoativo, que acarretam em nanoemulsões com diâmetro de gotículas superiores a 300 nm foram eliminadas para os estudos posteriores.

2.5. Otimização do processo para obtenção de nanoemulsões

Objetivando obter as melhores condições para obtenção de nanoemulsões de óleo essenciais estáveis, formulações de nanoemulsões O/A foram produzidas, variando-se a concentração de óleo essencial de cravo (2 a 4%), de tensoativo Twen 80 (1,5 a 2,5%) e fixando o tempo de homogeneização no ultrassônico em 10 minutos e a potência em 400 W. As nanoemulsões obtidas neste estudo foram analisadas imediatamente após o preparo, quanto a estabilidade (avaliação macroscópica e estresse térmico) e diâmetro de gotículas.

Para o estudo do efeito das variáveis independentes: concentração de óleo; concentração e de tensoativo (Tween 80), utilizou-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), utilizando um esquema fatorial 3^2 com quatro pontos centrais, baseado na Metodologia de superfície de resposta.

Os níveis das variáveis independentes (concentração de óleo e concentração de tensoativo) codificadas (%) e não codificadas usados neste estudo estão listados na Tabela 1. A escolha das faixas experimentais utilizadas baseou-se nos resultados obtidos a partir de ensaios preliminares.

Tabela 1. Níveis codificados e descodificados das variáveis independentes usados nos ensaios.

ENSAIO	ÓLEO	TENSOATIVO	ÓLEO (%)	TENSOATIVO (%)
1	-1	-1	2	1,5
2	-1	1	2	2,5
3	1	-1	4	1,5
4	1	1	4	2,5
5	-1	0	2	2,0
6	1	0	4	2,0
7	0	-1	3	1,5
8	0	1	3	2,5
9	0	0	3	2,0
10	0	0	3	2,0
11	0	0	3	2,0
12	0	0	3	2,0

2.6. Efeito do volume de produção da nanoemulsão na estabilidade das gotículas de óleos essenciais

Para verificar a estabilidade das nanoemulsões formadas nas concentrações de 2% de óleo essencial de cravo, 1,5% de tensoativo (Tween 80) em diferentes volumes (10, 50, 100, 150 e 200 mL), utilizando-se o tempo de 10 minutos de homogeneização e a potência de 400 W. As concentrações de tensoativo e, de óleos essenciais utilizadas

foram selecionadas baseando-se nos resultados de otimização da metodologia de Superfície de Resposta descritas no item 2.5.

As nanoemulsões foram armazenadas em frascos de vidro incolor em condições ambientes, temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. As amostras foram avaliadas quanto à estabilidade (avaliação macroscópica e estresse térmico), pH e diâmetro das gotículas nos tempos logo após o preparo (zero) e 72 horas de armazenamento.

2.7. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões de óleos essenciais de cravo, de canela e de orégano

Objetivando averiguar se as condições de obtenção das nanoemulsões estáveis selecionadas na metodologia de Superfície de Resposta poderiam ser aplicadas para a produção de nanoemulsões com diferentes tipos de óleos essenciais. Formulações dos diferentes óleos essenciais (cravo, canela e orégano) foram preparadas com as concentrações de 2% de óleo essencial e 1,5% de tensoativo (Tween 80), concentrações selecionadas de acordo com o resultado obtido na análise de superfície de resposta descritas no item 2.5, fixando-se o tempo de processamento em 10 minutos e a potência ultrassônica em 400 W.

As nanoemulsões foram armazenadas em frascos de vidro incolor em condições ambientes, temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 60 ± 10 %, e avaliadas quanto à estabilidade (avaliação macroscópica, estresse térmico), determinação do tamanho das gotículas, pH, determinação da condutividade elétrica, medidas de turbidez, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura. Estas avaliações foram realizadas imediatamente após o preparo das nanoemulsões (tempo 0), e nos tempos 24, 36, 48 e 72 horas de armazenamento.

2.8. Análises físico-química

2.8.1. Avaliação de estabilidade macroscópica e de estresse térmico

As nanoemulsões de óleos essenciais produzidas foram armazenadas em frascos de vidro incolor tampados para a realização da análise macroscópica (visual), onde foi observada a homogeneidade, a fim de identificar possíveis processos de instabilidade como separação de fases, conforme Martini, 2005.

Na avaliação de estresse térmico, amostras de 5,0 g de cada formulação das nanoemulsões de óleos essenciais foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro, logo após o preparo, e submetidas a aquecimento em banho termostático (modelo 550,

FISATOM Brasil) com temperatura inicial de $40 \pm 2^\circ\text{C}$. A cada 30 minutos a temperatura foi elevada de 5°C até alcançar a temperatura final de 80°C . A cada aumento de temperatura e ao término ($80 \pm 2^\circ\text{C}$), as formulações foram macroscopicamente (visualmente) avaliadas, conforme metodologia citada por Braconi *et al.*, 1995.

2.8.2. Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais

Os diâmetros das gotículas de óleos essenciais formadas nas nanoemulsões, preparadas com as concentrações de 2% de óleo essencial e 1,5% de tensoativo (Tween 80), concentrações selecionadas de acordo com o resultado obtido na análise de superfície de resposta descritas no item 2.5, fixando-se o tempo de processamento em 10 minutos e a potência ultrassônica em 400 W, foram medidos por meio da técnica espectroscópica de espalhamento a laser, utilizando o analisador de tamanho de partículas em nanoescala (Nanophox, Sympatec).

As amostras das nanoemulsões de óleos essenciais foram diluídas em água desionizada na proporção de 1:10 e vertidas na cubeta do equipamento com auxílio de uma pipeta. Esta diluição fez-se necessária, pois o aparelho realiza a leitura numa faixa específica de turbidez da amostra, de modo a evitar espalhamento excessivo da luz por aglomerados formados em amostras concentradas. As medidas de espalhamento de luz foram realizadas com um ângulo de leitura de 90° e a temperatura da amostra mantida a 25°C .

2.8.3. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Para medição do pH, foram tomados aleatoriamente amostras de 5 mL de cada uma das nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo, canela e orégano, preparadas com as concentrações de 2% de óleo essencial e 1,5% de tensoativo (Tween 80), concentrações selecionadas de acordo com o resultado obtido na análise de Superfície de Resposta descritas no item 2.5, fixando-se o tempo de processamento em 10 minutos e a potência ultrassônica em 400 W. O eletrodo foi inserido diretamente na amostra, não sendo necessária diluição prévia devido à fluidez das nanoemulsões (BRASIL, 2004).

2.8.4. Determinação da condutividade elétrica

Uma amostra de 5 mL de cada uma das nanoemulsões preparadas com as concentrações de 2% de óleo essencial e 1,5% de tensoativo (Tween 80), concentrações selecionadas de acordo com o resultado obtido na análise de Superfície de Resposta

descritas no item 2.5, fixando-se o tempo de processamento em 10 minutos e a potência ultrassônica em 400 W, foi colocada em béquer de vidro para a realização da análise de condutividade elétrica.

Medidas da condutividade elétrica das nanoemulsões de óleos essenciais de cravo, canela e orégano foram obtidas usando um condutivímetro (Orion 145+ Thermo Electron Corporation), devidamente calibrado com solução padrão de KCl 0,1 N (BERNARDI, 2011).

2.8.5. Medidas de turbidez

A turbidez das nanoemulsões preparadas com as concentrações de 2% de óleo essencial e 1,5% de tensoativo (Tween 80), concentrações selecionadas de acordo com o resultado obtido na análise de superfície de resposta descritas no item 2.5, fixando-se o tempo de processamento em 10 minutos e a potência ultrassônica em 400 W, foi medida através do uso de um espectrofotômetro GBC UV/VIS 918 no comprimento de onda de 600 nm.

As medidas para monitorar as mudanças nas características das nanoemulsões foram realizadas conforme metodologia proposta por Rao e McClements (2012a) com algumas modificações. Neste trabalho não foram realizadas diluições das formulações obtidas, as nanoemulsões foram analisadas através das leituras da turbidez imediatamente após o preparo e nos tempos 12, 24, 48 e 72 horas de armazenamento.

2.9. Análises Microscópicas

2.9.1. Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliar a morfologia das nanoemulsões preparadas com as concentrações de 2% de óleo essencial e 1,5% de tensoativo (Tween 80), concentrações selecionadas de acordo com o resultado obtido na análise de superfície de resposta descritas no item 2.5, fixando-se o tempo de processamento em 10 minutos e a potência ultrassônica em 400 W, utilizou-se um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, modelo EM 109) a 80 kV de voltagem e aumento de 12.000 vezes, disponibilizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Imediatamente após o preparo, as amostras foram adicionadas em suportes metálicos (200 Mesh) de cobre com revestimento, aguardou-se a secagem por 24 horas em condições ambientes, temperatura de $(25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ e umidade relativa de $(60 \pm 10 \text{ } \%)$.

As visualizações foram realizadas gerando as micrografias das nanoemulsões produzidas por cada tipo de óleo essencial.

2.9.2. Microscopia eletrônica de varredura

As estruturas das nanoemulsões produzidas com as concentrações de 2% de óleo essencial e 1,5% de tensoativo (Tween 80), concentrações selecionadas de acordo com o resultado obtido na análise de Superfície de Resposta descritas no item a 2.5, fixando-se o tempo de processamento em 10 minutos e a potência ultrassônica em 400 W, foram avaliadas usando o microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, modelo DSM 960).

Logo após o preparo das nanoemulsões, uma gota de cada nanoemulsão de óleo essencial foi colocada em stubs e aguardou-se a secagem da amostra por 24 horas em condições ambientes, temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 60 ± 10 %. As amostras foram cobertas com 20 nm de ouro em metalizador (Balzers FDU 010) e, então, observadas e fotografadas.

2.10. Análise Estatística

Os dados foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) em nível de 5% de significância, quando necessário utilizou-se análise de Regressão em nível de 5% e teste t de Student para comparação pareada com o auxílio do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 9.2.

Para o estudo do efeito da concentração de óleo essencial de cravo e de tensoativo na estabilidade e diâmetro das gotículas de óleos essenciais formadas, utilizou-se o Delineamento Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) utilizando um esquema fatorial 3^2 com quatro pontos centrais, baseado na metodologia de Superfície de Resposta, com o auxílio do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 9.2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da composição dos óleos essenciais

O comatograma obtido para a determinação da composição do óleo essencial de cravo apresentou três picos característicos (Figura 1).

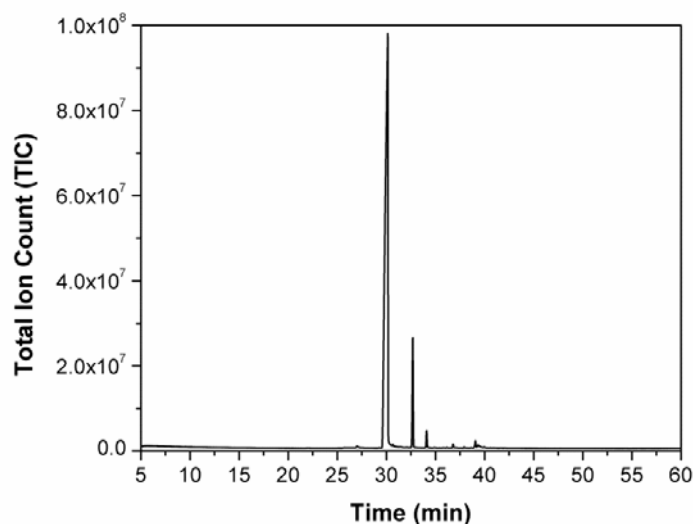


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de cravo.

De acordo aos compostos descritos na biblioteca do espectrômetro de massa com similaridade de 95%, com tempo de retenção de 30 minutos, o composto presente é o eugenol. O segundo pico apresentado no comatograma com 97% de similaridade e com tempo de retenção de 32,64 minutos é o trans-caryofileno. O terceiro pico apresentado no cromatograma com 95% de similaridade e com tempo de retenção de 34,0 minutos é o α -humileno.

Oussalah *et al.* (2006) avaliaram os constituintes do óleo essencial de cravo-da-índia e encontraram 78% de eugenol e 8% de acetato de eugenila.

O eugenol, cujo nome dado pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) é o 4-alil-2-metoxifenol, é um composto fenólico volátil que constitui de 70 a 80% da composição do óleo, sendo utilizado por suas propriedades medicinais como pelas cosméticas. Por apresentar sabor picante e agradável, é muito utilizado na indústria alimentícia. Na odontologia, o eugenol é utilizado como componente de seladores e outros produtos anti-sépticos de higiene bucal, como também, junto com óxido de zinco, para fazer curativo nos dentes, com comprovado efeito bactericida. Alguns trabalhos mostraram que o eugenol apresenta atividade inseticida, antiviral e fungicida (MAZZAFERA, 2003) e atividade analgésica (INOUE *et al.*, 2003).

A composição química dos óleos essenciais depende das condições climáticas, sazonal e geográfica da colheita, período, e técnica de destilação. Além disso, a sua atividade antibacteriana depende do tipo de composição, e concentração da especiaria ou dos óleos essenciais, tipos e concentração do micro-organismo alvo, a composição do substrato, o processamento e as condições de armazenamento (PANIZI *et al.*, 1993; PANDIT e SHELEF, 1994; MARINO *et al.*, 2001; OZCAN e ERKMEN, 2001).

O comatograma obtido para a determinação da composição do óleo essencial de orégano está apresentado na Figura 2.

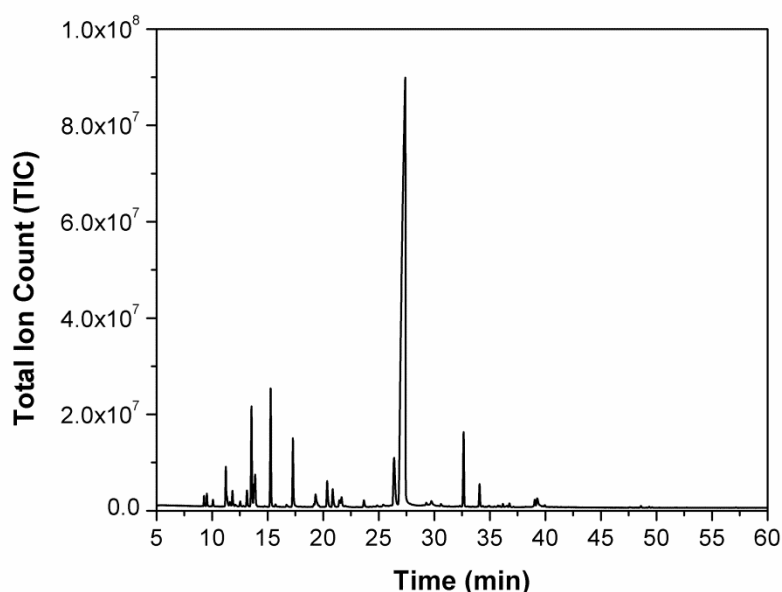


Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de orégano.

Devido à diversidade de compostos presentes na amostra do óleo essencial de orégano, demonstrada pelos diversos picos apresentados, apenas aqueles característicos e descritos na literatura como presentes nas amostras de óleo essencial de orégano serão avaliados.

O pico apresentado no comatograma com 96% de similaridade e com tempo de retenção de 26,28 minutos é o carvacrol. O pico apresentado no comatograma com 96% de similaridade e com tempo de retenção de 17,5 minutos, é o gama-terpineno. De acordo com os compostos descritos na biblioteca do espectrômetro de massa com similaridade de 96% e, com tempo de retenção de 15,21, minutos o composto presente é o timol, e o composto presente com 13,49 minutos é característico do p-cimeno.

No trabalho de Baydar *et al.*(2004), o óleo essencial de orégano é caracterizado por altos teores de carvacrol, c-terpineno e p-cimeno, resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

Milos *et al.* (2000) pesquisando os constituintes do óleo essencial de orégano, identificaram um total de 16 compostos. Entre eles estão 40,4% de timol, 24,8% de carvacrol, 16,8% de p-cimeno, 1,7% de γ -terpineno, 2,1% de 1-octen-3-ol e 2,1% de borneol, confirmando alguns dos compostos identificados em menor quantidade no óleo essencial de *O. vulgare* utilizado.

O cromatograma obtido para a determinação da composição do óleo essencial de canela apresentou três picos característicos (Figura 3).

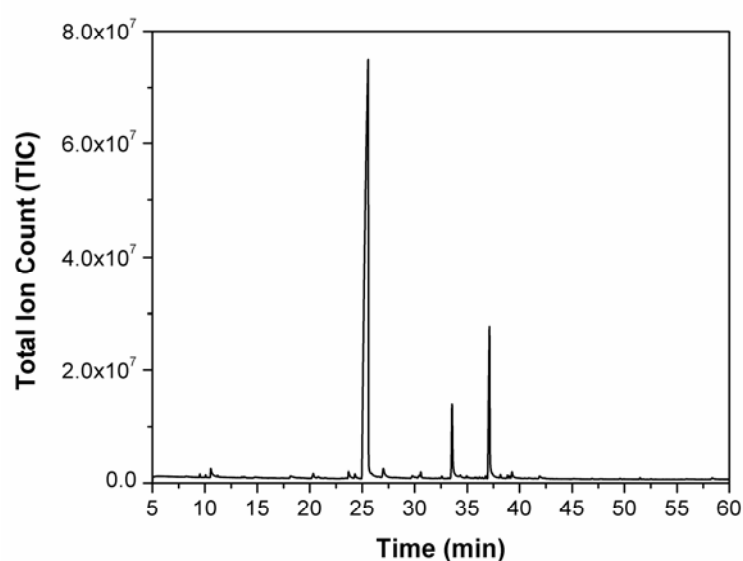


Figura 3. Cromatograma do óleo essencial de canela.

O pico apresentado no cromatograma com 96 % de similaridade e com tempo de retenção de 25,43 minutos é o cinamaldeído (aldeído cinâmico). O pico apresentado no cromatograma com 95% de similaridade e com tempo de retenção de 33,59 minutos é o álcool cinamyl. De acordo aos compostos descritos na biblioteca do espectrômetro de massa com similaridade de 96% e com tempo de retenção de 37,10 minutos, o composto presente é o ortho- methoxy aldeído cinâmico.

3.2. Avaliação da estabilidade preliminar das nanoemulsões

Observou-se instabilidade (separação de fases) nas formulações em que foram utilizadas concentrações de tensoativo muito abaixo ou acima da concentração de óleo essencial; tempos de emulsificação inferiores a 10 minutos e utilização da potência do equipamento inferior a 50% da sua capacidade (250 W).

O estresse térmico é uma ferramenta útil na análise da susceptibilidade de nanoemulsões contendo óleos essenciais, pois estima a ocorrência de possíveis processos de instabilidade em produtos que os contêm, quando expostos ao calor durante seu preparo ou armazenamento (SOROKINA *et al.*, 2002). Observou-se, também, instabilidade frente ao processo de estresse térmico, quando a temperatura foi elevada acima de 50 °C.

Nestas condições, provavelmente, pode ter ocorrido insuficiente processo de redução das gotículas ou insuficiente estabilização pelo emprego do curto tempo do processo e/ou de baixa potência empregada, o que, possivelmente, favoreceu o processo de separação de fases.

Após o preparo das nanoemulsões, a instabilidade foi observada pela separação de fases, sendo uma leitosa e outra oleosa (Figura 4A). As nanoemulsões estáveis apresentaram aparência leitosa e esbranquiçada (Figura 4B). Segundo Capek (2004), as nanoemulsões com aparência leitosa apresentaram o tamanho de gotículas entre 200 e 500 nm.

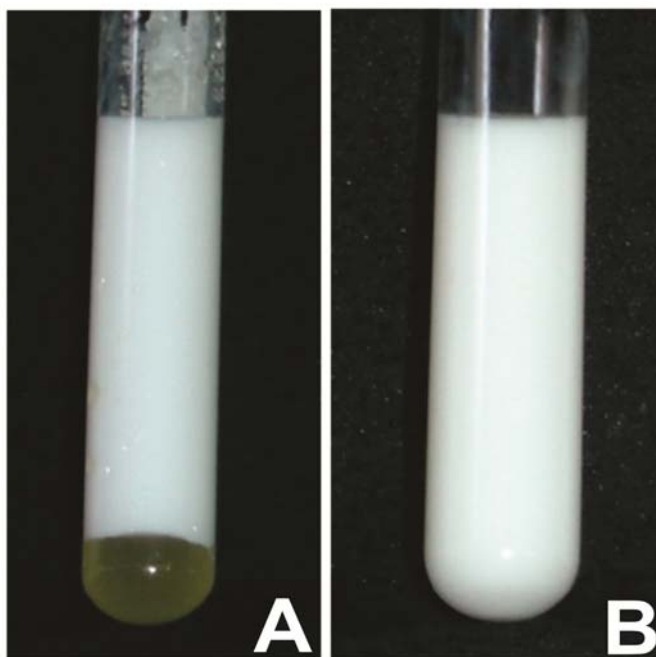


Figura 4. Nanoemulsões de óleo essencial de cravo. A - nanoemulsões instáveis e B - nanoemulsões estáveis.

As nanoemulsões que se mantiveram estáveis frente às condições de estresse térmico apresentaram a mesma aparência obtida após o preparo, enquanto aquelas que não apresentaram resistência ao estresse térmico foram visíveis a separação de fases.

Segundo Camargo (2008), as nanoemulsões que não resistem a altas temperaturas, não são necessariamente instáveis em condições ambientes e de resfriamento.

3.3. Otimização do processo para obtenção das nanoemulsões

Na Superfície de Resposta, é possível observar que a variação dos diâmetros das gotículas formadas nas nanoemulsões em função das concentrações de óleo essencial de cravo (2 a 4%) e de tensoativo (1,5 a 3,0%) (Figura 5).

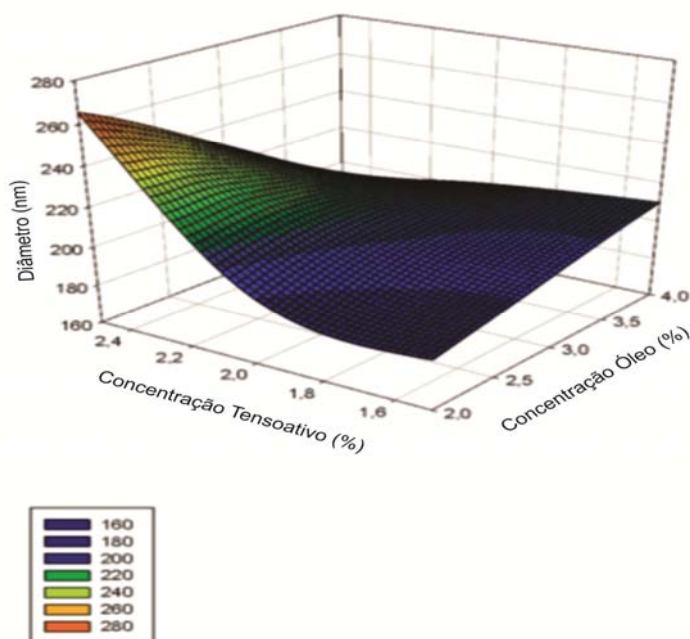


Figura 5. Superfície de Resposta para o diâmetro de gotículas de óleo essencial em nanoemulsão

O diâmetro das gotículas de óleos essenciais não apresentaram diferenças ($p > 0,05$). O tamanho das gotículas é uma das análises mais importantes para caracterizar nanoestruturas, além de ser uma medida quantitativa.

As nanoemulsões apresentaram um diâmetro médio de gotículas de 223 ± 63 nm, estando este tamanho dentro da faixa dos tamanhos nanométricos. Segundo Solé *et al.* (2006) e Pey *et al.*, (2006), as nanoemulsões são uma classe de emulsões cujo diâmetro de gotículas está em torno de 20 - 500 nm. LI *et al.* (2010) relatam que o tamanho de gotículas é um parâmetro de estabilidade, sendo relevante e de grande importância para os sistemas emulsionados.

A análise das nanoemulsões que sofreram o processamento no ultrassônico, apresentaram perfil de distribuição de diâmetro de gotículas monomodal e uniforme, com a presença de apenas uma distribuição de tamanho, e não apresentaram polidispersividade. Pode-se afirmar que tal resultado é devido à etapa de

homogeneização no ultrassônico, que promoveu a quebra das gotículas grande, e a formação de novas micelas menores e mais uniformes.

Segundo Kralova e Sjöblom (2009), tensoativos não-iônicos, tais como Tween 80, são surfactantes moleculares capazes de adsorver as superfícies das gotículas, facilitando o rompimento das gotas e formando uma proteção contra a agregação das gotas.

Todas as formulações não apresentaram separação de fases logo após o preparo e quando submetidas ao teste de estresse térmico, não apresentando sinais de instabilidade macroscópica até a temperatura de 85 °C pelo período de 30 minutos.

Dentre estas formulações, a formulação com 2 % de óleo essencial e 1,5 % de tensoativo nas condições de homogeneização de 400 w por 10 minutos apresentou potencial de uso pelo menor consumo de materiais, ou seja, menor gasto de óleo essencial e de tensoativo. As gotículas de óleos essenciais apresentaram-se em escala nano e estáveis.

3.4. Efeito do volume de produção da emulsão na estabilidade das nanoemulsões de óleo essencial de cravo

As nanoemulsões produzidas com volumes variando de 10 a 200 mL apresentaram estabilidade macroscópica (visual) pelo período de 72 horas. Quando submetidas ao teste de estresse térmico, não apresentaram sinais de instabilidade macroscópica até a temperatura de 85 °C pelo período de 30 minutos. Estes resultados condizem com os obtidos por Morais *et al.* (2006), em sistema composto de emulsão com nanoemulsão óleo de canola e tensoativos não-iônicos etoxilados.

Verificou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) no diâmetro das gotículas de óleo essencial de cravo para os diferentes volumes de nanoemulsões, imediatamente após o preparo (tempo 0). Ou seja, com as variações nos volumes, não ocorreram variações dos tamanhos das gotículas do óleo essencial de cravo, apresentando valor médio de diâmetro de 165 ± 22 nm.

Após 72 horas de armazenamento, as formulações apresentaram um diâmetro de gotículas médio de 188 ± 48 nm. Ao comparar o diâmetro das gotículas de óleo essencial de cravo nas nanoemulsões, imediatamente após a obtenção com o diâmetro das gotículas após 72 horas de armazenamento, verificou-se pelo teste t de Student para comparação pareada, que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) do diâmetro com o tempo de armazenamento. Contudo, mesmo com a tendência de aumento significativo

no diâmetro das gotículas, ainda, é considerado nanométrico e as nanoemulsões mantiveram estáveis, sem separação de fases.

Com relação ao pH, não houve variação significativa ($p > 0,05$) para os diferentes volumes. As nanoemulsões do óleo essencial de cravo produzidas com diferentes volumes apresentaram pH médio inicial de $5,74 \pm 0,35$.

Ao comparar o diâmetro das gotículas de óleo essencial de cravo nas nanoemulsões, imediatamente após a obtenção com o diâmetro das gotículas após 72 horas de armazenamento, verificou-se pelo teste t de Student que não houve diferença ($p > 0,05$) do pH das nanoemulsões, apresentando pH médio de $5,83 \pm 0,25$.

3.5. Avaliação da estabilidade e caracterização físico-química de nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo, canela e orégano.

3.5.1. Avaliação macroscópica e teste de estresse térmico

As nanoemulsões produzidas com os óleos essenciais de cravo, canela e orégano apresentaram estabilidade macroscópica (visual) pelo período de 72 horas. Quando submetidas ao teste de estresse térmico não apresentaram sinais de instabilidade macroscópica até a temperatura de 85 °C pelo período de 30 minutos. Segundo Pereira (2011) os tensoativos são moléculas que se adsorvem na interface dispersa e dispersante, tendo a dupla função de reduzir a tensão interfacial e estabilizar o sistema prevenindo fenômenos de instabilidade que poderão causar a separação de fases do sistema.

3.5.2. Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais

Os diâmetros médios das gotículas dos óleos essenciais de cravo, de canela e de orégano formadas nas nanoemulsões, foram, respectivamente, 230 ± 24 , $120 \pm 1,5$ e 181 ± 14 nm após 72 horas de armazenamento. Constatou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) no diâmetro das gotículas em função do tempo para nenhuma das formulações estudadas, demonstrando que para todos os óleos essenciais (cravo, canela e orégano) avaliados os diâmetros das gotículas nas nanoemulsões mantiveram-se estáveis, ou seja, sem alterações com o tempo. Os gráficos típicos de distribuição de diâmetro de gotículas dos óleos essenciais estão ilustrados na Figura 6.

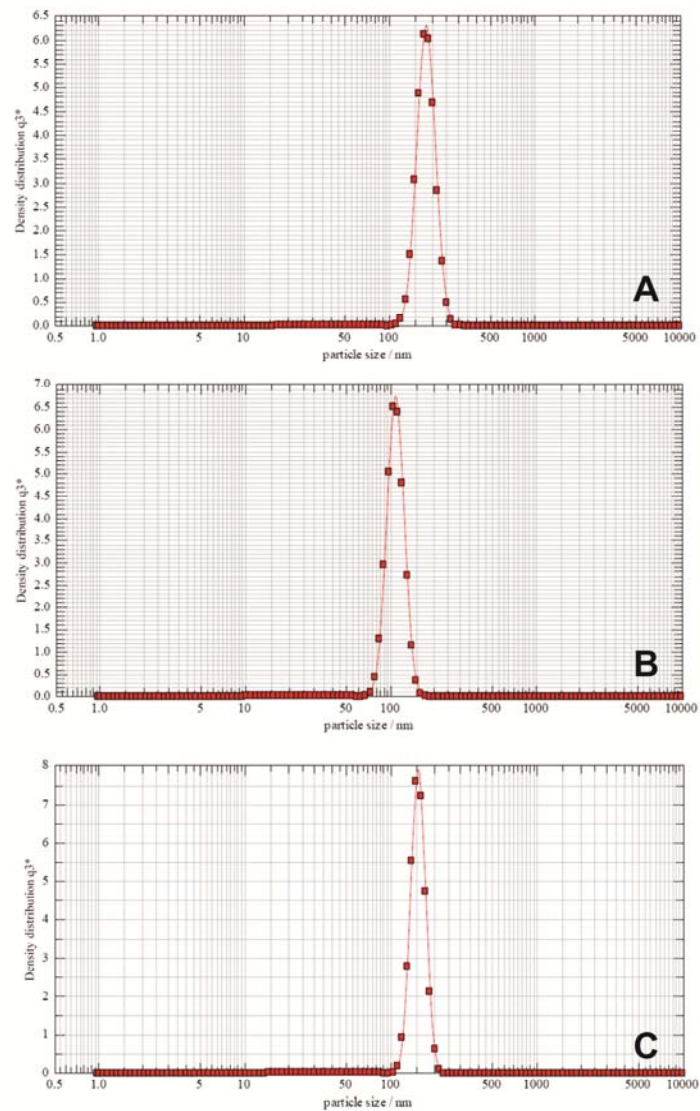


Figura 6. Distribuição de diâmetro de gotículas das nanoemulsões O/A: A – nanoemulsão do óleo essencial de canela; B - nanoemulsão do óleo essencial de cravo; C- nanoemulsão do óleo essencial de orégano.

Kulmyrzaev e Schubert (2003) e Roland *et al.*(2003) relataram que medidas do tamanho das gotículas, após o preparo e durante o período de armazenamento fornecem indicação sobre a estabilidade do sistema: quanto mais rápido as gotículas aumentam de tamanho, menor a estabilidade do sistema. Rao e McClements (2012a) observaram um aumento no diâmetro médio das gotículas das nanoemulsões de óleo de limão após armazenagem, de cerca de 217 nm, imediatamente após o seu preparo, para 296 nm após o armazenamento durante uma noite. Em estudos com óleos similares Rao e McClements (2012b) atribuíram à distribuição bimodal (duas distribuições de tamanhos de gotículas), formada depois do armazenamento durante a noite, à instabilidade destes sistemas a maturação de Ostwald.

Li e Chiang (2012) avaliaram o tamanho das gotículas de nanoemulsões de D-limoneno em água usando instrumento de dispersão de luz e observaram que o tamanho das gotículas aumentou nas duas temperaturas avaliadas, variando de 31,2 a 99,1 nm (4 °C) e de 27,4 a 58,8 nm (25 °C), durante 49 dias de armazenamento. Contudo, mesmo com o aumento de tamanho, ainda estavam dentro dos limites aceitáveis para nanoemulsões.

No trabalho de Donsi *et al.* (2011) os autores empregaram alta energia de emulsificação por meio de microfluidização e relataram tamanhos de gotas entre 74,4 a 356,7 nm em nanoemulsões de D-limoneno e, ou uma mistura de terpenos com várias formulações e processados durante 10 ciclos a 300 MPa.

3.5.3. Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH)

As nanoemulsões de óleos essenciais de cravo e de orégano apresentaram valores médios do pH de $5,98 \pm 0,11$ e $5,96 \pm 0,13$, respectivamente, não ocorrendo variações ($p > 0,05$) com o tempo. No entanto, na nanoemulsão de óleo essencial de canela houve variação ($p < 0,05$) do pH em função do tempo, apresentando valores entre 4,35 a 4,65. Não houve ajuste satisfatório para nenhum modelo de regressão. Apesar de ter ocorrido variação do pH com o tempo de armazenamento, estes valores de pH não afetariam uma possível aplicação destas nanoemulsões em sistemas de embalagens ativas para alimentos.

Observou-se que nas nanoemulsões de óleos essenciais analisadas não ocorreu a diminuição do pH com o tempo de armazenamento, indicando que não houve hidrólise nas formulações produzidas. Martini (2005) relatou que a análise do valor do pH é um teste importante durante o monitoramento da estabilidade das nanoemulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de nanoemulsões formuladas com óleos vegetais, a diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que geram ácidos graxos livres.

Os valores de pH encontrados para as nanoemulsões de óleo essencial de cravo e orégano foram similares aos valores de nanoemulsões de óleo de arroz encontrados por Bernadi (2011), na faixa de pH 6,0.

O aumento do pH com o tempo de armazenamento, provavelmente, foi devido a melhor solubilização da fase oleosa com o tensoativo. Assim, com o tempo de armazenamento, pode ter ocorrido estabilização do sistema.

3.5.4. Determinação da condutividade elétrica

Com relação ao parâmetro condutividade elétrica, as nanoemulsões produzidas com os óleos essenciais de canela e orégano apresentaram diferença ($p \leq 0,05$), ocorrendo aumento durante o armazenamento (Figura 7).

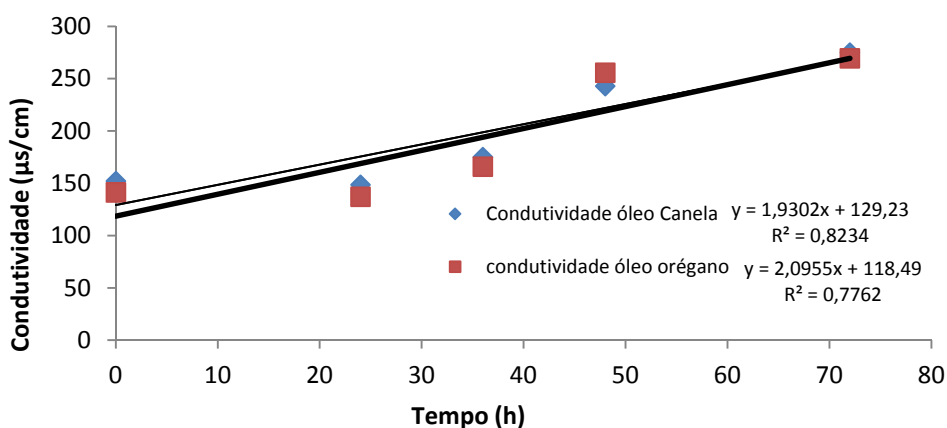


Figura 7. Variação da condutividade elétrica de nanoemulsões de óleos essenciais de orégano e canela em função do tempo de armazenamento.

Ao analisar os coeficientes dos modelos ajustados, nota-se que com o aumento no tempo em 1 hora, espera-se, em média, o aumento de 1,930 e 2,095 $\mu\text{s/cm}$ na condutividade elétrica, para as formulações com os óleos essenciais de canela e de orégano, respectivamente.

As formulações preparadas com o óleo essencial de cravo não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) da condutividade elétrica com o tempo de armazenamento, apresentando valor médio de $221,500 \pm 78,509 \mu\text{s/cm}$.

As variações na condutividade elétrica devem-se à ocorrência de processos de instabilidade química, como hidrólise, que poderá provocar a liberação de íons no meio aquoso, aumentando a condução de corrente elétrica (BERNARDI, 2011). Esta hidrólise pode ser causada por componentes presentes nos óleos essenciais, já que em estudos realizados com óleos vegetais, como o óleo de canola (SANTOS, 2006), urucum e café (MORAIS, 2006), as variações na condutividade elétrica não foram significativas.

Masmoudi *et al.* (2005) relataram que é difícil avaliar a estabilidade de nanoemulsões somente pela condutividade elétrica, porque não há uma relação linear entre o aumento da condutividade elétrica e o fenômeno de instabilidade. Correlacionando a análise da condutividade elétrica com a avaliação do pH,

possivelmente, não houve processo de hidrólise nas nanoemulsões, já que não ocorreu diminuição no pH, o que poderia confirmar a ocorrência deste processo.

A condutividade elétrica pode ser um parâmetro indicativo de instabilidade e influencia na granulometria das nanoemulsões, uma vez que o aumento pode estar relacionado com a coalescência e a diminuição com a agregação das gotículas (BRASIL, 2004). A alteração dos valores de condutividade não interferiu na granulometria das nanoemulsões com o armazenamento. Desse modo, não se pode concluir qual nanoemulsão (produzida por qual tipo de óleo essencial) foi a mais estável, somente pela avaliação deste parâmetro, devendo levar em consideração a análise dos demais parâmetros avaliados.

Bernadi (2011) relata valores de condutividade elétrica de 70 a 200 $\mu\text{s}/\text{cm}$ para as nanoemulsões de óleo de arroz, valores bem próximos ao encontrados para as nanoemulsões de óleos essenciais obtidas neste estudo.

3.5.5. Medidas de turbidez

As nanoemulsões apresentaram valores médios de $3,5964 \pm 0,1099$; $3,6259 \pm 0,2051$ e $3,8901 \pm 0,1401 \text{ cm}^{-1}$ para os óleos essenciais de canela, orégano e cravo, respectivamente, e não variaram ($p > 0,05$) com o tempo de armazenamento. Segundo Rao e McClements (2012a) as medidas de turbidez pelo tempo fornecem informações sobre a velocidade e extensão da solubilização das gotículas de óleo em água na emulsão. Geralmente, uma elevação da turbidez em nanoemulsões pode ser atribuída a um aumento no número de gotículas de óleo presentes nas dispersões coloidais e não solubilizadas em água. Os autores relataram resultados similares aos encontrados neste trabalho para avaliação da turbidez, onde estão listados valores entre 3,0 a 4,0 cm^{-1} . Notaram, também, que na ausência de micelas do surfactante (0% de Tween 80), a turbidez das nanoemulsões permaneceu constante ao longo do tempo, indicando que as gotículas de óleos essenciais não foram solubilizadas pela solução aquosa.

A elevação da turbidez nas formulações avaliadas não foi verificada, demonstrando que, possivelmente, as gotículas de óleo presentes nas nanoemulsões, não foram solubilizadas pela solução aquosa. Logo, as nanoemulsões de óleos essenciais apresentaram estabilidade quanto ao parâmetro de turbidez.

3.5.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As fotomicrografias obtidas das nanoemulsões, produzidas pelos óleos essenciais de cravo, canela e orégano, revelaram estruturas esféricas de diâmetro na

faixa de 150 a 250 nm (Figura 8). Estes resultados confirmam os dados obtidos na análise de espalhamento de luz por meio do Nanophox, que apresentaram valores próximos a 200nm.

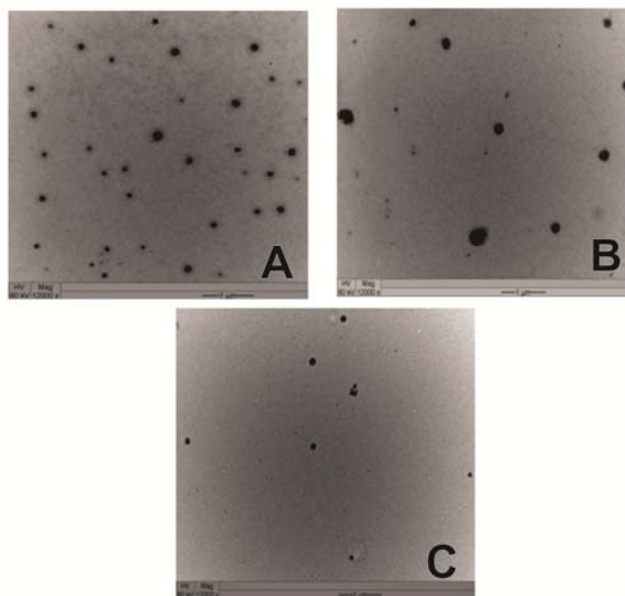


Figura 8. Micrografias das nanoemulsões dos diferentes óleos essenciais, obtidas através do MET. A: canela; B: cravo; C: orégano.

Percebeu-se interface das nanoemulsões com gotículas de óleos essenciais definidas e sem influência do tipo de lipídeo utilizado, indicando uma influência preponderante do procedimento de emulsificação no ultrassônico nas propriedades do diâmetro das gotículas das nanoemulsões. Nota-se, ainda, a formação de gotículas com distribuição de diâmetro variado, o que não comprometeu a verificação da formação de nanoemulsões estáveis e com diâmetro de gotículas nanométrico.

No trabalho de Salvia-Trujillo *et al.* (2013), onde estudou-se o efeito dos parâmetros de processamento (pressão e ciclos) de microfluidização na formação de nanoemulsões de óleo essencial de alginato, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão para confirmar se as nanoemulsões estavam em escala nano. A partir das análises das micrografias do MET, os autores concluíram que as nanoemulsões produzidas apresentaram tamanho de gotas entre 10 e 250 nm.

Li e Chiang (2012) estudaram a otimização do processo e da estabilidade de nanoemulsão de óleos essenciais de D-limoneno em água, formadas por emulsificação de ultra-som, e descreveram que através da aplicação de MET foi possível correlacionar o diâmetro das gotículas com os resultados obtidos usando instrumento de dispersão de

luz. Observaram similiaridade de diâmetro para as mesmas formulações de nanoemulsões de óleos essenciais.

3.5.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através das análises das micrografias, pode-se observar a formação de gotículas de óleos essenciais com diâmetro nanométrico polidispersos, variando entre 100 e 250 nm, com características de formação de nanoemulsões com gotículas dos óleos essenciais de cravo, canela e orégano (Figura 9).

Os diâmetros das gotículas de óleos essenciais observados nas imagens do MEV foram similares aos obtidos na análise de espalhamento de luz através do Nanophox. Perceberam-se, também, regiões de formação de aglomerados de gotículas de óleos essenciais, sendo mais perceptível nas micrografias (Figuras 9B e 9C). A formação destes aglomerados pode ser devido à presença de pontos que não foram adequadamente dispersados durante o processamento no homogeneizador ultrassônico, ou mesmo, devido a formação de gotículas maiores, mas que não interferiram na obtenção de gotículas de diâmetros nanométricos e estáveis.

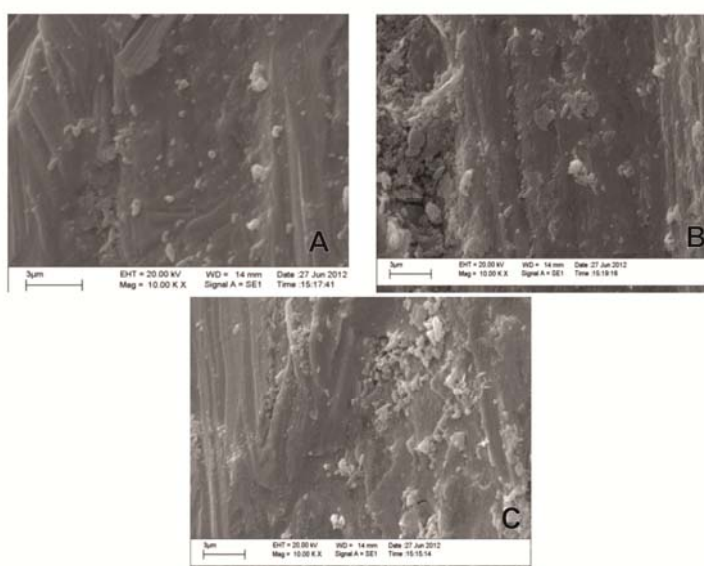


Figura 9. Micrografias das nanoemulsões dos diferentes óleos essenciais, obtidas por MEV. A: canela; B: cravo; C: orégano.

4. CONCLUSÕES

Utilizando-se 2% de óleo essencial de cravo, canela ou óregano, 1,5% de tensoativo, potência de 400 W do homogeneizador ultrassônico por 10 minutos, as formulações produzidas apresentaram aparência leitosa, sem separação de fases e diâmetro nanométrico. Até o volume de 200 mL esses parâmetros não interferiram no diâmetro nanométrico das gotículas de óleos essenciais formadas. As nanoemulsões apresentaram estabilidade com relação ao tamanho e turbidez. Os resultados de condutividade elétrica e pH, apresentaram variações ao longo do tempo de 72 horas de armazenamento, mas não foram suficientes para desencadear processos de instabilidade, como a separação de fases. As observações de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura confirmaram que as gotículas dos óleos essenciais presentes nas nanoemulsões estavam na escala nano.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABISMAÏL, B.; CANCELIER, J.P.; WILHELM, A.M.; DELMAS,H.; GOURDON,C. mulsification by ultrasound: drop size distribution and stability, **Ultrason. Sonochem**, v.6 (1-2) .p.75–83,1999.

ANTON, N., GAYET, P., BENOIT, J.P., SAULNIER, P., 2007. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, P. 44–52, 2007.

BAYDAR H, SAODIÇO O, OZKAN G, KARADOAN T. Antibacterial activity and composition of essential oils from origanum, thymbra and satureja espécies with commercial importance in turkey. **Food Control**,v.15, p.169–172, 2004.

BERNARDI, D.S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Mestre em ciências. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto,104f, 2011.

BOUCHEMAL, K., BRIANCON, S., PERRIER, E., FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, 241–251.,2004.

BRACONI, F. L.; OLIVEIRA, I. S.; BARONI, M. N. F.; ROCHA-FILHO, P. A. Aplicação cosmética do óleo de canola. In. **Congresso Latino Americano e Hibernico de Químicos Cosméticos, 12, São Paulo, 1995. Anais**. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, p.6–19, 1995.

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

CAMARGO, M.F. P. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Mestre em ciências. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Ribeirão preto, 99p. 2008.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125–155, 2004.

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

DONSÍ,F.; ANNUNZIATA,M.; VINCENSI, M.; FERRARI,G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159 (4), P. 342–350, 2012.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.251, p. 53–58, 2004.

INOUE, L. A. K. A.; SANTOS, N. C.; MORAES, G. Óleo de cravo como anestésico para juvenis de matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943–947, set/out, 2003.

IZQUIERDO, P., FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T.F.; DEDEREN, J.C. GARCIA, M.J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal Colloid Interface Science**, v. 285 (1) p.388–394, 2005.

JAFARI, S.M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques, **Journal Food Engineering**, v.82 (4), p. 478–488, 2007.

KLANG, V., VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, p. 55–76, 2011.

KRALOVA, I.; SJÖBLOM, J. Surfactants used in food industry: a review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30(9), p. 1363–1383, 2009.

KULMYRZAEV, A. A.; SCHUBERT, H. Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.13–21, 2003.

LEE, S. J., MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/ evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, v. 24(6–7), P.560–569, 2010.

LEONG, T. S. H.; WOOSTER, T. J.; KENTISH, S.E M. Ashokkumar, Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification, **Ultrason. Sonochem**, v. 16 (6), P.721–727, 2009.

LI, C.; MEI, Z.; LIU, Q.; WANG, J.; XU, J.; SUN, D. Formation and properties of paraffin wax submicron emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 356, p. 71–77, 2010.

LI, Y., MCCLEMENTS, D. J. New mathematical model for interpreting pH-Stat digestion profiles: impact of lipid droplet characteristics on in vitro digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58(13), 8085–8092, 2010.

LI, P.; CHIANG, B. Process optimization and stability of D-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, p.192–197, 2012.

MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae **International Journal of Food Microbiology**, v.67, 187–195, 2001.

MARTINI, E.; Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química. **Dissertação (mestrado) Universidade do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 106F, 2005.

MASMOUD, H.; DRÉAU, Y. L.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**. v.289, p. 117–131, 2005.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 6, n.2, p. 231–238, junho, 2003.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from orégano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**. Oxford, v. 71, n. 1, p. 79–83, 2000.

MORAIS, G. G. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite). **Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 158f, 2006.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; ROCHA FILHO, P. A. Canola oil/water nano-emulsions: physicochemical characterization and evaluation of electrolytes influence on emulsion stability. **Journal of Dispersion Science and Technology**. New York, v. 27, n. 7, 2006.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

OZCAN, M., ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices European. **Food Research Technology**, v. 212, p.658–660, 2001.

PANDIT, V. A.,SHELEF, L. A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**, v.11, 57–63,1994.

PANIZI, L., FLAMINI, G., CIONI, P. L., MORELLI. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, 167–170, 1993.

PARADA, J., AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of food several nutrients. **Journal of Food Science**.,v.72(2), p.R21- R32, 2007.

PEREIRA, T.A. Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação. **Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Mestre em ciências. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**. Ribeirão Preto,102p, 2011.

PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano emulsions prepared by low energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.288, p.144–150, 2006.

RAO, J.; McCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. **Food Hydrocolloids**, v.29, p. 326–334, 2012a.

RAO, J. McCLEMENTS, D. J. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. **Food Chemistry**, v. 134, p.749–757. 2012 b.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v.263, p.85–94, 2003.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R. MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v.30, p. 401–407, 2013.

SANTOS, O. H. D. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristais líquidos. **Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 147f, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHMANN A. R. Caracterização Físico-química e Estabilidade de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p.726–737, 2003.

SOLÉ, I., PEY, C.M., MAESTRO, A., GONZALEZ, C., PORRAS, M., SOLANS, C., GUTIÉRREZ, J.M. Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up. **Journal Colloid Interface Science**, v.344, p.417–423, 2010.

SOLÉ, I.; MAESTRO, A.; PEY, C. M.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Nano- emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v.288, p.138–143, 2006.

SOROKINA, T. V.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K. S. Evaporation of the fragrance component, cinnamyl alcohol, using simultaneous TG-DTA. **Thermochimia Acta**. v.392–393, p.315–321, 2002.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advance in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

WEISS, J., GAYSINKSY, S., DAVIDSON, M., MCCLEMENTS, J., 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

INCORPORAÇÃO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO E ORÉGANO NA PRODUÇÃO DE FILMES DE METILCELULOSE

RESUMO

Com o intuito de minimizar o impacto ambiental causado pelos polímeros convencionais, alternativas como o uso de polímeros biodegradáveis vem sendo proposta, como por exemplo, a utilização da metilcelulose. Aliado a isso, a produção de filmes incorporados com antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais podem promover uma melhoria na segurança e vida útil dos alimentos. Objetivou-se com o presente trabalho desenvolver nanoemulsões de óleos essenciais de cravo e de orégano e incorporá-las em filmes para a produção de filmes ativos, bem como, avaliar a atividade antimicrobiana, as propriedades mecânicas e de barreira destes filmes. Além de caracterizá-los em relação às propriedades ópticas, espectroscopia transformada de Fourier (FTIR), microscopias eletrônicas de varredura e de força atômica, com vista a uma possível aplicação destes filmes para a conservação de pães de forma. Observou-se que a adição das nanoemulsões possibilitaram aos filmes ação antimicrobiana sobre os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp. Quanto às propriedades mecânicas dos filmes, as incorporações de nanoemulsões de óleos essenciais não afetaram a resistência à tração, mas acarretaram no aumento do alongamento. Além disso, promoveram modificações no módulo de elasticidade, tornando os filmes menos rígidos. As taxas de permeabilidade ao vapor de água e a hidrofobicidade de superfície dos filmes não foram alteradas pela incorporação das nanoemulsões nos filmes. Os filmes mostraram excelente característica de transparência no comprimento de onda de 210 nm e de acordo os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* a coloração apresentada foi amarela clara. As imagens obtidas através das microscopia eletrônica de varredura e da microscopia de força atômica revelaram estruturas das gotículas esféricas de diâmetro na faixa de 150 a 250 nm, sendo que estes diâmetros foram similares aos obtidos na análise de espalhamento de luz. Quanto à análise dos espectros do FTIR observou-se que, possivelmente, as interações entre o polímero e as emulsões óleo em água foram bem semelhantes, independentes da incorporação das nanoemulsões ou das emulsões tradicionais, mas, diferentes pela composição de cada óleo. Os resultados demonstraram que as incorporações das emulsões tradicionais e das nanoemulsões afetaram as

propriedades dos filmes, acarretando em mudanças em suas características. Portanto, torna-se imprescindível aprofundar os conhecimentos em torno do assunto.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de embalagens plásticas ao longo dos anos vem produzindo grande quantidade de resíduos, os quais se acumulam nos aterros sanitários gerando problemas ambientais consideráveis (KUMAR *et al.*, 2010), além de provocarem poluição dos rios, solos e cidades. Assim, muitas pesquisas vêm objetivando a produção e utilização de embalagens biodegradáveis, para aplicação nos diversos setores industriais, inclusive na indústria de alimentos.

Polímeros biodegradáveis são polímeros nos quais a degradação resulta da ação de micro-organismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas, podendo ser degradados em semanas ou meses sob condições favoráveis de biodegradação (MOHANTY *et al.*, 2005). Dentre os polímeros biodegradáveis, os que têm atraído mais atenção são os obtidos a partir de fontes renováveis, devido ao menor impacto ambiental causado com relação a sua origem (RAY e BOUSMINA, 2005).

A embalagem alimentícia constitui uma ferramenta complementar para a conservação de alimentos, podendo garantir que todos os procedimentos para a obtenção de um produto final de qualidade sejam assegurados, seja pela proteção contra agentes externos causadores de deterioração do alimento que a embalagem confere ou por meio de uma interação desejável entre o produto e a embalagem. Esta tecnologia, em que ocorre uma interação desejável, entre produto e a embalagem é denominada embalagem ativa.

SOARES (1998) conceituou embalagens ativas como aquelas que interagem com o alimento modificando alguma propriedade, objetivando proporcionar segurança alimentar, melhoria de qualidade sensorial e ampliar a vida-de-prateleira do produto.

A liberação de aditivos por embalagens ativas aumenta a segurança do consumidor, já que esses compostos, ao invés de serem adicionados diretamente ao alimento, são liberados gradativamente. Com isso, estão presentes em menores quantidades, e apenas onde sua presença é requerida, como na superfície do produto, onde a maioria das reações de deteriorações ocorre.

Os consumidores estão a cada dia buscando um estilo de vida mais saudável e, assim, vêm se tornando mais exigentes no que se refere à utilização de conservantes sintéticos nos alimentos e, muitos optam pelo consumo de produtos naturais e livres de aditivos químicos. Neste contexto, o emprego dos óleos essenciais, na produção de filmes ativos, aplicados em sistema de embalagens antimicrobianas para alimentos, mostra-se como uma tecnologia interessante, uma vez que, a atividade antimicrobiana

de substâncias naturais, como os óleos essenciais, é conhecida há muito tempo, mas, atualmente pesquisas para a aplicação destas substâncias nas diversas indústrias têm aumentado significativamente e, com isso, novas possibilidades de exploração do uso destas substâncias têm surgido.

Os avanços nas pesquisas refletem uma tendência tecnológica mundial em todos os setores de produção, que pode ser traduzida em “quanto menor, melhor”. Denomina-se esta revolução de nanotecnologia, cujo termo é originário de uma unidade de medida que equivale a 10^{-9} metros (um milionésimo de milímetro) (ARAKI, 2007).

A infinidade de benefícios e perspectivas oferecidas em todas as áreas de atuação pela nanociência deve-se à interdisciplinariedade desta tecnologia inovadora. A comunidade científica brasileira tem acompanhado a tendência mundial aumentando sua produção intelectual em nanociência e nanotecnologia, tendo as mais variadas linhas de pesquisa. Devido à versatilidade e funcionalidade dos materiais gerados, a nanotecnologia está sendo empregada nos mais diversos segmentos, destacando-se os setores farmacêutico, alimentício e cosmético (ARAKI, 2007).

As nanoemulsões são uma classe de nanoemulsões cujo tamanho de gotículas está em torno de 20 - 500 nm (FERNANDEZ *et al.*, 2004; SOLÉ *et al.*, 2006; PEY *et al.*, 2006). Podem apresentar aparência translúcida quando o diâmetro das gotículas é inferior a 200 nm, ou leitosa quando o tamanho está entre 200 e 500 nm (CAPEK, 2004).

A incorporação de óleos essenciais em alimentos ainda apresenta diversas limitações tecnológicas, considerando a sua baixa solubilidade em meio aquoso, bem como, a sua toxicidade, características sensoriais e aspectos econômicos quando são incorporados em altas doses (BURT, 2004; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2011). Assim sendo, a aplicação dos óleos essenciais em sistemas de nanoemulsões óleo em água para a produção de filmes ativos, poderá constituir uma tecnologia interessante, uma vez, que estes compostos estarão encapsulados pelo surfactante e serão liberados da embalagem de maneira gradativa para o alimento.

A incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais de cravo e orégano em metilcelulose, para a produção de embalagens ativas, pode ser uma tecnologia interessante para a indústria de embalagens para alimentos. Com a possibilidade de melhorias nas técnicas de incorporação de óleos essenciais em matrizes poliméricas e, melhor atividade antimicrobiana.

Objetivou-se com o presente trabalho desenvolver nanoemulsões de óleos essenciais de cravo e de orégano e incorporá-las durante a produção de filmes ativos,

bem como, avaliar a atividade antimicrobiana, as propriedades mecânicas e de barreira desses filmes. Além de caracterizá-los em relação às propriedades ópticas, espectroscopia transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura e de força atômica, com vistas a uma possível aplicação destes filmes para a conservação de pães de forma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Embalagens para Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG/Brasil. Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado com três repetições (DIC).

2.1. Material

Culturas puras dos fungos *Aspergillus niger* (ATCC 16404) e *Penicillium* spp. (ATCC 2147) foram adquiridas da Fundação André Tosello (Campinas, SP) e utilizados para a avaliação da concentração mínima inibitória e avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes.

Meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) Sigma[®] foi utilizado para as avaliações das atividades antimicrobianas.

Para o preparo das nanoemulsões foram utilizados os óleos essenciais de cravo talo (*Eugenia caryophyllata*) e orégano (*Origanum vulgare*), os quais foram adquiridos da FERQUIMA[®], o tensoativo hidrofílico Polissorbato 80 (Tween 80) SIGMA[®] e água desionizada.

Para o preparo dos filmes utilizaram-se a metilcelulose (Sigma[®]) e o plastificante polietileno glicol (ISO FAR[®]) massa molecular 6000.

2.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de cravo e orégano foi determinada para os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp, por serem os microorganismos que comumente crescem em produtos de panificação. Para a determinação da concentração mínima inibitória utilizou-se o método de difusão em meio sólido, com a técnica de cavidades em placas (NASCIMENTO *et al.*, 2007; MENEZES *et al.*, 2009), com algumas modificações. Os autores utilizaram cânulas de vidros estéreis para produção das cavidades no meio de cultura. Neste trabalho, as cavidades de 6 mm foram feitas com o fundo de ponteiros estéreis, além disso, estabeleceram como CMI, a concentração do óleo essencial capaz de desenvolver um halo de inibição do crescimento fúngico maior ou igual a 8 mm de diâmetro, medido por uma régua milimetrada. Como no presente trabalho estes agentes antimicrobianos foram incorporados numa matriz polimérica para transmitir a atividade antimicrobiana através dos filmes formados, constituindo assim, numa barreira extra (polímero) para a ação dos

antimicrobianos, optou-se por estabelecer como a CMI a concentração capaz de promover a formação de halos de inibição na em todas as placas testadas, independente do diâmetro dos halos formados.

2.2.1. Preparo das soluções de óleos essenciais

Soluções de óleos essenciais, foram preparadas adicionando-se 40 mg.mL⁻¹ de óleo essencial de cravo ou orégano, em 1,6% (m/v) de Tween 80 e água destilada esterilizada para completar o volume de 5 mL em tubo estéril. Esta solução foi agitada em agitador de tubos (FANEM), até completa homogeneização.

Para a obtenção das demais concentrações dos óleos essenciais a serem testadas, realizaram-se diluições sucessivas da solução inicial de 40 mg.mL⁻¹ com água destilada esterilizada na proporção 1:1, obtendo, assim, as concentrações de 20 mg.mL⁻¹, 10 mg.mL⁻¹, 5 mg.mL⁻¹, 2,5 mg.mL⁻¹ e 1,25 mg.mL⁻¹. As soluções usadas como controle foram produzidas da mesma maneira, porém sem a incorporação de óleo essencial.

2.2.2. Inoculação

Placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo meio BDA (Sigma[®]) solidificado, foram inoculadas com alíquota de 100 µL de suspensão fúngica (10⁵ UFC.mL⁻¹) de *Aspergillus niger* ou *Penicillium* spp. e espalhada com alça de Drigalski até completa absorção pelo meio de cultura.

Uma cavidade de 6 mm de diâmetro foi feita em cada placa com o fundo de ponteiros plásticas estéreis, onde depositaram-se 50 µL da solução ajustada na concentração desejada do óleo essencial (40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 mg.mL⁻¹), além do controle, sem adição de óleo essencial. As placas foram, então, vedadas com filme PARAFILM[®] e incubadas em BOD a 25 ± 2 °C por 5 dias.

Após a incubação, as placas foram avaliadas quanto ao crescimento fúngico, que foi reportado como:

crescimento normal - quando as placas não apresentaram halos de inibição micelial de efeito antimicrobiano dos óleos essenciais;

redução do crescimento - quando as placas exibiram menores densidades de crescimento fúngico em comparação com o tratamento controle;

inibição do crescimento - quando houve a formação de halos de inibição micelial ao redor da cavidade no meio de cultura, mesmo que este halo não tenha ocupado todo o diâmetro da placa.

Como concentração mínima inibitória, foi determinada a menor concentração de

óleo essencial em que houve a formação de halos de inibição micelial nas placas avaliadas de todas as repetições, independente do diâmetro destes.

A utilização dos métodos padronizados pela NCCL (National Committee for Clinical Laboratory Standards) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos, como os antibióticos, são difíceis para aplicação de análises com óleos essenciais, por isso, no presente estudo não foram utilizados estes métodos.

Dessa forma, propriedades como volatilidade, insolubilidade em água, viscosidade e complexidade resultam em difusão irregular dos componentes lipofílicos dos óleos e, conseqüentemente, em concentrações desiguais do óleo no ágar (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Com o intuito de melhorar a qualidade dos procedimentos com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes ou emulsificadores, a exemplo do Tween 20, Tween 80, DMSO (dimetil-sulfóxido) e etanol, para facilitar a dispersão dos mesmos no meio de cultura (BRUNI *et al.*, 2004; BAYDAR *et al.*, 2004). Baseando-se nesses estudos, optou-se por uma metodologia utilizando-se cavidades feitas no ágar e difusão em meio sólido, com o auxílio de um agente emulsificador (Tween 80) (LIMA *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2006).

2.3. Produção dos filmes ativos antimicrobianos

2.3.1. Preparo das nanoemulsões de óleos essenciais

Para o preparo das nanoemulsões do tipo óleo em água utilizou-se como fase aquosa, água desionizada. A fase oleosa foi constituída dos óleos essenciais de cravo ou orégano na concentração de 40 mg.mL⁻¹ (determinação da concentração mínima inibitória) e o tensoativo Tween 80 na concentração de 3%. Essas concentrações foram determinadas no capítulo anterior através da metodologia de Superfície de Resposta, onde foi verificado que, nas concentrações de 20 mg.mL⁻¹ de óleo essencial e, 1,5% tensoativo (Twen 80) tornou-se possível a obtenção de nanoemulsões estáveis e, portanto, com potencial de aplicação em sistemas de produção de filmes ativos. Desta forma, estudaram-se as concentrações mínimas inibitórias próximas desta faixa de concentração e, a partir dos resultados obtidos no item 2.2 verificou-se que a concentração de 40 mg.mL⁻¹ inibiram o desenvolvimento dos fungos avaliados em todas as placas.

Em seguida, a mistura foi homogeneizada com um bastão de vidro até completa homogeneização dos constituintes da emulsão e submetida a homogeneização

ultrassônica (Modelo DES500, Unique Group), utilizando a macro-ponta do equipamento na frequência de 20 kHz, na potência de 400 W, por 10 minutos.

Foram atribuídas a estas nanoemulsões a denominação nanoemulsão do óleo essencial de cravo (NC) ou de orégano (NO), de acordo com o tipo de óleo essencial utilizado.

Emulsões similares foram produzidas, sem a utilização da etapa do processamento no equipamento ultra-sônico, constituindo, assim, no procedimento para obtenção de emulsões tradicionais. Para melhor identificação dos tratamentos, estas formulações foram denominadas emulsão de orégano (EO) e emulsão de cravo (EC), considerando-se que as gotículas de óleos essenciais presentes nas formulações não tiveram seus diâmetros reduzidos por não ter empregado a energia de cisalhamento do ultrassom.

Neste capítulo, não se trabalhou com o óleo essencial de canela. Isto ocorreu porque, nas condições utilizadas para a produção dos filmes com as emulsões do óleo essencial de cravo e, de orégano não houve formação de filmes homogêneos quando se utilizou o óleo essencial de canela.

2.3.2 Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais nas nanoemulsões

Os diâmetros das gotículas das nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano foram medidas por meio da técnica espectroscópica de espalhamento a laser, utilizando o analisador de tamanho de partículas em nanoescala (Nanophox, Sympatec). As amostras das nanoemulsões de óleos essenciais foram diluídas em água destilada e desionizada na proporção de 1:10 e vertidas na cubeta do equipamento com auxílio de uma pipeta. Esta diluição faz-se necessária, pois o aparelho realiza a leitura numa faixa específica de turbidez da amostra, de modo a evitar espalhamento excessivo da luz por aglomerados formados em amostras concentradas. As medidas de espalhamento de luz foram realizadas com um ângulo de 90° e a temperatura da amostra mantida a 25 °C.

2.3.3. Preparo dos filmes

Para a produção dos filmes incorporados com as emulsões tradicionais e com nanoemulsões de óleos essenciais, realizou-se o aquecimento das emulsões (100 mL), em forno micro-ondas até ebulição (100 °C). Adicionaram-se 2% (m/v) de metilcelulose em relação ao volume de emulsão e 10% (m/v) de polietileno glicol em relação à resina polimérica (metilcelulose), como plastificante para conferir aos filmes flexibilidade e resistência ao rasgo (BORLIEU *et al.*, 2007). A solução foi homogeneizada em agitador

magnético a 4 rpm durante 30 minutos e depois mantida em repouso até temperatura ambiente ± 25 °C.

Após este período de resfriamento, a solução filmogênica foi novamente homogeneizada por 15 minutos em agitador mecânico a 4 rpm e espalhada sobre placas de vidro com bordas, de dimensões 20 x 32 cm, onde permaneceram a 25 ± 2 °C e com corrente de ar forçada para acelerar o processo de polimerização, até a completa evaporação do solvente (Figura 1).

Os filmes usados como controle foram produzidos da mesma maneira, porém sem a adição do óleo essencial.

Após a secagem, os filmes foram retirados das placas, armazenados em sacos de Polietileno-Náilon e selados à vácuo até utilização nas análises de caracterização.

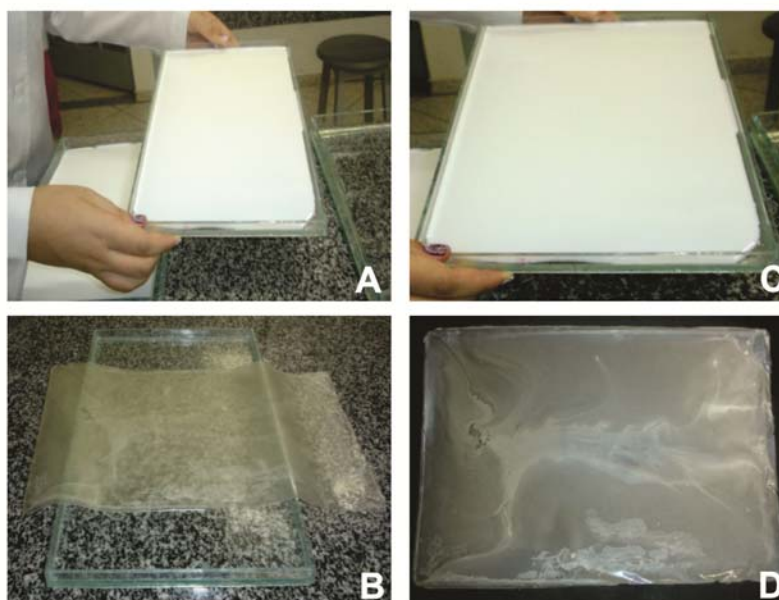


Figura 1. Processo de produção dos filmes. A e C: Soluções filmogênicas nas placas de vidro; B e D: filmes obtidos após secagem das soluções filmogênicas.

Na Tabela 1 está descrita a composição dos filmes produzidos e avaliados no presente trabalho.

Tabela 1. Composição dos filmes. EC - filmes incorporados com emulsões do óleo essencial de cravo; NC - filmes incorporados com nanoemulsões do óleo essencial de cravo; EO- filmes incorporados das emulsões do óleo essencial de orégano; NO- filmes incorporados das nanoemulsões do óleo essencial de orégano e C - filme sem incorporação de óleo essencial (controle).

Filmes	Água (mL)	Twen 80 (mL)	Óleo essencial (mg.mL ⁻¹)	Metilcelulose (g)	Polietileno glicol (g)
EC	100	3	40	2	0,2
NC	100	3	40	2	0,2
EO	100	3	40	2	0,2
NO	100	3	40	2	0,2
C	100	3	–	2	0,2

2.4. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes ativos

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes *in vitro* foi realizada pelo método de difusão em ágar para os fungos *Penicillium* spp. e *Aspergillus niger* por ser os micro-organismos que mais deterioram produtos de panificação.

Sobre Ágar Batata Dextrose (SIGMA[®]), solidificado em placa de Petri, foi inoculado 0,1 mL de uma suspensão 10⁵ UFC.mL⁻¹ dos micro-organismos e, sobre estes, foi colocado, assepticamente, no centro, um disco do filme (Ø = 1 cm) incorporado com as emulsões (O/A) tradicionais e com nanoemulsões de óleos essenciais produzidas, além do filme controle (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002). As placas foram incubadas em BOD a 25 °C por cinco dias e avaliadas quanto à formação de halo de inibição por meio da medida de diâmetro do halo formado.

2.5. Caracterização dos filmes

2.5.1. Espessura

A espessura média dos filmes foi medida com o auxílio de um micrômetro modelo Mitutoyo (0-25 mm). Foram retiradas três amostras de cada filme, tomando-se as medidas em dez pontos diferentes em cada amostra, com um total de 30 medidas de cada filme.

2.5.2. Propriedades mecânicas

Os filmes desenvolvidos foram submetidos a testes mecânicos para avaliação da resistência à tração (MPa), alongamento (%) e módulo de elasticidade (MPa), de acordo com a norma ASTM D882–09 (ASTM, 2009a), utilizando a máquina Universal de Testes Mecânicos (INSTRON Corporation). Foram testados sete corpos de prova de cada tratamento com dimensões de 10 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. A

máquina foi operada com célula de carga de 1 kN a uma velocidade de tração de 50 mm·min⁻¹ e com distância entre as garras de 50 mm.

2.5.3. Taxa de permeabilidade ao vapor de água

A taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) foi determinada pelo método dessecante, segundo a metodologia ASTM E 96/E 96M - 05 (ASTM, 2010), com algumas modificações. Três amostras de filme (diâmetro de 85 mm) foram retiradas para estabelecer a média dos valores de TPVA. Utilizaram-se cápsulas circulares (diâmetro de 85 mm), com paredes impermeáveis, contendo 25 g de cloreto de cálcio anidro (MERCK[®]) onde os filmes foram vedados com parafina na junção filme/cápsula.

Após a montagem das cápsulas, estas foram acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio cristalizado (MERCK[®]) em seu interior, de forma a manter a umidade relativa de 75 ± 2 % e temperatura de 25 ± 2 °C. Por meio de pesagens diárias sucessivas, até obter uma taxa constante de ganho de peso, foi avaliado o ganho de peso associado à umidade permeada por cada um dos filmes. Os dados de ganho de peso (g) e tempo de condicionamento (dias) de cada cápsula foram representados em gráfico e, a partir do intervalo em que os pontos formaram uma reta por regressão linear, foi calculado o coeficiente angular da curva.

A taxa de permeabilidade ao vapor de água foi obtida pela divisão do coeficiente angular pela área dos filmes exposta no corpo de prova, de acordo com a equação 1:

$$TPVA = \frac{G}{t \cdot A} \quad \text{Equação 1}$$

onde

TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água (g·m⁻²·Dia⁻¹);

G/t = coeficiente angular da reta (g·dia⁻¹);

A = área de permeação do corpo de prova (m²).

2.5.4. Propriedades ópticas

2.5.4.1. Transparência

A transparência dos filmes foi medida através do uso de um espectrofotômetro GBC UV/VIS 918 no intervalo de comprimento de onda de 210 nm (região ultravioleta) e 500 nm (região visível).

Amostras dos filmes foram cortadas de forma retangular (0,7 x 1,5 cm) e colocadas em uma cubeta de quartzo. A transparência relativa foi medida pela % de transmitância a 210 nm e 500 nm. A cubeta de quartzo vazia foi usada como controle, conforme metodologia proposta por Tang *et al.* (2005).

2.5.4.2. Análise de cor

A cor dos filmes foi analisada em colorímetro (COLORQuest XE) com leitura direta das coordenadas L* (luminosidade), a* (relativa de verde a vermelho) e b* (relativa de amarela a azul) no parâmetro de transmitância. Para cálculo dos parâmetros de cor foram estabelecidos o iluminante D65 (luz do dia 6.500K), o ângulo de 10° para o observador e a escala do sistema de cor “CIElab”. Para cada filme, utilizou-se a média de três determinações em zonas aleatórias de cada amostra com três repetições.

2.5.5. Caracterização microscópica

2.5.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização microscópica dos filmes foi realizada no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM - UFV).

Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV/LEO – Modelo 1430VP) para monitorar a superfície dos filmes ativos incorporados com as emulsões tradicionais e com nanoemulsões de óleos essenciais. As amostras com dimensões 0,5 cm² foram fixadas em *stubs* e cobertas com uma camada de ouro com uma espessura de 20 a 30 nm, realizada no metalizador Sputter Coater (Balzers - Modelo SCD 010), para aumentar a condutividade da superfície das amostras. Estas, então, foram colocadas em *holders* para focalização e captura das fotomicrografias (BENGTSSON *et al.*, 2003).

2.5.5.2. Microscopia de força atômica (MFA)

A microtopografia da superfície dos diferentes filmes foi avaliada no laboratório do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Amostras dos filmes foram cortadas e fixadas no suporte de porta amostras do microscópio, com auxílio de fita dupla-face. Em seguida, cada amostra foi analisada no Microscópio de Força Atômica NT-MDT, utilizando o modo de contato intermitente. Para cada filme, foram realizadas varreduras de 50 µm x 50 µm.

2.5.6. Hidrofobicidade da superfície

A hidrofobicidade da superfície dos filmes foi determinada por meio da técnica de ângulo de contato, em goniômetro (Krüss ®, Alemanha) equipado com um software de análise de imagem. Gotas (2 µL) de água mili-Q, formamida (Sigma Aldrich - São Paulo, Brasil) e α -bromonaftaleno (SIGMA ALDRICH® - São Paulo, Brasil) foram depositadas no filme e as medições de ângulo de contato (°) foram realizadas.

Para interpretar a energia livre de superfície em relação às forças de interação intermolecular na interface e para determinar a energia livre de hidrofobicidade ($\Delta G_{Hydroph}$), foi utilizado a aproximação Van Oss, também conhecida como Lifshitz-van der Waals / aproximação ácido-base (ARAÚJO *et al.*, 2009; CAMILLOTO *et al.*, 2010). De acordo com esta abordagem, a equação de Young deve ser determinada pelo ângulo de contato (θ) medido com pelo menos três líquidos diferentes (dois dos quais devem ser polares). A equação 2 relaciona o ângulo de contato formado pelo líquido sobre uma superfície sólida:

$$(1 + \cos \theta)\gamma_l = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+}) \quad \text{Equação 2}$$

Onde γ_l é a tensão superficial do líquido; γ^{LW} é a componente apolar, ou Lifshitz-van der Waals (que compreende as contribuições de dispersão, de indução e também de orientação para as interações de Van der Waals com a superfície (γ_s) ou líquido (γ_l)); γ^+ é o parâmetro aceptor de elétrons do componente polar da tensão superficial e γ^- é o parâmetro doador de elétrons do componente polar da tensão superficial (s) ou líquido (l) (ARAÚJO *et al.*, 2009).

A clara subdivisão entre interações apolar (ou componente Lifshitz-van der Waals, LW) e polar (ou componente ácido-base de Lewis, AB), também tornou possível chegar à uma definição quantitativa de interações hidrofóbicas que é também referido como interação interfacial total (Sharma e Rao, 2002).

A energia livre de interação hidrofóbica ($\Delta G_{Hydroph}$) é de acordo com Van Oss (1995), conforme equação 3:

$$\Delta G_{Hydroph} = \Delta G_{sws}^{LW} + \Delta G_{sws}^{AB} \quad \text{Equação 3}$$

Em que ΔG_{sws}^{LW} é a energia de interação adesiva apolar (Lifshitz-Van der Waals) entre superfície e água conforme equação 4.

$$\Delta G_{sWS}^{LW} = -2 \left(\sqrt{y_s^{LW}} - \sqrt{y_w^{LW}} \right)^2 \quad \text{Equação 4}$$

e ΔG_{sWS}^{AB} é a energia de interação coesiva polar entre os elétrons aceptores e elétrons doadores da superfície ($\sqrt{y_s^+ y_s^-}$); a energia de interação coesiva polar entre os elétrons aceptores e elétrons doadores das moléculas de água ($\sqrt{y_w^+ y_w^-}$); a energia de interação adesiva polar entre os elétrons aceptores da superfície e os elétrons doadores das moléculas da água ($\sqrt{y_s^+ y_w^-}$); a energia de interação adesiva polar entre os elétrons doadores da superfície e elétrons aceptores das moléculas de água ($\sqrt{y_w^+ y_s^-}$), conforme equação 5:

$$\Delta G_{sWS}^{AB} = -4 \left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_s^-} \right) \quad \text{Equação 5}$$

2.5.7. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para determinar as interações químicas dos filmes de metilcelulose com as emulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano foram realizadas avaliações de espectroscopia utilizando-se o espectrofotômetro na região do infravermelho (FTIR-Thermo Scientific Nicolet 6700) equipado com um detector de KBr-DTGS KBr e um divisor de feixe. Amostras de cada filme foram utilizadas para a realização de 56 varreduras na faixa média do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}), com resolução espectral de 4 cm^{-1} para obtenção dos espectros.

2.6. Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico SAS versão 9.2 (Statistical Analysis System) licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da concentração mínima inibitória

Os resultados obtidos para determinação da concentração mínima inibitória para *Aspergillus niger* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração mínima inibitória para o fungo *Aspergillus niger* em resposta a diferentes concentrações dos óleos essenciais de cravo e orégano.

Óleo essencial	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Crescimento normal (%)	Redução do crescimento (%)	Inibição do crescimento (%)
Cravo	40	0	0	100
	20	0	33,3	66,7
	10	33,3	55,6	11,1
	5	100	0	0
	2,5	100	0	0
	1,25	100	0	0
	0	100	0	0
Orégano	40	0	0	100
	20	0	77,8	22,2
	10	0	100	0
	5	66,7	33,3	0
	2,5	100	0	0
	1,25	100	0	0
	0	100	0	0

Os resultados da determinação da concentração mínima inibitória para *Penicillium* spp. estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração mínima inibitória para o fungo *Penicillium* spp. em resposta a diferentes concentrações dos óleos essenciais de cravo e orégano.

Óleo essencial	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Crescimento normal (%)	Redução do crescimento (%)	Inibição do crescimento (%)
Cravo	40	0	0	100
	20	0	50	50
	10	100	0	0
	5	100	0	0
	2,5	100	0	0
	1,25	100	0	0
	0	100	0	0
Orégano	40	0	0	100
	20	0	100	0
	10	0	100	0
	5	100	0	0
	2,5	100	0	0
	1,25	100	0	0
	0	100	0	0

Observou-se nas Tabelas 2 e 3, que na concentração de 40 mg.mL⁻¹, ocorreu a inibição dos micro-organismos testados *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp pela presença de halos de inibição, mesmo que estes não ocupassem toda a extensão do diâmetro da placa de petri (9 cm) em todas as placas avaliadas. Assim, como objetivou selecionar a concentração de óleo essencial de cravo e de orégano em que houvesse a inibição da maioria das placas avaliadas, para os fungos testados, esta foi a concentração selecionada para incorporação nos filmes.

Para o óleo essencial de cravo, na concentração de 20 mg.mL⁻¹, observou que 66,7% das placas inoculadas com o micro-organismo *Aspergillus niger* e 50% das placas inoculadas com o *Penicillium* spp apresentaram halo de inibição micelial.

Quanto ao óleo essencial de orégano na concentração de 20 mg.mL⁻¹, observou-se que 22,2% das placas inoculadas com os micro-organismos *Aspergillus niger* e 0% das placas inoculadas com o *Penicillium* spp, apresentaram halo de inibição micelial. A partir destes resultados, nota-se que o óleo essencial de cravo apresentou maior ação antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp quando comparado ao óleo essencial de orégano.

Observa-se que nas placas controle e, nas concentrações muito baixas de óleo essencial, ocorreu o crescimento fúngico em toda a extensão das placas para ambos os micro-organismos avaliados, sem a formação de qualquer halo de inibição micelial, demonstrando assim um crescimento vigoroso e normal dos fungos na ausência de um agente antimicrobiano. Assim, nas concentrações inferiores a 2,5 mg.mL⁻¹ para o óleo essencial de orégano e, de 5 mg.mL⁻¹ para o óleo essencial de cravo não houve formação de halo de inibição.

Assim sendo, os óleos essenciais de cravo e de orégano foram incorporados aos filmes na concentração de 40 mg.mL⁻¹, concentração onde ambos os óleos essenciais (cravo e orégano) e, para ambos os micro-organismos (*Aspergillus niger* e *Penicillium* spp) avaliados, apresentaram halo de inibição micelial em todas as placas avaliadas.

Pesquisadores têm encontrado atividade antimicrobiana no óleo essencial de orégano (BAYDAR *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2007). O óleo essencial de orégano possui alto conteúdo de compostos fenólicos, que são apontados como os responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (SOUZA *et al.*, 2006), sendo caracterizado pela predominância do carvacrol (74,56 a 81,46% do total de óleo) (KARPOUHTSIS *et al.*, 1998). Neste contexto, Souza *et al.* (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano sobre os micro-organismos *Cândida albicans*, *Pichia minuscula*, *Pichia ohmeri*, *Rhodotorula rubra* e *Sacharomyces cerevisiae*, sendo que concentrações

a partir de 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ apresentaram inibição no crescimento de tais microorganismos.

Souza *et al.* (2004) pesquisando os óleos essenciais dos condimentos alho (*Allium sativum* L.), canela (*Cinnamomum burnannil* Meissn), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), extraídos pela técnica de arraste a vapor e testados nas concentrações de 500; 1.000; 1.500 e 2.000 mg.mL^{-1} , exceto o óleo de cravo, que foi testado nas concentrações e 200; 400; 600 e 800 mg.mL^{-1} sobre os fungos *Rhizopus* sp.; *Penicillium* spp.; *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*, isolados de pães envelhecidos, mostraram que estes óleos apresentaram atividade biológica. Observaram que o óleo essencial de canela inibiu completamente o desenvolvimento dos fungos testados. Os óleos de tomilho e alho tiveram o mesmo efeito nas concentrações mais altas e o óleo de cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp. e *Eurotium repens*, com a concentração de 600 mg.mL^{-1} , e do fungo *Penicillium* spp. com 800 mg.mL^{-1} .

Pereira *et al.* (2006) avaliaram os efeitos inibitórios, *in vitro*, dos óleos essenciais dos condimentos, alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cebola (*Alliumcepa* L.), manjericão (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha piperita* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre o desenvolvimento de fungos. Os óleos foram testados nas concentrações de 500; 1.000; 1.500 e 2.000 mg.mL^{-1} . Como culturas padrões, foram utilizados os fungos *Fusarium* sp.; *Aspergillus ochraceus*; *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. O óleo essencial de orégano inibiu o desenvolvimento dos fungos testados em todas as concentrações, exceto o fungo *A. niger*, que teve o seu desenvolvimento micelial inibido a partir da concentração de 1.000 mg.mL^{-1} . Os óleos de alecrim, menta, cebola e manjericão tiveram um efeito pronunciado a partir da concentração de 1.500 mg.mL^{-1} .

3.2. Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais nas nanoemulsões

Não foi verificada diferença ($p>0,05$) para a avaliação do diâmetro das gotículas formadas nas nanoemulsões O/A com os óleos essenciais de cravo e de orégano por meio do teste t de Student. As nanoemulsões produzidas apresentaram diâmetro nanométrico (Tabela 4).

Donsí *et al.* (2011), empregaram alta energia de emulsificação por meio de microfluidização e relataram tamanhos de gotas entre 74,4 a 356,7 nm em nanoemulsões de D-limoneno e/ou uma mistura de terpenos com várias formulações e processados durante 10 ciclos a 300 MPa.

Tabela 4. Valores médios de diâmetro das gotículas dos óleos essenciais de cravo e de orégano nas nanoemulsões O/A.

Tipo de emulsão	Média (nm)	Desvio Padrão
Óleo essencial de Cravo	225,22	32,32
Óleo essencial de Orégano	193,44	40,64

Rao e McClements (2012) obtiveram nanoemulsões com diâmetro médio das gotículas de óleo de limão em torno de 217 nm.

Comparando os valores de diâmetro de gotículas encontrados no presente trabalho com os autores citados acima, percebe-se que as nanoemulsões obtidas neste trabalho apresentaram diâmetros de gotículas bem próximos aos relatados.

3.3. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes

Não foi verificada diferença ($p > 0,05$) para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* contra os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp. para os diferentes filmes avaliados. Assim, as reduções das gotículas de óleos essenciais nas emulsões O/A para a escala nanométrica não apresentaram efeito antimicrobiano mais potencializado quando comparadas aos filmes que tiveram a incorporação das emulsões tradicionais. Os filmes ativos apresentaram efeito antimicrobiano *in vitro*, observado pela presença de halos de inibição micelial para os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp, mas, o tipo de óleo essencial utilizado na produção das emulsões e o processo de produção das nanoemulsões óleo/água não afetaram este efeito.

Os halos típicos obtidos para a inibição dos fungos em estudo com a implantação dos filmes antimicrobianos nos meios de culturas estão apresentados na Figura 2.

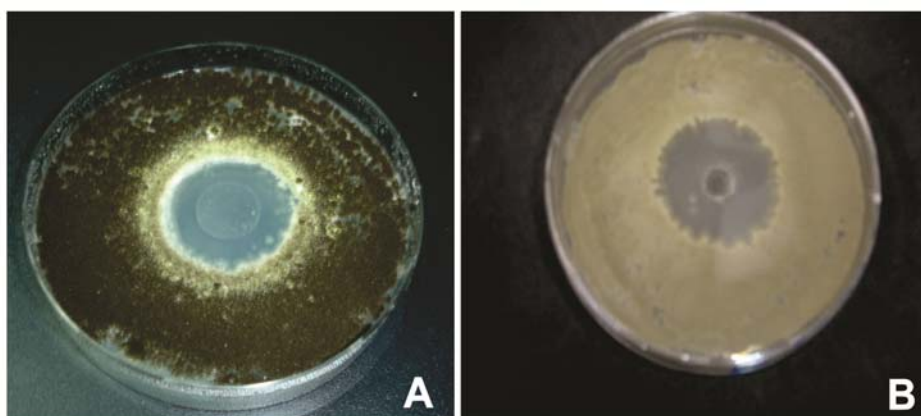


Figura 2. Halos de inibição característicos formados em resposta a ação antimicrobiana dos filmes de metilcelulose incorporados com nanoemulsões O/A para avaliação antimicrobiana dos fungos: A - *Aspergillus niger*; B- *Penicillium* spp.

O diâmetro médio dos halos formados nas placas contendo os filmes incorporados com as nanoemulsões dos óleos essenciais foi de $25,73 \pm 5,34$ para o fungo *Aspergillus niger* e, de $40,73 \pm 6,58$ mm para o fungo *Penicillium* spp. Nota-se que em geral, os filmes incorporados com as emulsões apresentaram um efeito antimicrobiano melhor para o fungo *Penicillium* spp. quando comparado ao efeito antimicrobiano para o fungo *Aspergillus niger*.

Rodríguez *et al.* (2007) desenvolveram uma embalagem de base celulósica contendo 4% de uma mistura de cinamaldeído enriquecido com óleo essencial de canela (80-85% p/p) e avaliaram a sua eficiência no armazenamento de morangos. O filme inibiu completamente o crescimento de fungos filamentosos sobre a superfície dos morangos durante 7 dias a 4 °C.

As placas inoculadas com os fungos em estudo e com a implantação do filme controle apresentaram crescimento fúngico total, sem a presença de formação de halos de inibição microbiana (Figura 3).

Embora a efetividade dos óleos essenciais dependa do micro-organismo alvo, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a atividade destes compostos pode ser uma ferramenta útil como método alternativo ao uso de antimicrobianos químicos, principalmente para aplicação em produtos de panificação, os quais poderiam conferir um aroma característico do óleo essencial utilizado e, assim, uma melhor aceitação sensorial destes produtos.

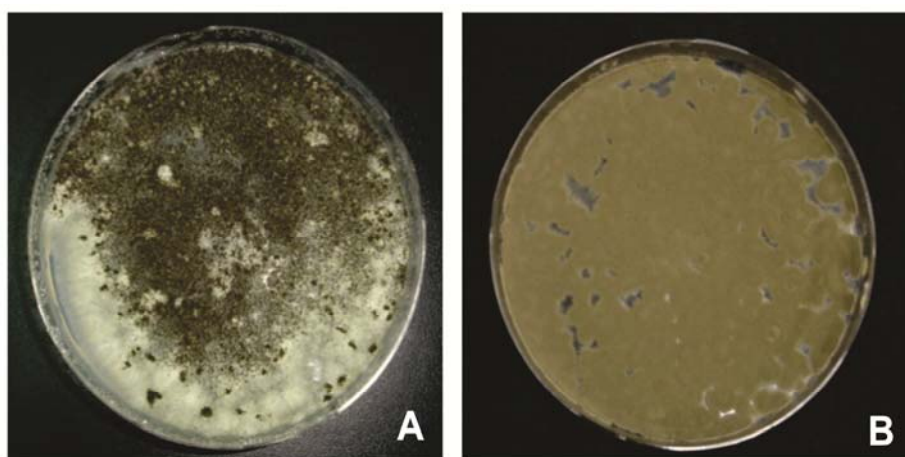


Figura 3. Características das placas sem formação de halos em resposta a ação antimicrobiana dos filmes de metilcelulose controle para a avaliação antimicrobiana dos fungos: A - *Aspergillus niger*; B- *Penicillium* spp.

Torna-se necessário um estudo *in vivo* para avaliar o efeito antimicrobiano destes filmes incorporados com emulsões tradicionais e com nanoemulsões dos óleos essenciais em alimentos, para verificar a sua eficácia e possibilidade de aplicação na indústria de panificação, por serem os produtos em que comumente estes fungos se desenvolvem.

O encapsulamento de eugenol e carvacrol em micelas nanométricas de surfactantes resultou em atividade antimicrobiana melhorada (GAYSINSKY *et al.*, 2005). Embora a adição de micela encapsulada de eugenol no leite resultou em um efeito inibitório menor ou similar ao eugenol não encapsulado (GAYSINSK *et al.*, 2007). Além disso, já foi relatado que a encapsulação nanoemulsões reduziu a atividade antimicrobiana em comparação com os compostos ativos desencapsulados, como mostrado para a quitosana, um polissacarídeo antimicrobiano (JUMAA *et al.*, 2002), e para o eugenol, um componente de óleo essencial (WEISS *et al.*, 2009). Pode-se notar, então, que é bem provável que o tipo de encapsulamento e de material que esteja sendo encapsulado influencie no efeito antimicrobiano obtido.

No trabalho de Espítia (2009) foi obtido efeito antimicrobiano para os filmes de base celulósica incorporados com 10 e 20% do óleo essencial de canela, orégano e capim limão, para o micro-organismo *F. semitectum*, sendo que, foi maior a atividade antimicrobiana contra este micro-organismo quando incorporados em 20%.

3.4. Análises de Caracterização dos filmes

3.4.1. Espessura

Verificou-se que os filmes controle de metilcelulose e, os incorporados com as emulsões O/A tradicionais e com as nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quanto ao parâmetro de espessura. Assim, as espessuras dos filmes produzidos foram uniformes, o que é desejável para a realização das comparações entre os tratamentos nas análises de caracterizações.

A incorporação das diferentes emulsões O/A nos filmes não afetaram a espessura dos filmes, mesmo com a redução das gotículas. O valor médio para as espessuras dos filmes foi de $131,66 \pm 26,50 \mu\text{m}$.

3.4.2. Propriedades mecânicas

Os valores (médios) das propriedades mecânicas dos filmes de metilcelulose incorporados das nanoemulsões tradicionais e com nanoemulsões dos óleos essenciais de orégano e de cravo estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Propriedades mecânicas de filmes de metilcelulose (C) incorporados com emulsões tradicionais (EC e EO), e com nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano (NC e NO).

Filme	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)
C	5,40 ± 1,13 ^a	20,46 ± 2,71 ^a	118,86 ± 24,53 ^a
EC	6,07 ± 1,11 ^a	40,29 ± 4,53 ^b	53,97 ± 8,71 ^b
NC	6,11 ± 1,26 ^a	56,61 ± 5,59 ^c	56,79 ± 16,58 ^b
EO	8,05 ± 1,45 ^a	34,08 ± 5,17 ^b	104,21 ± 4,15 ^a
NO	7,61 ± 1,32 ^a	54,77 ± 1,66 ^c	72,94 ± 10,97 ^b

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

No presente estudo, a incorporação das emulsões tradicionais dos óleos essenciais e das nanoemulsões nos filmes não afetou significativamente ($p > 0,05$) a resistência à tração, quando comparado ao filme controle, sem incorporação de emulsões.

Geralmente, as adições de fases oleosas levam a formação de filmes heterogêneos, apresentando descontinuidade na matriz polimérica (ZÚÑIGA *et al.*, 2012). Com a incorporação de óleos essenciais, esperava-se uma redução na resistência à tração, o que já foi reportado na literatura, inclusive com óleo essencial de orégano (ZIVANOVIC *et al.*, 2005; ROJAS-GRAU *et al.*, 2007; PELISSARI, 2009). Isto poderia comprometer a aplicabilidade dos filmes para embalagens de alimentos.

Assim, ao incorporar óleo essencial, que pode agir como plastificante e afetar negativamente a resistência à tração, reduz-se o teor de umidade dos filmes, umidade essa que também pode agir como plastificante; o que, possivelmente, explica porque não ocorreu diferença neste parâmetro. Nota-se, ainda, que a incorporação do óleo essencial de orégano nos filmes de metilcelulose, aparentemente, causou um impacto positivo na resistência à tração quando comparado ao óleo essencial de cravo, apesar de não terem apresentado diferenças para este parâmetro em comparação ao filme controle.

O alongamento indica a flexibilidade e a capacidade de estiramento dos filmes. Para este parâmetro, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os diferentes filmes avaliados. A incorporação das emulsões de óleos essenciais afetou o alongamento dos filmes de metilcelulose, além disso, a produção de nanoemulsões O/A também afetou o alongamento dos filmes. A redução do diâmetro das gotículas dos óleos essenciais acarretou no aumento do alongamento destes filmes, melhorando assim, uma das

propriedades mecânicas fundamentais para as aplicações dos filmes em embalagens para alimentos. Ou seja, tornou os filmes mais flexíveis e esticáveis.

A presença de fases oleosas aumentou o alongamento, indicando que os óleos essenciais incorporados aos filmes de metilcelulose agiram como plastificantes, conferindo maior capacidade de sofrer alongamento sem ruptura e melhor tenacidade. Trabalhos anteriores já haviam reportado comportamentos semelhantes em filmes de quitosana e amido enriquecidos com óleos essenciais (ZIVANOVIC *et al.*, 2005), alginato (ROJAS-GRAU *et al.*, 2007) e metilcelulose (QUEZADA GALLO *et al.*, 2000).

O módulo de elasticidade é um indicador da rigidez do filme, sendo que quanto maior este módulo, mais rígido é o material. Para o parâmetro de módulo de elasticidade houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os filmes avaliados. Como discutido anteriormente, a teoria dos óleos essenciais estarem atuando como agentes plastificantes, reduzindo a força das interações poliméricas e conferindo flexibilidade aos filmes de metilcelulose, é bem provável. Observa-se a redução no módulo de elasticidade dos filmes com a incorporação dos óleos essenciais às matrizes poliméricas, sendo mais notável com o óleo essencial de cravo.

Como o módulo de elasticidade indica o grau de rigidez de filmes plásticos, pode-se afirmar que os mesmos tornaram-se menos rígidos, ou mais maleáveis, com a adição da fase lipídica. Trabalhos anteriores já haviam reportado a redução no módulo de elasticidade após o acréscimo de óleos essenciais (ROJAS-GRAU *et al.*, 2007; PELISSARI *et al.*, 2009).

3.4.3. Taxa de permeabilidade ao vapor de água

Verificou-se que os filmes não diferiram ($p > 0,05$) quanto à taxa de permeabilidade ao vapor de água. Os filmes avaliados apresentaram um valor médio de taxa de permeabilidade de $232,599 \pm 48,899 \text{ g.m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$. As incorporações das emulsões O/A tradicionais e das nanoemulsões dos óleos essenciais não afetaram a taxa de permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

Espítia (2009) encontrou resultados semelhantes, na taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA), para os filmes incorporados com óleo essencial de orégano, canela e de capim limão em relação ao filme controle produzido apenas com acetato de celulose, encontrando valores de taxa de permeabilidade ao vapor de água de, aproximadamente $500 \text{ g.m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$.

Também, Rojas-Graü *et al.* (2007) relataram que a incorporação de óleo essencial de canela, orégano e capim limão não afetou a transmissão ao vapor de água de filmes produzidos a base de alginato.

Filmes produzidos com polímeros biodegradáveis, geralmente, apresentam taxa de permeabilidade ao vapor de água alto, devido a característica de hidrofiliçidade da maioria destes polímeros. A metilcelulose é solúvel em água e, sendo assim, apresenta a característica de hidrofiliçidade que nem mesmo a incorporação de uma fase oleosa constituída por nanoemulsões de óleos essenciais conseguiu melhorias neste parâmetro.

Pode ter ocorrido, também, que a incorporação dos óleos essenciais que possuem caráter apolar, não tenha alcançado uma homogeneidade suficiente no pólímero para modificar as cadeias poliméricas e melhorar a característica de barreira ao vapor de água.

3.4.4. Propriedades ópticas

3.4.4.1. Transparência

Um filme é considerado transparente quando a luz incidente sobre ele passa com mínima reflexão e absorção. Nos filmes de compostos contendo componentes imiscíveis, os tamanhos das partículas da fase dispersa, as heterogeneidades das suas distribuições e as diferenças entre o índice de refração das fases afetam o grau de dispersão da luz e, portanto, a transparência do filme (FABRA *et al.*, 2009). A transparência do filme é propriedade relevante, uma vez que tem um impacto direto sobre a aparência do produto embalado e sua aceitação.

A transparência dos filmes para os comprimentos de onda do visível (500 nm) e ultravioleta (210 nm) não apresentou diferença ($p > 0,05$). Todos os filmes avaliados neste estudo apresentaram similaridade quanto à característica de transparência. As incorporações das emulsões O/A tradicionais e das nanoemulsões com redução de gotículas não afetaram a transparência dos filmes.

No comprimento de onda de 210 nm, o valor médio de transmitância obtido foi de $62,455 \pm 12,004\%$. No comprimento de onda de 500 nm os filmes apresentaram um valor médio de $34,058 \pm 14,215\%$ de transmitância. Estes resultados mostram que os filmes absorveram mais na região do visível (500 nm) e, conseqüentemente, apresentaram alta taxa de transmitância na região do ultravioleta (210 nm), demonstrando, assim, característica de transparência neste comprimento de onda.

O filme controle apresentou excelente característica de transparência que nem mesmo as incorporações das nanoemulsões de óleos essenciais resultaram em diferenças

na transmissão de luz, em ambas as regiões avaliadas. Este atributo do filme de metilcelulose justifica a sua utilização como filme para alimentos, principalmente para cumprir a expectativa dos consumidores em observar os alimentos através da embalagem antes da compra.

3.4.4.2. Análise de cor

Os resultados para a análise de cor dos filmes quanto aos parâmetros L^* , a^* e b^* estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores médios da análise de colorimetria dos filmes de metilcelulose (C) incorporados com emulsões tradicionais (EC e EO), e com nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano (NC e NO) nas coordenadas de cor L^* ; a^* e b^* .

Filmes	L^*	a^*	b^*
C	$55,77 \pm 3,65^a$	$0,470 \pm 0,04^a$	$1,34 \pm 0,20^a$
NO	$54,45 \pm 1,68^a$	$0,53 \pm 0,07^a$	$2,07 \pm 0,47^{a,b}$
EO	$57,68 \pm 3,02^a$	$0,473 \pm 0,10^a$	$1,93 \pm 0,17^{a,b}$
NC	$58,33 \pm 0,73^a$	$0,44 \pm 0,05^a$	$1,73 \pm 1,73^{a,b}$
EC	$59,37 \pm 2,26^a$	$0,52 \pm 2,26^a$	$1,92 \pm 1,68^{a,b}$

*Médias seguidas de mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Não houve diferença ($p > 0,05$) para o parâmetro L^* entre os filmes avaliados. O L^* caracteriza a luminosidade na escala de 0 (preto) a 100 (branco). Como os filmes apresentaram um valor de L^* próximo de 60, este resultado demonstra que os filmes apresentaram-se com coloração clara.

O parâmetro de cor a^* também não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os filmes avaliados. Os valores encontrados foram baixos, demonstrando, assim, que os filmes obtidos apresentaram-se com uma coloração amarelo-clara, próxima a incolor.

As incorporações das emulsões O/A tradicionais e das nanoemulsões não afetou a luminosidade e o parâmetro a^* dos filmes.

Para o parâmetro de cor b^* , houve diferença ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey entre os filmes avaliados. O menor valor encontrado foi para o filme controle, constituído apenas do polímero metilcelulose, o qual diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) dos filmes incorporados com emulsões O/A tradicionais e com as nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano. Como os valores obtidos também foram baixos, possivelmente, o filme controle apresentou uma coloração amarelo um pouco mais clara que os filmes incorporados das nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano.

3.4.5. Caracterização microscópica

3.4.5.1. Microscopia eletrônica de varredura

Imagens obtidas através do microscópio eletrônico de varredura (MEV), sobre a superfície dos filmes (Figura 4).

Imagens dos filmes obtidas através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 4). Na imagem 4A, referente ao filme controle, nota-se a imagem homogênea e lisa, diferentemente das demais imagens. Nas imagens 4B e 4D referentes aos filmes incorporados com emulsões tradicionais dos óleos essenciais de orégano e de cravo, nota-se a formação de gotículas de diâmetros variados, com uma distribuição de diâmetro heterogêneas.

Nas imagens 4C e 4E obtidas para os filmes incorporados com nanoemulsões do óleo essencial de cravo e de orégano, respectivamente, nota-se que estes apresentam gotículas de óleo essencial menores e de distribuição mais homogênea. As gotículas dos óleos essenciais permaneceram na escala nanométrica após a incorporação nos filmes, secagem e polimerização revelando estruturas esféricas de diâmetro na faixa de (150 - 250 nm), sendo que estes diâmetros das gotículas descritos nas imagens do MEV foram similares aos obtidos na análise de espalhamento de luz por meio do Nanophox e descritos no item 3.3.

A caracterização de formulações em nano-sistemas requer diversas técnicas (KLANG e VALENTA, 2011). Características como diâmetros de gotículas são empregadas, além disso, técnicas adicionais tais como as de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de força atômica permitem, também, observar a morfologia, o diâmetro e estrutura das gotículas de óleos essenciais formadas.

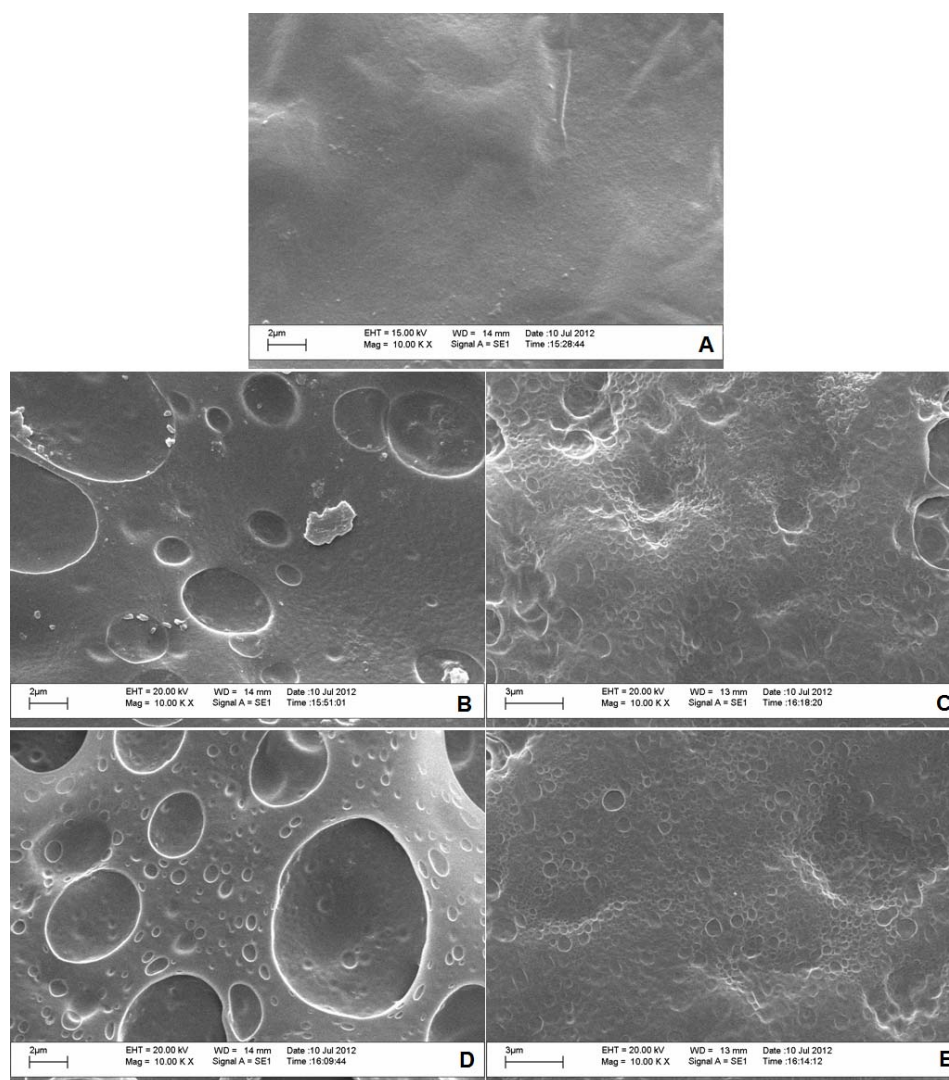


Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de filmes de metilcelulose: (A) -filme controle; (B) - filme com emulsões (O/A) do óleo essencial de cravo; (C)- filmes com nanoemulsões (O/A) do óleo essencial de cravo; (D) - filme com emulsão O/A do óleo essencial de orégano; (E) - filme com nanoemulsão O/A do óleo essencial de orégano.

3.4.5.2. Microscopia de força atômica

Imagens obtidas através do microscópio de força atômica (MFA), sobre a superfície dos filmes (Figura 5). Nota-se um filme controle de aparência uniforme, sem a incorporação de qualquer tipo de óleo essencial 5A e de topografia regular, diferindo das demais imagens, referentes aos filmes incorporados com as nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano.

Nas imagens dos filmes incorporados com emulsões O/A tradicionais do óleo essencial de cravo 5C e 5D e do óleo essencial de orégano (5G e 5H), foi possível perceber a presença de gotículas de óleos essenciais com diâmetros variados, bastante desuniformes e topografia extremamente rugosa.

Nos filmes incorporados de nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo 5E e 5F e de orégano (5I e 5J), foi possível identificar gotículas de óleos essenciais menores, com diâmetros inferiores a 300 nm e mais uniformes, além da presença de topografia menos rugosa e mais homogênea.

Nota-se, ainda, que as gotículas presentes nos filmes incorporados de nanoemulsão do óleo essencial de orégano apresentaram-se diâmetros menores que aquelas presentes nos filmes incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de cravo.

Os resultados demonstram que após a polimerização dos filmes, as nanogotículas formadas nas nanoemulsões O/A dos óleos essenciais de cravo e de orégano e incorporadas dos filmes permaneceram presentes nos mesmos.

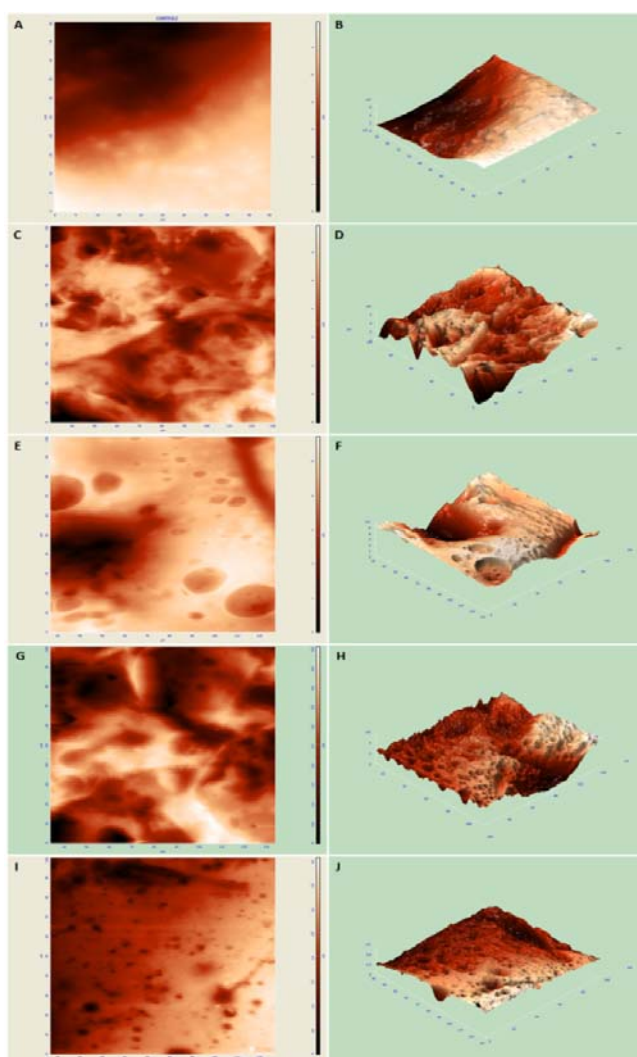


Figura 5. Microscopia de Força Atômica (AFM) de filmes de metilcelulose controle (A e B); incorporados com emulsões aquosas dos óleos essenciais de cravo (C e D); com nanoemulsões do óleo essencial de cravo (E e F); incorporados com emulsões aquosas dos óleos essenciais de orégano (G e H) e com nanoemulsões do óleo essencial de orégano (I e J).

3.4.6. Hidrofobicidade da superfície

Não houve diferença ($p > 0,05$) para a análise da energia livre global de interação $\Delta G_{\text{SWS}}^{\text{TOT}}$ da superfície do filme controle quando comparado aos filmes incorporados com as emulsões tradicionais e das nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano. O valor médio $\Delta G_{\text{SWS}}^{\text{TOT}}$ obtido foi de $40,86 \pm 16,22 \text{ mJ.m}^{-2}$. Verificou-se assim, que as incorporações das emulsões O/A tradicionais e das nanoemulsões não afetaram a energia livre de hidrofobicidade de superfície dos filmes de metilcelulose.

A hidrofobicidade de um dado material é expressa como a energia livre de interação entre dois entes físicos imersos na água. Quando a energia livre de interação hidrofóbica entre as moléculas imersas em água é atrativa, ou seja, o valor de $\Delta G_{\text{SWS}}^{\text{TOT}}$ é negativo, significa que as moléculas do sólido têm maior interação entre si do que pela água. Assim, uma superfície hidrofóbica apresenta valores de $\Delta G_{\text{SWS}}^{\text{TOT}}$ negativos. Quando a energia livre global da interação entre as moléculas de um sólido imerso em água é suficientemente repulsiva, ou seja, o valor de $\Delta G_{\text{SWS}}^{\text{TOT}}$ é positivo, a superfície é considerada hidrofílica (VAN OSS e GIESE, 1995).

ZÚÑIGA *et al.*, (2012) encontraram o valor de $42,20 \text{ mJ.m}^{-2}$ para a medida de energia livre de superfície em filme de hidroxipropilmetilcelulose incorporados de emulsões de óleos de girassol. Os autores relataram que a incorporação das emulsões também não apresentou efeito sobre o parâmetro de energia livre de superfície, Consideraram que, provavelmente, a superfície do filme à base de emulsão foi composta por uma camada contínua de hidroxipropilmetilcelulose em torno das gotículas dos óleos essenciais. Portanto, o aumento da rugosidade da superfície dos filmes produziu compensação nos componentes polares e apolares dando valores semelhantes para os diferentes filmes.

Dentre os fatores físico-químicos que influenciam nas características de barreira dos filmes, o parâmetro hidrofobicidade apresenta relevância. Uma vez que para o acondicionamento dos alimentos devem-se levar em consideração as características da embalagem bem como do produto que serão acondicionados, para que haja compatibilidade entre ambos, evitando assim, que a embalagem constitua um fator para a deterioração do produto.

Como o valor médio encontrado para $\Delta G_{\text{SWS}}^{\text{TOT}}$ foi positivo, podemos concluir que os filmes incorporados com as emulsões tradicionais e com as nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano, apresentaram uma superfície hidrofílica. Assim, a característica de hidrofílicidade da metilcelulose não foi modificada com a incorporação dos óleos essenciais. Este resultado é condizente com os resultados da

análise da taxa permeabilidade ao vapor de água obtido, e descrito no item 3.4.3, onde foi observado que não ocorreu modificação para os filmes incorporados das emulsões dos óleos essenciais.

Camilloto *et al.*, (2010), observaram que a adição de triclosan aumentou a hidrofobicidade em filmes à base de celulose e baixou esta característica em filmes de polietileno. Para o filme de base celulósica controle foi relatado um valor de ΔG_{SWS}^{TOT} de $5,40 \text{ mJ.m}^{-2}$, demonstrando um caráter hidrofílico.

Assim, um dos fatores que limita a utilização dos polímeros biodegradáveis é a sua característica de hidroflicidade.

Segundo Van Oss e Giese (1995), as medidas do ângulo de contato entre uma gota de um líquido sobre uma superfície indicam que esta última é hidrofílica, se forem inferiores a 50° . Ângulos superiores a este valor indicam uma superfície hidrofóbica.

Não houve diferença ($p > 0,05$) para a determinação do ângulo de contato com a superfície do filme para o líquido água. O valor médio do ângulo obtido para a medição nas superfícies dos filmes com o líquido água foi de $27,56 \pm 6,09^\circ$.

A metilcelulose apresenta caráter altamente polar, conferindo, assim, alta hidroflicidade aos filmes. As incorporações das emulsões dos óleos essenciais não alteraram esta característica do polímero, provavelmente, devido à dificuldade de incorporação de compostos lipídicos nestas matrizes poliméricas. Devido à baixa solubilidade em água, os componentes dos óleos essenciais precisam ser encapsulados em sistemas de carreamento adequados a fim permanecerem ativos (WEISS *et al.*, 2009).

Há um interesse considerável no desenvolvimento de sistemas de carreamento para encapsular, proteger e libertar componentes lipofílicos bioativos (PARADA e AGUILERA, 2007, LEE e McCLEMENTS, 2010; LI *et al.*, 2010).

Imagens das gotas com as superfícies das amostras, representando a molhabilidade da água nos filmes (Figura 6). Dependendo da polaridade do líquido usado na medida do ângulo de contato determina-se o grau de hidroflicidade ou hidrofobicidade.

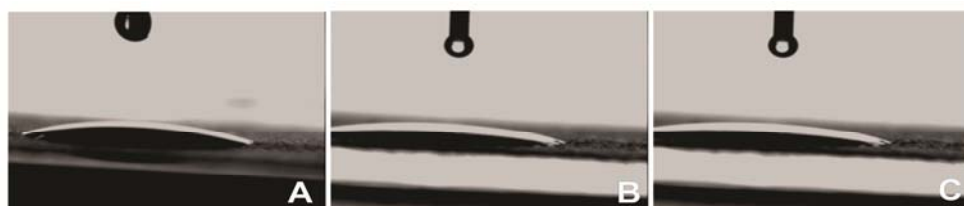


Figura 6. Determinação do ângulo de contato da água com os filmes. A: Controle; B: incorporado com nanoemulsão do óleo essencial de cravo e C: incorporado com nanoemulsão do óleo essencial de orégano.

No caso da água, líquido altamente polar, os filmes avaliados reagiram facilmente com a água e formaram um ângulo de contato com valor menor que 50°. Isto ocorreu devido a presença de grupos funcionais polares (grupos OH) que fizeram com que as moléculas da água interagissem facilmente com as moléculas do polímero metilcelulose que é solúvel em água.

3.4.7. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de FTIR foi empregada, para examinar as interações químicas entre a metilcelulose e os óleos essenciais (Figura 7).

Quando duas ou mais substâncias são misturadas, as combinações físicas *versus* as interações químicas são refletidas por mudanças características nas bandas dos espectros (GUAN *et al.*, 1998; YIN *et al.*, 1999).

O filme controle, constituído apenas de metilcelulose, sem a incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais, apresentou bandas de absorção em 2886,61 cm⁻¹ referente ao alongamento C-H, picos de 1466,41 cm⁻¹ ao alongamento C-O e 1061,47 cm⁻¹ a vibração C-O-C. A presença dos picos restantes pode ser atribuída à presença de grupos metoxil.

Esses valores são bem próximos aos relatados por MURA *et al.* 2011, que obtiveram picos similares no espectro da metilcelulose pura, onde foram observados os picos característicos em 3471 cm⁻¹, referente ao alongamento O-H, 2932 cm⁻¹ ao alongamento C-H, picos de 1,585cm⁻¹ ao estiramento C-O, picos de 1064 cm⁻¹ a vibração do C-O-C e, os demais picos referentes aos grupos metoxil (1465, 1123, 944 cm⁻¹).

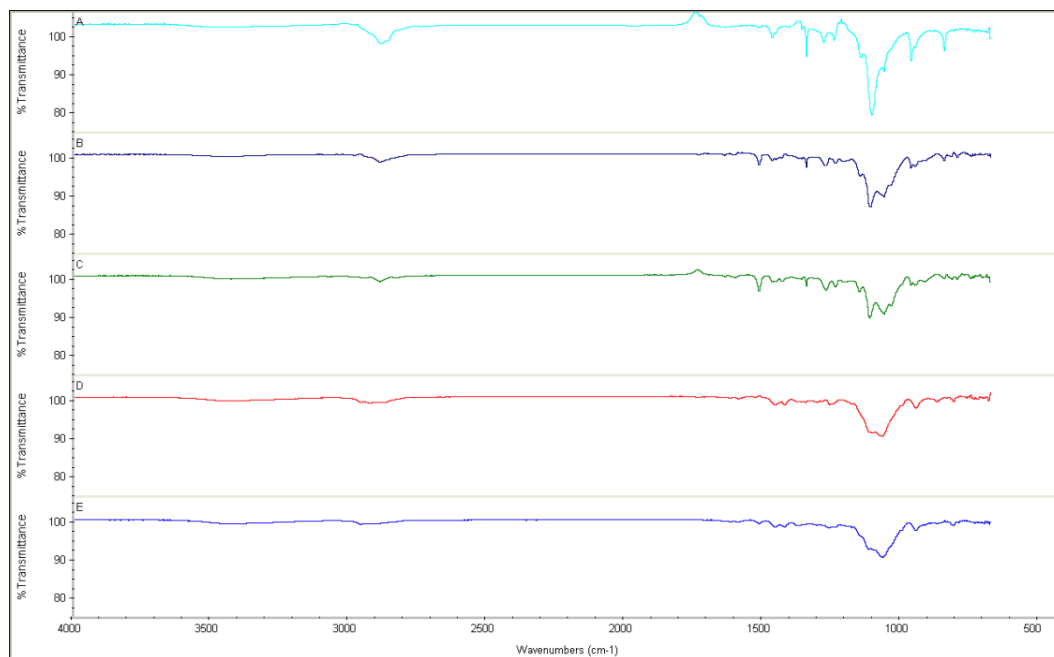


Figura 7. Espectros do FTIR de transmitância realizadas por transmissão na faixa de 4000-400 cm^{-1} diretamente na superfície dos filmes. A - produzidos a partir de metilcelulose; B - incorporados de nanoemulsões O/A do óleo essencial de cravo; C - incorporados de emulsões O/A do óleo essencial de cravo; D - incorporados de nanoemulsões O/A do óleo essencial de orégano; E - incorporados de emulsões O/A do óleo essencial de orégano.

A incorporação das nanoemulsões óleo/água produzidas com os óleos essenciais de cravo e de orégano ocasionou o aparecimento de novas bandas nos espectros dos filmes. A presença do pico em aproximadamente $3428,96 \text{ cm}^{-1}$ pode ser devido ao estiramento O-H. As bandas entre 1600 e 1400 cm^{-1} são referentes as três insaturações do anel benzênico e uma do próprio anel. O motivo para o aparecimento dessas bandas deve-se à presença dos hidrocarbonetos aromáticos p-cimeno, timol e γ -terpineno e, ainda, do composto fenólico carvacrol na composição do óleo essencial de orégano (PELISSARI, 2009). Nos espectros dos filmes em que foram incorporadas as nanoemulsões de óleo essencial de cravo, as novas bandas que aparecem nos espectros destes filmes, podem ser devido aos constituintes deste óleo, como por exemplo, a presença do eugenol.

Os espectros obtidos foram característicos dos constituintes de cada filme produzido, demonstrando, assim, que ao realizar a incorporação das nanoemulsões dos óleos essenciais na matriz polimérica de metilcelulose estas interagiram com o polímero e, apresentaram-se presentes após o processo de polimerização e secagem. Notou-se a partir da análise dos espectros descritos nas Figuras 7B e 7C relativos aos filmes incorporados pelas nanoemulsões do óleo essencial de cravo e apenas com a emulsão de cravo respectivamente, pode-se perceber que são bem semelhantes, o que, possivelmente, explica o porquê das pequenas alterações perceptíveis nas medidas de

caracterização dos filmes incorporados por emulsão produzida com o mesmo. Assim sendo, possivelmente as interações químicas entre o polímero e as emulsões foram bem semelhantes independentes da formação ou não de nanoemulsões. O mesmo pode ser observado nas Figuras 7D e 7E, onde foi perceptível as semelhanças nos espectros obtidos para as diferentes nanoemulsões do óleo essencial de orégano.

Levando-se em consideração que não ocorreram mudanças nas propriedades de barreira e do caráter hidrofílico da matriz polimérica, acredita-se que as interações ocorridas foram simples, as quais não acarretaram em grandes alterações na estrutura polimérica. Este fato pode ser devido à dificuldade em se incorporar componentes oleosos, em polímeros solúveis em água como é o caso da metilcelulose.

4. CONCLUSÕES

A utilização de filme a base de biopolímero (metilcelulose) para a produção de embalagens antimicrobianas incorporadas com emulsões e nanoemulsões de óleos essenciais de cravo e de orégano na concentração de $40\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pode melhorar a conservação de alimentos, uma vez que apresentou efeito de inibição microbiana para os fungos *Aspergillus niger* e *penicillium spp.*

A redução das gotículas das emulsões não potencializou o efeito antimicrobiano das emulsões. As incorporações das emulsões nos filmes acarretaram em um melhor alongamento e flexibilidade, e não afetaram as propriedades de barreiras.

Portanto, torna-se imprescindível aprofundar os conhecimentos em torno do assunto como a aplicação desses filmes *in vivo*, para obter assim, maiores informações sobre o impacto de diferentes tamanhos de gotículas de emulsões óleo/água de óleos essenciais de cravo e orégano sobre a conservação e possíveis interferências nas propriedades do alimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPENDINI, P. e HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 113–126, 2002.

ARAÚJO, E. A.; BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, P. E.; SÁ, J. P. N. Hydrophobicity of ribotypes *Bacillus cereus* isolates from dairy plants. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 3, p. 491–497, jul./set. 2009.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1484–1490, 2007.

ASTM Standard D-882. **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2009a.

ASTM. American society standard testing and materials. **Standard test methods for water vapor transmission of materials E 9624854-1**. Philadelphia, Pa.: ASTM. 11 p. 2010.

BAYDAR H, SAODIÇO O, OZKAN G, KARADOAN T. Antibacterial activity and composition of essential oils from origanum, thymbra and satureja espécies with commercial importance in turkey. **Food Control**, v.15, p.169–172, 2004.

BENGTSSON, M.; KOCH, K.; GATENHOLM, P. Surface octanoylation of highamylose potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 1, p. 1–11. 2003.

BORLIEU, C., GUILLARD, V., VALLÈS-PAMIÈS, B., GONTARD, N. Edible moisture barriers for food product stabilization. In J. M. Aguilera, P. J. Lillford (Eds.), **Food Materials Science: Principles and practice**. New York: Springer, p. 547–575, 2007.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLLI, M.; DEHESA, M.. Chemical composition and biological activities of ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from ocotea quixos (lam) kosterm (lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v.85, p. 415–21, 2004.

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

CAMILLOTO, G. P.; PIRES, A, C. S.; SOARES, N. F. F.; ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; FERREIRA, S. O. Effect of active packaging incorporated with triclosan on bacteria adhesion. **Journal of Food Science**, v. 75; N. 8, 2010.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.107, p. 125–155, 2004.

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

ESPITIA, P. J. P. **Desenvolvimento e avaliação de embalagens ativas incorporadas com óleos essenciais para a conservação pós-colheita de mamão**. 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, 109 p, 2009.

FABRA, M. J., TALENS, P., CHIRALT, A.. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. **Food Hydrocolloids**, 23, 676–683, 2009.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v.251, p. 53–58, 2004.

GAYSINSKY, S., DAVIDSON, P. M., BRUCE, B. D., WEISS, J. Growth inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. **Journal of Food Protection**, v.68(12), 2559–2566. 2005.

GAYSINSKY, S., TAYLOR, T. M., DAVIDSON, P. M., BRUCE, B. D., WEISS, J. Antimicrobial efficacy of eugenol microemulsions in milk against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Food Protection**, v.70(11), p.2631–2637. 2007.

GUAN, Y. L.; LIU, X. F.; ZHANG, Y. P.; YAO, K. D. Study of phase behavior on chitosan/viscose rayon blend film. **Journal of Applied Polymer Science**, v.67, p.1965–1972, 1998.

JUMAA, M., FURKERT, F. H., MULLER, B. W. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53(1), p.115-123, 2002.

KARPOUTHTSIS, I.; PADALI, E.; FEGGOU, E.; KOKKINI, S.; SCOURAS, Z. G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p.1111-1115, 1998.

KLANG, V., VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.21, p.55–76, 2011.

KUMAR, M.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K.; PARVAIZ, M. R. Effect of glycidyl methacrylate (GMA) on the thermal, mechanical and morphological property of biodegradable PLA/PBAT blend and its nanocomposites. **Bioresource Technology**, v. 101, n.21, 2010.

LEE, S. J., McCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/ evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, v.24(6 –7), P.560–569. 2010.

LEGAN, J.D.; VOYSEY, P.A. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p.361– 371, 1991.

LI, C.; MEI, Z.; LIU, Q.; WANG, J.; XU, J.; SUN, D. Formation and properties of paraffin wax submicron emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 356, p. 71–77, 2010.

LIMA I.O, OLIVEIRA, R. A.G; LIMA, E.O, FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.197–201, 2006.

MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae **International Journal of Food Microbiology**, 67, 187–195, 2001.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: Principles, practices and techniques** (2nd ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press. 1999.

MENEZES, T.O.A.; ALVES, A.C.B.A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, S. A. F; ALVES, B.P.;MENDONÇA, L.C.V. In vitro evaluation of the anti-fungii activity of essential oils and plant extracts present in the amazon region about the strain of *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**. 38(3): 184-91, 2009.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T.; SELKE, S. E.; HARTE, B. R.; HINRICHSEN, G. **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites**, An. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005.

MURA, S.; CORRIAS, F.; STARA, G.; PICCININI, M.; SECCHI, N.; MARONGIU, D.; INNOCENZI, P.; IRUDAYARAJ, J.; GREPPI, G.F. Innovative Composite Films of Chitosan, Methylcellulose, and Nanoparticles. **Journal of Food Science**, v. 00, N.0, p.1–7, 2011.

NASCIMENTO, G. G. F.; LUCATELLI, J. FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazil Journal Microbiology**, v. 31, 247–256, 2000.

NASCIMENTO, P. F C; NASCIMENTO, A.C; RODRIGUES, C.S, ANTONIOLLI, A.R. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, p.108–13, 2007.

NUNES, X.P.; MAIA, G.L.; ALMEIDA, J.R.G.; PEREIRA, F.O.; LIMA, E.O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**,v.16, p.642-4, 2006.

PARADA, J., AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of food several nutrients. **Journal of Food Science**, v.72(2), R21– R32, 2007.

PELISSARI, F. M. Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca, quitosana e glicerol com incorporação de óleo essencial de orégano. 2009. 122p. **Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina**, Londrina, 2009.

PEREIRA, M. C.; VILELA, C. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F. da; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N. da; PICCOLI, R. H. Inhibition fungi growth through of utilization essential oils of spice. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n.4, p. 731–738, July/Agu. 2006.

PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano emulsions prepared by low energy emulsification methods

at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.288, p.144–150, 2006.

QUEZADA GALLO, J. A., DEBEAUFORT, F., CALLEGARIN, F., VOILLEY, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distributions effects on the properties of emulsion-based edible films. **Journal of Membrane Science**, v.180, p. 37– 46, 2000.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. **Food Hydrocolloids**, v.29; p. 326–334, 2012.

RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**. V. 50, n. 8, 2005.

RODRÍGUEZ, A.; BATLLE, R. AND NERÍN, C. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. **Progress in Organic Coatings**, v.60, n.1, p.33–38, 2007.

ROJAS-GRAÜ, M. A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; OLSEN, C.; FRIEDMAN, M. HENIKA, P. R.; MARTÍN-BELLOSO, O.; PAN, Z.; McHUGH, T. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 634 – 641. 2007.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., VARGAS, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHIRALT, A., Cháfer, M. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. **Food Engineering, Reviews**, v.3(1), p. 1-16, 2011.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., VARGAS, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHIRALT, A., CHÁFER, M. Characterization of edible films base don hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2102–2109, 2009.

SHARMA, P. K.; RAO, K.H. Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. **Advance in Colloid and Interface Science**, v. 98(3): p.341–463, 2002.

SOARES, N. F. F. Bitterness Reduction in Citrus Juice Through Naringinase Immobilized into Polymer film. Ithaca, NY. **Dissertation, Cornell Univesity**, 130 p. Ph D, 1998.

SOARES, N. F. F; RUTISHAUSER, D. M.; MELO, N.; CRUZ, R. S.; ANDRADE N. J. Inhibition of microbial growth in bread through active packaging. **Packaging Technology and Science**, v. 15, p. 129–132, 2002.

SOLÉ, I.; MAESTRO, A.; PEY, C. M.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Nano- emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.288, p.138–143, 2006.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**, volume 1. 7ª edição. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001.

SOUZA, A.C.A.C.; POLTRONIERI, L.S.; COSTA, R.C.; PEREIRA DRS, FECURY MM, SANTOS IP. Ação do extrato do cravo da índia sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. In: **Anais do III Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais**; 2006. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental; p. 11. 2006.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. AND TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v.18, n. 5, p. 409–413, 2007.

SOUZA, S. M. C. de; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.3, p.685–690, maio/jun. 2004.

TANG, C.H.; JIANG, Y.; WEN, Q. B.; YANG, X.Q. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. **Journal of Biotechnology**, v.120, p. 296–307, 2005.

VAN OSS, C.J. Hydrophobicity of biosurfaces - origin, quantitative determination and interaction energies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 5, 91-110, 1995.

WEISS, J., GAYSINKSY, S., DAVIDSON, M., MCCLEMENTS, J., 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.

YIN, Y. J.; YAO, K. D.; CHENG G. X.; MA, J. B. Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. **Polymer International**, v.48, p.429–433, 1999.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal Food Science**, 2005, 70, M45–M51.

ZÚÑIGA, R.N.; SKURTYS, O.; OSORIO,G.;AGUILERA, J.M.; PEDRESCHI, F. Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose films: Effect of their microstructure . **Carbohydrate Polymers**. v.90 p.1147–1158. 2012.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DE FILMES DE METILCELOSE INCORPORADOS COM NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA A CONSERVAÇÃO DE PÃES DE FORMA

RESUMO

Os produtos de panificação são deteriorados, principalmente, por microorganismos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* durante o armazenamento, apresentando uma vida útil curta necessitando da utilização de conservantes para a sua conservação. Os consumidores têm buscado o consumo de alimentos mais saudáveis com a utilização de menores quantidades de conservantes químicos. Neste sentido, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a potencialidade da aplicação de filmes de metilcelulose incorporados com nanoemulsões de óleos essenciais de cravo e orégano para a conservação de pão de forma fatiado. Pães de forma foram armazenados nos filmes incorporados com nanoemulsão de óleo essencial de cravo, nanoemulsão do óleo essencial de orégano, com emulsão de cravo, com emulsão de orégano e, avaliado quanto ao desenvolvimento de leveduras e bolores e propriedades físico-químicas ao longo do armazenamento por 15 dias. Além disto, foi aplicado um estudo de grupo de foco objetivando a avaliação da aceitação dos pães de forma após 5 dias de acondicionamento nas embalagens antimicrobianas. Os filmes incorporados com as emulsões foram efetivos na redução das contagens de leveduras e bolores durante o armazenamento a 25 °C por 15 dias, mas a redução das gotículas dos óleos essenciais nas emulsões demonstrou ter potencializado o efeito antimicrobiano nos pães de forma. As amostras de pães de forma tornaram-se mais duras, seu teor de umidade variou e correlacionou-se diretamente com as variações no parâmetro de textura durante o armazenamento. Os parâmetros de pH, acidez e cor das amostras de pães não foram afetados pela utilização dos filmes incorporados com as emulsões dos óleos essenciais. Conclui-se, portanto, que os filmes incorporados com as emulsões dos óleos essenciais foram efetivos na conservação microbiológica de pães de forma pelo período de 10 dias sem o aparecimento visível de fungos. Por meio das análises das discussões de grupo de foco, verificou-se que as aplicações das embalagens antimicrobianas nos pães de forma fatiados afetaram negativamente as características sensoriais deste produto. Notou-se ainda que a expressão “embalagem ativa” é um conceito inovador e pouco conhecido

pelos consumidores de pão de forma.

1. INTRODUÇÃO

Devido às crescentes exigências dos consumidores por produtos naturais, sem adição de conservantes químicos, aliada a preocupação ambiental, tem induzido o setor de embalagens de alimentos na busca por melhorias, para atender estas expectativas. Assim, tem surgido novas pesquisas neste campo da ciência, objetivando um menor emprego de aditivos químicos e utilização de polímeros biodegradáveis.

Neste contexto, materiais à base de celulose estão sendo amplamente utilizados para a produção de filmes porque oferecem as vantagens como comestibilidade, biocompatibilidade, propriedades de barreira, boa aparência estética, sendo não-tóxico, não-poluente e tendo baixo custo (VASCONEZ *et al.*, 2009). Excelentes discussões sobre a utilização de biomateriais na formação de filmes para alimentos e estudos sobre as avaliações de suas propriedades têm sido relatados na literatura (BORLIEU *et al.*, 2007, 2009; SKURTYS *et al.*, 2010, ZÚÑIGA *et al.*, 2012).

O Pão sempre foi um dos produtos alimentares mais populares devido às suas características nutricionais e sensoriais superiores, sendo consumidos diariamente (GALIC *et al.*, 2009). No entanto, a vida útil de pães e outros produtos de panificação é curta, principalmente, devido ao endurecimento, que é resultado de uma série de alterações físico-químicas que ocorre após o assamento e durante a armazenagem. O endurecimento é caracterizado, principalmente, devido à retrogradação do amido e as interações entre amido e proteínas, amolecimento da crosta devido à transferência de umidade do miolo para a superfície e, finalmente, alterações de sabor. Consequentemente, essas mudanças são responsáveis pela perda de grandes quantidades de pães (8-10%), por conseguinte, resultando em perdas econômicas (LORENZ e MAGA, 1972; CORSETTI *et al.*, 2000; GUARDA *et al.*, 2004; KATINA *et al.*, 2006; PLESSAS *et al.*, 2008). A vida útil de pão é limitada também por deterioração por crescimento fúngico (NIELSEN e RIOS, 2000), e devido a perda de umidade (DEL NOBILE *et al.*, 2003).

Dentre os métodos de conservação, na área de panificação, os mais usados são a adição de conservantes químicos à massa e a preservação dos produtos a baixas temperaturas. A incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais de cravo e orégano numa matriz polimérica oriunda de fonte renovável, como a metilcelulose, pode constituir uma alternativa viável para a conservação de pães de forma.

Assim, as novas tecnologias em embalagens para alimentos têm surgido e ganhado espaço no setor, como é o caso das embalagens ativas. Segundo Gontard

(1997) uma embalagem ativa é aquela que, além de proteger, interage com o produto e, em alguns casos, responde realmente às mudanças. Para esta tecnologia de embalagens, polímeros biodegradáveis, agentes ativos naturais e em nanoescala têm sido investigados por diversos pesquisadores (PRANOTO *et al.*, 2005.; RODRIGUÉZ *et al.*, 2007; KRISTO *et al.*, 2008; IMRAN *et al.*, 2010; MURA *et al.*, 2011).

A liberação de aditivos por intermédio de embalagens ativas aumenta a segurança do consumidor, pois esses compostos, em vez de serem diretamente adicionados ao alimento, são liberados de forma controlada em menores quantidades, e apenas onde sua presença é requerida (SOARES *et al.*, 2002; MELO, 2006).

Dentre as embalagens ativas podem ser citadas as embalagens antimicrobianas, que são capazes de eliminar ou inibir micro-organismos deterioradores ou patogênicos. O princípio de atuação desse tipo de embalagem é a adição de uma barreira microbiológica às tradicionais barreiras físicas de oxigênio e umidade (HAN, 2003). As embalagens ativas antimicrobianas têm sido pesquisadas para aplicação em uma variedade de produtos alimentícios, como produtos cárneos (ZIVANOVIC *et al.*, 2005), pães (BERTAN, 2008; PLESSAS *et al.*, 2008; LATOU *et al.*, 2010) e suco de laranja (EMAMIFAR *et al.*, 2011). Filmes incorporados com óleos essenciais podem ser avaliados quanto à atividade antimicrobiana e, também quanto a aromatização dos produtos acondicionados, isto se deve ao caráter de volatilidade destas substâncias. A incorporação de aromas às embalagens melhora a qualidade sensorial do produto (VERMEIREN *et al.*, 1999). A liberação controlada dos aromas desejáveis dos materiais plásticos aumenta a percepção do sabor dos alimentos (BRODY *et al.*, 2001). Logo, os compostos voláteis aromáticos têm sido usados pelas indústrias de alimentos como ferramenta para melhorar o aroma e o sabor dos seus produtos, conquistar a preferência dos consumidores e melhorar a imagem da marca (MARKARIAN, 2006).

As embalagens aromáticas têm demonstrado possuírem excelentes propriedades para aplicações em produtos de panificação, biscoitos, vegetais frescos, cereais, produtos lácteos e bebidas (MARKARIAN, 2006).

As embalagens aromáticas constituem um tipo de embalagem ativa para alimentos, atrativas no que diz respeito, principalmente, à melhoria da aceitação sensorial dos produtos acondicionados (HUBER *et al.*, 2002). Elas são produzidas pela incorporação de aromas voláteis na matriz polimérica (HUBER *et al.*, 2002). A característica de volatilidade de uma embalagem aromática é fundamental para a sua aplicação.

Os óleos essenciais são tradicionalmente conhecidos por sua atividade antimicrobiana. O mecanismo de ação de compostos fenólicos, que entre os constituintes dos óleos essenciais apresentam a maior atividade antimicrobiana (BRUT, 2004), aparentemente está relacionado com a interação do grupo hidroxila, característico das suas moléculas com a membrana celular, provocando perdas de componentes celulares, a alteração de ácidos graxos e fosfolipídios, comprometimento da energia de metabolismo e na síntese de material genético (CEYLAN e FUNG, 2004; Di PASQUA *et al.*, 2006).

A nanotecnologia foi introduzida recentemente na indústria de embalagem para alimentos e possui potencial de fornecer soluções para os desafios do setor alimentício, como por exemplo, a curta vida útil de alguns alimentos (CHAUDHRY *et al.*, 2008). Desta forma, como o pão de forma possui vida útil curta, a produção de filmes antimicrobianos a base de um biopolímero (metilcelulose) incorporados com nanoemulsões de óleos essenciais e, uma possível aplicação no acondicionamento de pães de forma, poderia apresentar-se vantajosa para as pesquisas nestes setores.

O consumidor representa o destino final de todo e qualquer produto que se desenvolva. Todo empreendimento tem como objetivo final a aceitação e a satisfação de um consumidor. Este fato leva a crer que o esforço primordial de um empreendimento deve ser voltado ao estudo e à percepção dos fatores que determinam o comportamento do consumidor em relação a um produto (DELLA LUCIA, 2008). Recentemente, muitas metodologias alternativas vêm sendo desenvolvidas para coletar informações sobre a percepção dos consumidores em relação aos produtos alimentícios (ARES *et al.*, 2010). Assim, estudos com consumidores em que se obtenham informações pormenorizadas das percepções sensoriais em relação a um determinado produto e/ou conceito, como no emprego da metodologia de grupo de foco são informações relevantes e contribuições valiosas sobre um novo produto ou tendência podem ser obtidos.

Objetivou-se com o presente trabalho, avaliar a potencialidade da aplicação de filmes de metilcelulose incorporados com nanoemulsões de óleos essenciais de cravo e orégano para a conservação de pão de forma fatiado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Embalagens para Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 4x6, sendo, quatro tempos de estudo (0, 5, 10 e 15 dias) e seis tipos de embalagens controle negativo (C-), filme incorporado com as diferentes emulsões: emulsão do óleo essencial de cravo (EC), nanoemulsão do óleo essencial de cravo (NC), emulsão do óleo essencial de orégano (EO), nanoemulsão do óleo essencial de cravo (NO), e a embalagem controle positivo (C +). O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições.

2.1. Material

Para o preparo das nanoemulsões foram utilizados os óleos essenciais de cravo talo (*Eugenia caryophyllata*) e orégano (*Origanum vulgare*), os quais foram adquiridos da FERQUIMA[®] e o tensoativo hidrofílico Polissorbato 80, cuja denominação de venda é Tween 80 (Sigma[®]) e água desionizada.

Para o preparo dos filmes utilizou-se a metilcelulose (SIGMA[®]) e o plastificante polietileno glicol (ISO FAR[®]) com massa molecular igual a 6000.

Para avaliação antimicrobiana utilizou-se Placas Petrifilm[™] (3M Company, St. Paul, MN, EUA) para contagem de Leveduras e Bolores, e para contagem de coliformes totais e *E.coli*.

Para a produção dos pães de forma, foram utilizados farinha de trigo, gordura vegetal hidrogenada, açúcar, fermento biológico, sal e água.

2.2. Produção dos filmes ativos antimicrobianos

2.2.1. Preparo das nanoemulsões de óleos essenciais

Para o preparo das nanoemulsões do tipo óleo em água utilizou-se como fase aquosa, água desionizada. A fase oleosa foi constituída dos óleos essenciais de cravo ou orégano na concentração de 40 mg.mL⁻¹ e o tensoativo Tween 80 na concentração de 3%. A mistura foi homogeneizada com um bastão de vidro até completa homogeneização dos constituintes da emulsão e submetida ao homogeneizador ultrassônico (Modelo DES500, Unique Group), utilizando a macro-ponta do

equipamento, na frequência ultra-ssônica de 20 kHz e potência de 400 W, por 10 minutos.

Foram atribuídas a estas emulsões a denominação nanoemulsão de óleo essencial de cravo (NC) ou de orégano (NO), de acordo ao tipo de óleo essencial utilizado.

Emulsões similares foram produzidas, sem a utilização da etapa da homogeneização ultrassônica, constituindo assim, o procedimento para obtenção de emulsões tradicionais. Para melhor identificação dos tratamentos, estas formulações foram denominadas, emulsão de orégano (EO) e emulsão de cravo (EC), considerando-se que as gotículas de óleos essenciais presentes nas formulações não tiveram seus diâmetros reduzidos por não ter empregado a energia de cisalhamento do ultrassônico.

2.2.2. Determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais nas nanoemulsões

Os diâmetros das gotículas das nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano produzidas foram medidas por meio da técnica espectroscópica de espalhamento a laser, utilizando o analisador de tamanho de partículas em nanoescala (Nanophox, Sympatec). As amostras das nanoemulsões de óleos essenciais foram diluídas em água desionizada na proporção de 1:10 e vertidas na cubeta do equipamento com auxílio de uma pipeta. Esta diluição foi necessária, pois o aparelho realiza a leitura numa faixa específica de turbidez da amostra, de modo a evitar espalhamento excessivo da luz por aglomerados formados em amostras concentradas. As medidas de espalhamento de luz foram realizadas com um ângulo de 90° e a temperatura da amostra mantida a 25 °C.

2.2.3. Preparo dos filmes

Para a produção dos filmes incorporados com as emulsões tradicionais e com nanoemulsões de óleos essenciais, realizou-se o aquecimento das emulsões (100 mL), em forno micro-ondas até ebulição (100 °C). Adicionaram-se de 2% (m/v) de metilcelulose em relação ao volume de emulsão e 10% (m/v) de polietileno glicol em relação à resina polimérica (metilcelulose), como plastificante para conferir aos filmes flexibilidade e resistência ao rasgo (BORLIEU *et al.*, 2007). A solução foi homogeneizada em agitador magnético a 4 rpm durante 30 minutos e depois foi mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente (± 25 °C).

Após este período de resfriamento, a solução filmogênica foi novamente homogeneizada por 15 minutos em agitador mecânico a 4 rpm e espalhada sobre placas de vidro com bordas, de dimensões 20 x 32 cm, onde permaneceram, a 25 ± 2 °C e com corrente de ar forçada para acelerar o processo de polimerização, até a completa evaporação do solvente (Figura 1).

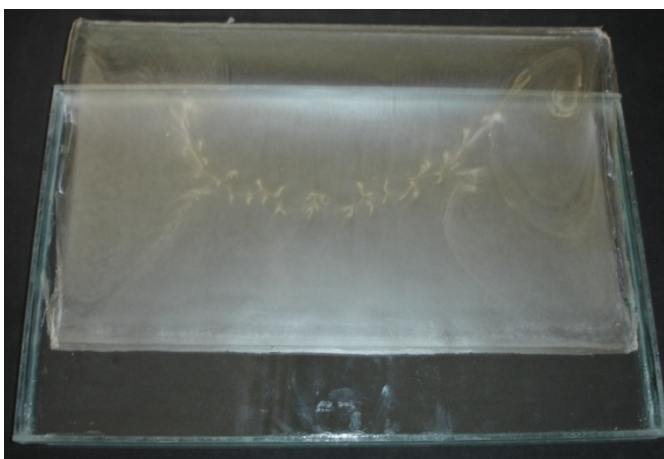


Figura 1. Filme obtido após polimerização e secagem.

Os filmes usados como controle foram produzidos da mesma maneira, porém sem a adição de óleo essencial.

A composição de cada um dos filmes produzidos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos filmes produzidos: EC - filmes incorporados com emulsões do óleo essencial de cravo; NC - filmes incorporados com nanoemulsões do óleo essencial de cravo; EO- filmes incorporados com emulsões do óleo essencial de orégano; NO- filmes incorporados com nanoemulsão de orégano e C- filme sem incorporação de óleo essencial (controle).

Filmes	Água (mL)	Twen 80 (mL)	Óleo essencial (mg.mL ⁻¹)	Metilcelulose (g)	Polietileno glicol (g)
EC*	100	3	40	2	0,2
NC*	100	3	40	2	0,2
EO*	100	3	40	2	0,2
NO*	100	3	40	2	0,2
C	100	3	-	2	0,2

2.3. Sistema de acondicionamento dos pães de forma nas embalagens ativas

2.3.1. Produção dos pães de forma

Pães de forma tradicionais foram produzidos de maneira uniforme em uma padaria da cidade de Viçosa-MG, sem adição de qualquer agente conservante (Figura 2).

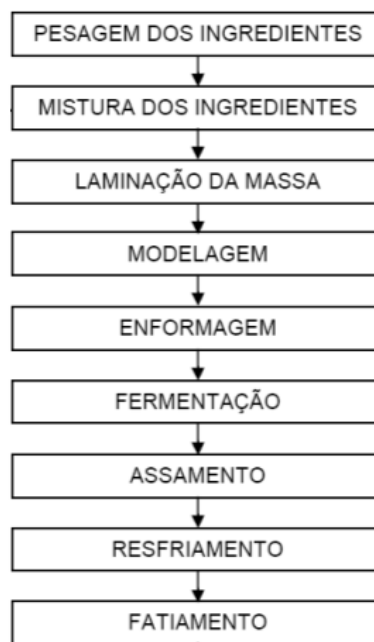


Figura 2. Fluxograma da produção dos pães de forma.

Inicialmente, foi efetuada a pesagem dos ingredientes. Após essa etapa, os ingredientes foram misturados em uma masseira por 10 minutos. A massa foi submetida a um descanso por aproximadamente 30 minutos e, após, a massa foi laminada em um cilindro, para melhorar o desenvolvimento do glúten. Logo a seguir, foi dividida e colocada em formas untadas com gordura vegetal e submetida à fermentação a 35 °C por, aproximadamente 1 hora. Após o término da fermentação, os pães foram assados a 200 °C, por, aproximadamente 20 minutos. Depois de assados, os pães de forma foram desenformados e resfriados, para serem, posteriormente, fatiados. Logo após a produção dos pães, estes foram encaminhados para o laboratório de embalagem, em seguida, foram embalados nos filmes ativos.

2.3.2. Acondicionamento dos pães nas embalagens antimicrobianas individuais

Duas fatias de pão de forma ($18,98 \pm 0,95$ g) foram acondicionadas nos filmes incorporados com as emulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano (NC, EC, NO e EO) fixados em folhas de polipropileno metalizado. Para a produção de embalagens individuais de pão de forma, devido a não selagem dos filmes de metilcelulose produzidos, tornou-se necessário a utilização de um filme suporte. Desta forma, optou-se pela utilização das folhas de polipropileno metalizadas em função de sua alta propriedade de barreira ao vapor de água (GARCIA *et al.*, 1989) e a gases (SINO, 1997).

Para a montagem da embalagem, dois filmes de cada tratamento, medindo 10 x 8 cm cada, foram fixados com o auxílio de fita dupla face nas folhas de polipropileno metalizado (40 µm). Assim, cada filme ficou em contato direto com uma fatia de pão de forma (Figura 3). Para a produção de pacotes individuais de pão de forma, as folhas contendo os filmes e os pães foram selados em seladora.

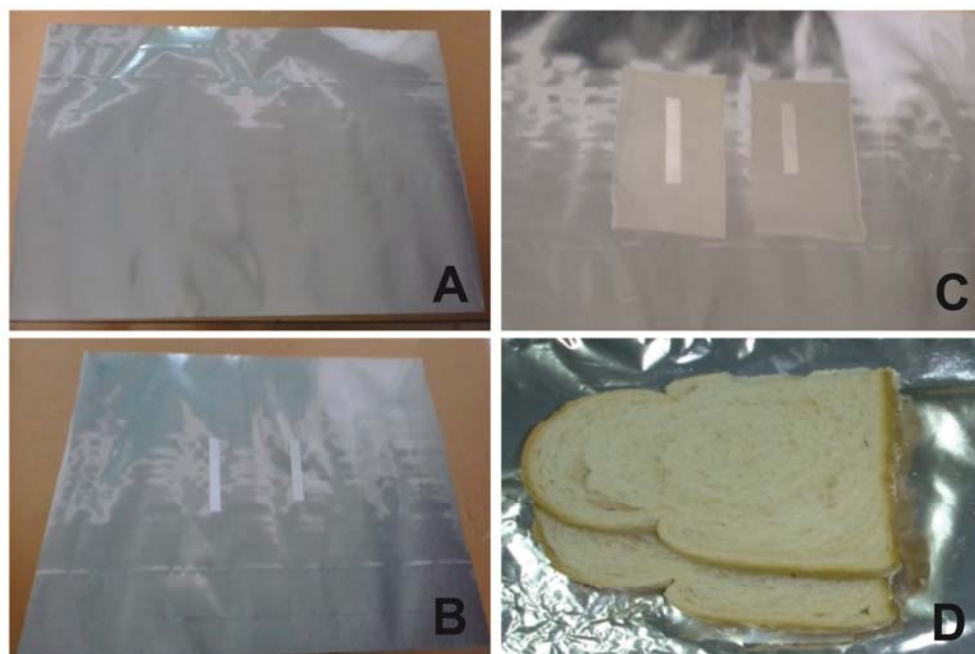


Figura 3. Sistema de acondicionamento dos pães de forma. A: Folha de polipropileno metalizada; B: fixação da fita dupla face; C: Fixação dos filmes incorporados com as emulsões; D: acondicionamento dos pães de forma.

O sistema de duas fatias de pão de forma por embalagem foi usado simulando uma possível aplicação prática em sanduíches tradicionalmente comercializados em embalagens contendo duas fatias.

Fatias de pão de forma em contato com filmes controle foram usadas como controle negativo (C-). Fatias de pão de forma contendo um conservante comercial foram embaladas diretamente em folhas de polipropileno metalizado, sendo considerado o tratamento como controle positivo (C+). O conservante utilizado na produção normal destes pães de forma foi um anti-mofo líquido (PRONAP), constituído de uma solução 6% (v/v) de ácido sórbico, propionato de cálcio e álcool etílico em álcool de cereais, este conservante foi aplicado através de aspersões sobre os pães recém-assados, antes mesmo de serem fatiados. O objetivo da utilização desse tratamento C+, foi realizar uma comparação com a maneira que o pão de forma é tradicionalmente comercializado,

considerada como eficiente até o prazo de 7 dias de validade.

Assim, as amostras dos pães de forma embaladas nos diferentes filmes foram armazenadas em BOD a 25 ± 3 °C e umidade relativa de $63 \pm 5\%$, simulando condições ambientais e usuais de distribuição e comercialização do produto em questão (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000), para avaliação da qualidade ao longo do armazenamento (0, 5, 10 e 15 dias).

2.4. Avaliação microbiológica dos pães de forma acondicionados nos diferentes filmes antimicrobianos

2.4.1. Preparo das amostras de pães de forma para análise microbiológica

As embalagens contendo os pães de forma, mantidas na BOD a 25 °C foram sanitizadas com algodão imerso em álcool 70 % e, em seguida, abertas assepticamente em cabine de fluxo laminar. Amostras aleatórias de 25 g de pão de forma de cada embalagem foram pesadas em balança analítica calibrada, previamente tarada, sendo transferidas para sacos de plástico estéreis onde foram adicionados 225 mL de água peptonada (0,1 %), também estéril. Em seguida, o saco com amostra e o diluente foi colocado no homogeneizador tipo “Stomacher” por 2 minutos.

Após a homogeneização das amostras, procederam-se as diluições decimais seriadas (10^{-2} a 10^{-4}) a partir da diluição 10^{-1} , em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada (0,1 %).

2.4.2. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*)

Placas Petrifilm™ EC foram inoculadas com alíquotas de 1,0 mL das diferentes diluições, preparada conforme Item 2.5.1, conforme as instruções do fabricante. Após incubação das placas a 35 °C por 24 e 48 horas, colônias azuis e vermelhas com bolhas foram consideradas colônias de *E. coli* e coliformes totais, respectivamente. O resultado foi obtido pela contagem das colônias e expressos em UFC. g⁻¹.

2.4.3. Contagem de leveduras e bolores

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes sobre leveduras e bolores, foi realizada por serem os micro-organismos que deterioram visualmente produtos de panificação.

Placas Petrifilm™ para contagem de leveduras e bolores foram inoculadas com alíquotas de 1,0 mL das diferentes diluições, preparadas conforme Item 2.5.1, seguindo as instruções do fabricante. Após incubação das placas a 25 °C por 3 a 5 dias, colônias azuis esverdeadas e grandes colônias com cores variadas foram consideradas colônias de leveduras e bolores, respectivamente. O resultado foi obtido pela contagem das colônias e expressos em UFC. g⁻¹.

2.5. Avaliação das propriedades físico-química dos pães de forma ao longo do armazenamento

2.5.1. Textura

A medida instrumental de textura dos pães de forma (força máxima aplicada para pressionar duas fatias de pão de forma) foi determinada pela Máquina Universal de Testes Mecânicos, série 3367 (Instron Corp.), operada com célula de carga de 1 kN. As regiões centrais dos corpos de prova sofreram compressão uniaxial de 40 % entre dois pratos planos e circulares de 35 mm de diâmetro a uma velocidade de 25 mm·min⁻¹ (AACC, 2000). Os resultados foram reportados como textura (N).

2.5.2. Umidade

O teor de umidade presente nas amostras de pães de forma foi determinado por gravimetria em estufa a 105 °C (Instituto Adolfo Lutz, 2004).

2.5.3. Acidez

A acidez das amostras de pães de forma foi determinada por titulação conforme normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2004).

2.5.4. Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras de pão de forma foi determinado, em aparelho medidor de pH (Digimed) (Instituto Adolfo Lutz, 2004).

2.5.5. Análise de cor

Amostras de pão de forma tiveram a coloração analisada em colorímetro (COLORQuest XE) com leitura direta das coordenadas L* (luminosidade), a* (relativa

de verde a vermelho) e b^* (relativa de amarela a azul). Para cálculo dos parâmetros de cor, foram estabelecidos o iluminante D65 (luz do dia 6.500K), o ângulo de 10° para o observador e a escala do sistema de cor “CIElab”, ajustado para reflectância.

2.6. Grupo de Foco

2.6.1. Recrutamento

Foram recrutados 24 voluntários para compor a equipe sensorial de Grupo de Foco, sendo todos os participantes residentes em Viçosa-MG e estudantes de cursos de pós-graduação e de graduação da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O recrutamento foi baseado na frequência de consumo de pão de forma (consumo de pelo menos uma vez no mês) e na disposição dos voluntários de participar das sessões de grupo de foco. Aos voluntários foi solicitado que preenchessem um questionário envolvendo perguntas sobre dados demográficos e comportamentais (em relação ao consumo de pão de forma).

2.6.2. Sessões de Grupo de Foco

Três sessões de grupo de foco com um total de 24 participantes foram conduzidas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. As sessões foram realizadas com todos os consumidores sentados em ambiente confortável.

Cada sessão foi composta por um grupo distinto e teve a duração de 60 minutos. O primeiro grupo formado por 8 participantes, constituído de estudantes do Departamento de Administração de Empresas (ADM) da UFV, o segundo formado por 9 participantes, constituído por estudantes do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da UFV e o terceiro grupo, constituído de 7 estudantes de cursos diversos da UFV. Desta forma, a avaliação sensorial com estes distintos grupos objetivou obter maiores informações sobre as percepções sensoriais em relação as amostras de pães de forma.

As sessões foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Della Lucia e Minim (2006). O moderador explicou o propósito do grupo de foco e esclareceu sobre a importância da opinião de todos os participantes nas sessões de grupo de foco.

Em seguida, as amostras de pães de formas armazenadas por 5 dias (tempo suficiente para ocorrer incorporação dos compostos voláteis dos filmes para as amostras de pães de forma) nas diferentes embalagens, foram apresentadas e servidas para degustação juntamente com um copo de água aos consumidores (Quadro1). Utilizou-se

os pães após 5 dias de acondicionamento, com o objetivo de obter-se uma difusão, dos compostos voláteis dos filmes para os pães.

Quadro 1. Amostras de pão de forma servidas nas sessões de grupo de foco nas diferentes embalagens.

Pães de forma embalados no filme controle
Pães de forma embalados no filme incorporado com emulsão do óleo essencial de cravo
Pães de forma embalados no filme incorporado com nanoemulsão do óleo essencial de cravo
Pães de forma embalados no filme incorporado com emulsão do óleo essencial de orégano
Pães de forma embalados no filme incorporado com nanoemulsão do óleo essencial de orégano

O moderador foi prosseguindo as sessões com um roteiro de perguntas (Quadro 2) sobre as amostras de pães de forma degustadas.

Quadro 2. Roteiro de perguntas utilizado nas sessões de grupo de foco sobre a avaliação sensorial das amostras de pão de forma.

O que você achou do aroma deste produto?
O que você achou do sabor deste produto?
O que você achou da textura deste produto?
Você compraria este produto?
Qual atributo sensorial deste produto que você acha que poderia ser melhorado?
Se este produto tivesse a informação livre de conservantes químicos você considera que ele seria mais aceito?
Você pagaria mais por um produto livre de conservantes químicos?
Qual a impressão global que você teve deste produto?

Após a discussão sobre a avaliação sensorial das amostras de pães de forma, realizou-se a discussão sobre a percepção e conhecimento dos consumidores em relação às embalagens ativas e sua utilização para o acondicionamento de alimentos, utilizando-se um roteiro de perguntas (Quadro 3).

Quadro 3. Roteiro de perguntas utilizado nas sessões de grupo de foco sobre a avaliação sensorial das amostras de pão de forma.

O que é uma embalagem ativa? Como você entende esta expressão?
O que considera de positivo e negativo da interação da embalagem com o alimento?
Você acha interessante/vantagem que o aditivo (conservantes, acidulantes, amaciantes etc...) dos alimentos estejam na embalagem e não no alimento?
Você tem receio da utilização de alimentos com aditivos químicos?
Você prefere aditivos naturais?
Você pagaria mais por um alimento embalado em uma embalagem ativa? Quanto?
Você considera mais seguro o conservante/ aditivo está na embalagem ou no alimento?

2.7. Análises estatísticas dos resultados

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por Análise de variância, e quando necessário utilizou-se o teste de média Tukey ao nível de 5% de probabilidade e/ou análise de Regressão também ao nível de 5% de probabilidade, exceto para a determinação do diâmetro das gotículas de óleos essenciais, a qual foi analisada pelo teste t de Student para comparação entre amostras independentes. Todos os resultados foram analisados através do programa estatístico SAS[®] versão 9.2 (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., EUA) licenciado para a Universidade Federal de Viçosa – UFV, Brasil.

Os dados das sessões de grupo de foco foram analisados qualitativamente. Todos os dados obtidos (por meio dos questionários, das gravações e anotações de respostas) foram lidos e estudados, considerando as palavras utilizadas pelos consumidores, o contexto da pergunta, e a especificidade das respostas, sem haver análise estatística, devido à característica qualitativa do estudo. Os resultados foram apresentados em valores percentuais, facilitando-se o seu entendimento.

3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação do diâmetro das gotículas das nanoemulsões óleo/água

O diâmetro das gotículas nas nanoemulsões óleo/água dos óleos essenciais de cravo e de orégano, não apresentaram diferença ($p > 0,05$) pelo teste t de Student. O tamanho médio das gotículas das nanoemulsões NC e NO foram $209,33 \pm 36,48$ nm. Os gráficos de distribuição de gotículas típicos obtidos para as nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano estão apresentados na Figura 4.

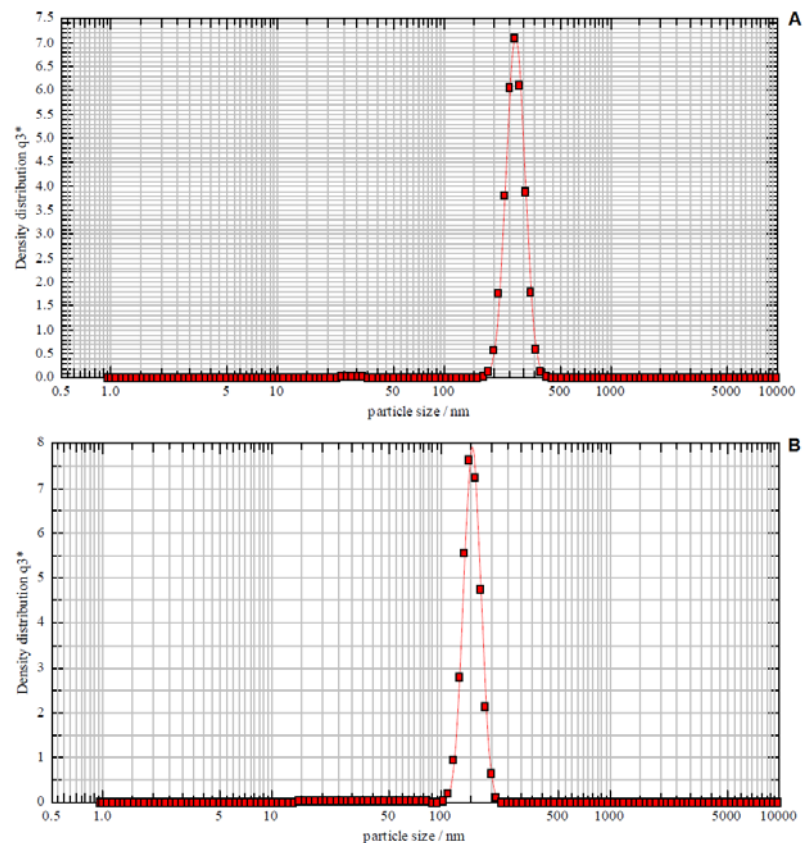


Figura 4. Distribuição dos diâmetros de gotículas dos óleos essenciais de cravo (A) e orégano (B) em nanoemulsões aquosas.

Os valores de tamanho de gotículas encontrados no estão bem próximos aos relatados na literatura para diferentes tipos de nanoemulsões. Rao e McClements (2012) relataram que obtiveram nanoemulsões com diâmetro médio das gotículas de óleo de limão em torno de 217 nm. Donsí *et al.* (2011), empregaram alta energia de emulsificação por meio de microfluidização e relataram tamanhos de gotas entre 74,4 a 356,7 nm em nanoemulsões de D-limoneno e/ou uma mistura de terpenos com várias formulações e processados durante 10 ciclos a 300 MPa.

Como esperado, as nanoemulsões tradicionais dos óleos essenciais de cravo e orégano, ou seja, aquelas que não passaram pela homogeneização ultrassônica, apresentaram perfil de distribuição de volume de gotículas multimodal e muito heterogêneo, o que foi atribuído ao fato de tais amostras não terem sido homogeneizadas nessa etapa. Isso significa que tais nanoemulsões apresentaram gotículas grandes (maiores que 1000 nm), médias (500-999 nm) e também nanométricas (menores que 499 nm), mas sem padrão de repetibilidade. É importante ressaltar que essa técnica de determinação do diâmetro de gotículas não confere confiabilidade dos dados no caso de amostras muito polidispersas, o que aconteceu com as nanoemulsões tradicionais dos óleos essenciais de cravo e orégano em água.

A encapsulação de óleos essenciais em nanoescala representa uma abordagem viável e eficaz para aumentar a estabilidade física dos compostos bioativos, protegendo-os das interações com os ingredientes e, por causa do subcelular tamanho, aumentando a sua bioatividade através da ativação de mecanismos passivos de absorção celular (WEISS *et al.*, 2009). Notou-se, que as investigações a cerca da redução dos diâmetros dos materiais, estão centrados especialmente na busca de novas funções para estes materiais, ou melhorias das suas funções tradicionais.

3.2. Avaliação microbiológica dos pães

3.2.1. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*)

Todas as amostras de pães analisados oriundas das diferentes embalagens e, nos diferentes tempos de armazenamento atenderam à legislação quanto ao número de coliformes totais e *E.coli*. Segundo a legislação vigente RDC 12 (BRASIL, 2001), para coliformes a 45 °C o limite é de 10^2 UFC. g⁻¹.

Verificou-se contagens de coliformes totais e de *E .coli* inferiores a 10^{-1} para esses micro-organismos. Isso mostra que os pães foram elaborados e manuseados de maneira correta e que não houve contaminação durante o processamento por parte dos manipuladores por tais micro-organismos.

3.2.2. Contagem de leveduras e bolores

O logaritmo decimal do número de unidades formadoras de colônias de leveduras e bolores, por grama de pão de forma, em função do tempo, está ilustrado na Figura 5. Observou-se que de uma maneira geral, ocorreu aumento do crescimento de leveduras e bolores nas amostras de pães de forma ao longo do tempo de

armazenamento, em todos os sistemas de embalagens avaliados. No entanto, notaram-se menores quantidades de unidades formadoras de colônias para as amostras de pães de forma que foram armazenadas nos filmes NC seguido NO ao longo dos tempos de armazenamentos.

As amostras de pães de forma que foram armazenadas na embalagem C- apresentaram maiores contagens de fungos seguida da embalagem C+.

Os filmes NC, que conferiram as melhores ações antifúngicas, proporcionaram reduções nas contagens de leveduras e bolores de 0,60, 1,35 e 2,88 ciclos logarítmicos nos tempos 5, 10 e 15, respectivamente, quando comparados ao controle negativo, de pior eficiência. Contrastados com o controle positivo, tido como eficiente na conservação de pães de forma, os filmes NC levaram a reduções de 0,39, 1,17 e 1,31 ciclos logarítmicos nos mesmos tempos.

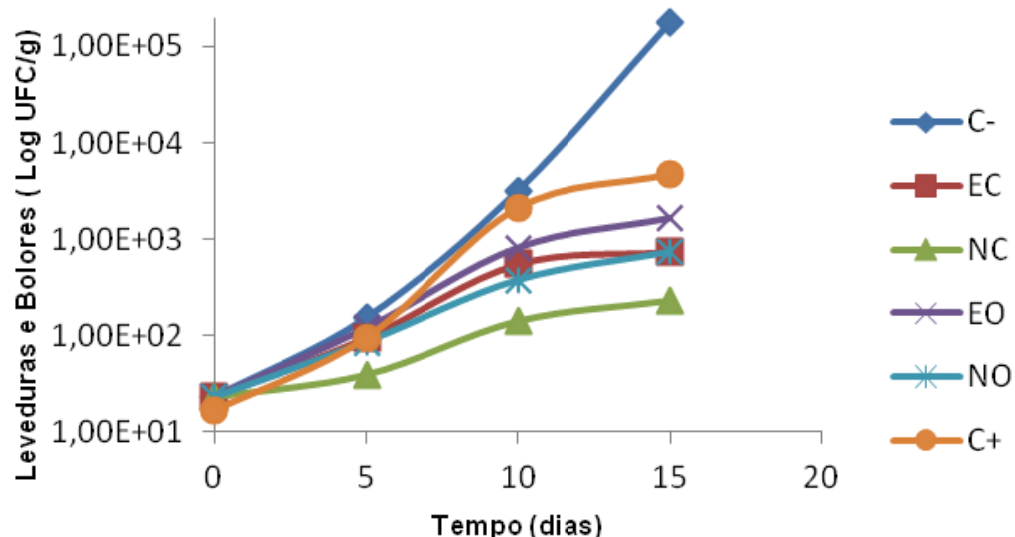


Figura 5. Crescimento de leveduras e bolores ao longo do armazenamento de pães de forma embalados nos diferentes filmes ativos durante 15 dias de armazenamento a 25 °C.

Com o aumento do tempo de armazenamento, as contagens de leveduras e bolores também aumentaram em todos os tratamentos. No entanto, determinadas embalagens foram mais eficientes que outras na prevenção do desenvolvimento fúngico.

Após 5 dias de armazenamento, verificou-se efeito antimicrobiano maior nas amostras de pães de forma que foram embaladas com o filme NC quando comparado ao tratamento C-, enquanto que para as demais embalagens antimicrobianas, o efeito na inibição do desenvolvimento de leveduras e bolores aparentaram similar da embalagem

C-. No entanto, o efeito antimicrobiano da embalagem NC foi semelhantes às demais embalagens. Estes resultados podem ser visualizados também na Figura 6.

Após 10 dias de armazenamento, observou-se que os tratamentos controles apresentaram um efeito antimicrobiano menor que as demais embalagens. Os pães de forma em que não foram incorporados nenhum tipo de conservante, como esperado, apresentou um maior crescimento fúngico. Em relação, as amostras de pães de formas adicionadas de um conservante comercial, o efeito antimicrobiano obtido foi menor do que aquele obtido pelos filmes antimicrobianos. Neste período de armazenamento, tornou-se visível o aparecimento de colônias de bolores e leveduras nas amostras de pães de formas embalados nas embalagens C- e C+. Demonstrando que o efeito antimicrobiano do conservante comercial utilizado na produção dos pães de forma já não se apresentava tão eficiente quando comparado ao efeito obtido através da utilização das embalagens antimicrobianas.

Quanto aos filmes antimicrobianos, os filmes NC, NO e EC foram os que apresentaram melhores propriedades antimicrobianas. Demonstrando assim, que possivelmente com a redução das gotículas de óleo essencial de orégano nas emulsões, este apresentou propriedades antimicrobianas similares as obtidas pelas emulsões produzidas com o óleo essencial de cravo. Desta forma, a incorporação de nanoemulsões de os óleos essenciais de cravo e de orégano em matriz polimérica (metilcelulose), e utilização no armazenamento de pães de forma pode estender a vida de prateleira destes produtos quando comparado a utilização de um conservante tradicional.

Após 15 dias de armazenamento, observou-se que os tratamentos controles continuaram apresentaram desenvolvimento fúngico maior, quando comparado aos demais tratamentos. Sendo apresentadas contagens de leveduras e bolores maiores para as amostras C- seguida da C+ quando comparados aos filmes incorporados das nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano. Foi observado efeito antimicrobiano semelhante para os pães de forma em contato com os filmes incorporados com as diferentes emulsões, independente da redução ou não das gotículas e do tipo de óleo empregado.

As nanoemulsões produzidas com os óleos essenciais de cravo e de orégano, no 10° e 15° dias de armazenamento, apresentaram contagens menores do que as amostras que continham um conservante comercial (C+) e sem adição de conservantes (C-).

Notou-se o aparecimento de pequenas colônias de fungos nas superfícies dos produtos (Figura 6), sendo menos perceptível nas amostras em que foram armazenadas

nos filmes incorporados com NC seguida de NO, demonstrando assim, redução do crescimento fúngico durante o período de armazenamento. Estes resultados demonstraram tendência deste sistema de embalagem apresentar menores contagens de leveduras e bolores e, assim, melhorar a conservação dos pães de forma.

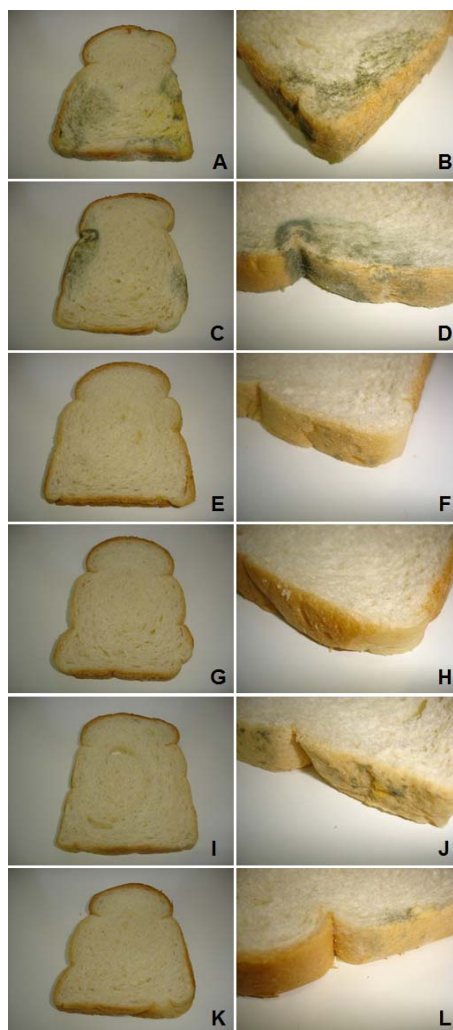


Figura 6. Pães de forma sem adição de conservantes (A e B); utilizando-se conservante tradicional (C e D); utilizando-se filmes incorporados com EC (E e F); com filmes incorporados com NC (G e H); utilizando-se filmes incorporados com EO (I e J); com filmes incorporados com NO (K e L); após 15 dias de armazenamento a 25 °C.

A legislação em vigor (BRASIL, 2001) não estabelece padrão para contagem de leveduras e bolores, entretanto, na legislação anterior a Portaria 451 (BRASIL, 1997), o limite de tolerância de leveduras e bolores para pães era de 5×10^3 UFC.g⁻¹. As amostras de pães da embalagem C- e C+ no 10º dia de armazenamento apresentava contagem de UFC.g⁻¹ de bolores e leveduras próximas a este limite, enquanto que nas embalagens onde houve a incorporação das emulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano apresentavam contagens menores de UFC.g⁻¹.

No 15º dia de armazenamento, todas as amostras de pães apresentavam visualmente colônias de desenvolvimento fúngico, sendo assim, não se encontravam mais aptas para o consumo, independente de contagem de células.

Portanto, a vida de prateleira recomendada para os pães de forma embalados nos filmes incorporados com as emulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano, com base nos resultados microbiológicos, foi de 10 dias. Enquanto que, as amostras de pães de forma em que foi utilizado um conservante comercial e sem conservante, apresentaram-se impróprio para o consumo (aparecimento visível de leveduras e bolores) neste período de acondicionamento.

A contaminação por fungos está relacionada, principalmente, a problemas de conservação e armazenamento do produto. A contaminação por leveduras e bolores não representa tanto risco para a saúde humana, principalmente, porque o consumidor dificilmente ingerirá um produto contaminado por este tipo de fungo, já que ela é perceptível a olho nu, além de deixar cheiro e sabor característicos no alimento (INMETRO, 2006).

No trabalho de Bertan (2008) foram produzidos filmes compostos à base de polímeros de fontes renováveis (gelatina, glúten e amido) incorporados com sorbato de potássio (2 e 4% p/v) para o acondicionamento de pães de forma, verificou-se que no sétimo dia de armazenamento, a contagem obtida de leveduras e bolores nos pães de forma de todos os tratamentos foi superior ao limite de tolerância permitido pela legislação. Além disso, ao atingir o nono dia, observou-se o aparecimento visível de fungos em todos os tratamentos.

Soares *et al.* (2002) desenvolveram filmes de acetato de celulose contendo propionato de sódio em diversas concentrações (0, 2 e 4%) para embalar pães de forma. Os autores observaram que os filmes ativos desenvolvidos causaram efeito inibitório no crescimento microbiano, sendo mais evidente na máxima concentração, pois após 14 dias de armazenamento, a fatia de pão em contato com o filme contendo 4% de propionato de sódio mostrou 70% menos perda por deterioração do produto quando comparada com as fatias em contato com filme sem propionato de sódio.

De acordo com Legan e Voysey (1991) em um estudo realizado em produtos de panificação e seus ingredientes, 60% dos microorganismos de deterioração foram atribuídas aos fungos *Penicillium* e *Aspergillus niger*, enquanto que as leveduras foram responsáveis por apenas 15%. Além de afetar a aceitação dos produtos devido ao seu crescimento visível, os fungos são responsáveis também, pelo desenvolvimento de aromas, produção de micotoxinas, bem como de compostos alergênicos.

Em contraste com os resultados obtidos, alguns autores obtiveram efeito antimicrobiano melhorado com a utilização da nanotecnologia. Possivelmente, o sistema utilizado para o carregamento de materiais em escala nanométrica influencia na melhoria das suas propriedades e obtenção de novas funcionalidades dos materiais. Por exemplo, os sistemas de distribuição baseados em lipossomas resultaram na melhoria da atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano (*Origanum dictamnus L.*) (LIOLIOS *et al.*, 2009). Além disso, sistemas baseados em micelas resultaram em uma maior atividade antimicrobiana do eugenol e carvacrol (GAYSINSKY *et al.*, 2005a, b).

O uso de sistemas de distribuição em escala nanométrica pode potencialmente, aumentar os mecanismos de absorção celulares, reduzindo, assim, resistências à transferência de massa e aumentar a atividade antimicrobiana (DONSÍ *et al.*, 2012).

3.4. Avaliação da qualidade dos pães ao longo do armazenamento

3.4.1. Textura

Na avaliação da textura instrumental dos pães de forma, verificou-se que não houve interação ($p > 0,05$) entre os fatores tipo de embalagens de pão de forma e tempo de armazenamento. Assim, estudou-se o efeito de cada fator isoladamente.

Para o parâmetro de textura dos pães de forma embalados nos diferentes filmes, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. O valor médio de textura encontrado foi de $8,83 \pm 4,73$ N.

Com relação ao tempo de armazenamento dos pães de forma houve diferença ($p \leq 0,05$) para o parâmetro de textura. Observa-se, através da análise de regressão, que de uma maneira geral, ocorreu um aumento da textura (dureza) dos pães de forma ao longo do tempo de armazenamento (Figura 7).

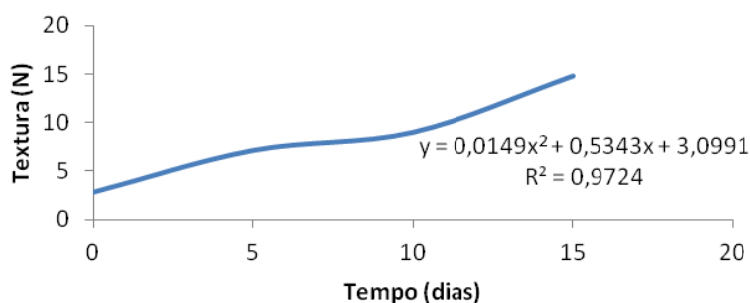


Figura 7. Variação da textura (N) das amostras de pães de forma ao longo de 15 dias de armazenamento a 25 °C.

A dureza de produtos de panificação aumenta durante o armazenamento. A secagem e o endurecimento de pães conferem características de pães estragados, não no sentido de que sejam perigosos à saúde do consumidor, mas sim porque sofreram uma séria perda em aceitabilidade (BOURNE, 2002).

Como é sabido, quanto maior o teor de umidade de produtos de panificação, menor será a dureza dos mesmos (BOURNE, 2002). De maneira geral, durante o armazenamento dos pães de forma, ocorreu perda de umidade nas amostras, e assim, foi perceptível o aumento na dureza das amostras.

Da mesma forma, Chiavaro *et al.* (2008) relataram aumento na dureza diminuição paralela na coesão e elasticidade para o pão de trigo durante 8 dias de armazenamento a 25 ° C.

He e Hosney (1990) relataram que, independentemente dos tratamentos de embalagens, a firmeza de todas as amostras de pães aumentaram rapidamente durante os primeiros 15 dias de armazenamento, ocorrendo diminuição da taxa de aumento com o tempo.

Segundo BERTAN (2008) o aumento na força de compressão dos pães, durante o armazenamento, ocorre devido ao processo de retrogradação do amido, que faz com que as moléculas de amido comecem a perder para o meio ambiente a água que havia absorvido durante a formação da massa. Bobbio e Bobbio (2001) também atribuíram o aumento de firmeza de pães durante o armazenamento, quase que exclusivamente, à retrogradação do amido.

Latou *et al.* (2010) obtiveram resultados semelhantes para as amostras de pães fatiados, os valores iniciais de dureza relatados pelos autores foi de 4,8 N e 12,5 N para as amostras controle e contendo um conservante comercial, respectivamente.

3.4.2. Umidade

Através dos resultados da avaliação da umidade ao longo do tempo de armazenamento dos pães de forma, verificou-se que não houve interação ($p > 0,05$) entre os fatores tipo de embalagens e tempo de armazenamento. Assim, estudou-se o efeito de cada fator isoladamente.

Para os diferentes tipos de embalagens aplicadas nos pães de forma, não foi verificada diferença ($p > 0,05$) para o parâmetro de umidade. O valor médio de umidade encontrado foi de $29,64 \pm 2,12$ %.

Observou-se diferença ($P \leq 0,05$) para o parâmetro de umidade em função do tempo. No entanto, não houve ajuste satisfatório para nenhum modelo de regressão (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios de umidade(%) em amostras de pães de forma ao longo do armazenamento.

Umidade (%)	Tempo (dias)
31,58 ± 0,01	0
28,85 ± 0,02	5
29,81 ± 0,00	10
28,32 ± 0,02	15

Observou-se que o teor de umidade dos pães de forma apresentaram pequenas variações em função do tempo de armazenamento. Percebeu-se tendência do teor de umidade diminuir com o tempo de armazenamento, já que o valor de umidade após 15 dias de armazenamento foram menores que nos tempos anteriores. Possivelmente, os pães de forma foram perdendo a umidade com o tempo, o que os tornou mais duros. Estes resultados podem ser correlacionados com os resultados obtidos para análise de textura, relatados anteriormente, onde foi notável o aumento da dureza dos pães de forma com o armazenamento.

Esteller e Lannes (2005) encontraram umidade média de 30% em pães de forma tradicionais.

No trabalho de Bertan (2008), o conteúdo de umidade das fatias de pão de forma durante o armazenamento em filmes compostos à base de polímeros de fontes renováveis (gelatina, glúten e amido) incorporados com sorbato de potássio (2 e 4% p/v) variaram de 28,74 a 33,60%.

3.4.3. Acidez

A acidez ao longo do tempo de armazenamento dos pães de forma, não apresentou interação ($p > 0,05$) entre os fatores tipo de embalagens e tempo de armazenamento. Assim, estudou-se o efeito de cada fator isoladamente.

Para as embalagens aplicadas nos pães de forma, não houve diferença ($p > 0,05$) em relação ao parâmetro de acidez. O valor médio de acidez foi de $0,20 \pm 0,02$ (% de ácido acético). Assim, verificou-se que a utilização dos filmes incorporados com as emulsões O/A tradicionais e com nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano não afetou a acidez das amostras de pães de forma.

Com relação ao tempo de armazenamento dos pães de forma nas embalagens, obteve-se diferença ($p \leq 0,05$) para o parâmetro de acidez.

Através da análise de regressão é possível visualizar variações do parâmetro de acidez ao longo do tempo de armazenamento (Figura 8). Observa-se que até o 5º dia de armazenamento, ocorreu aumento da acidez dos pães de forma, a partir deste período observou-se um decréscimo.

Os valores de acidez encontrados no presente trabalho estão próximos ao recomendado por Quaglia (1991), que considera ótima a acidez de 0,28%, expressa em ácido acético para pães de forma. Mesmo com o armazenamento por 15 dias as amostras de pães de forma apresentaram valores de acidez (% ác. Acético) próximo ao recomendado.

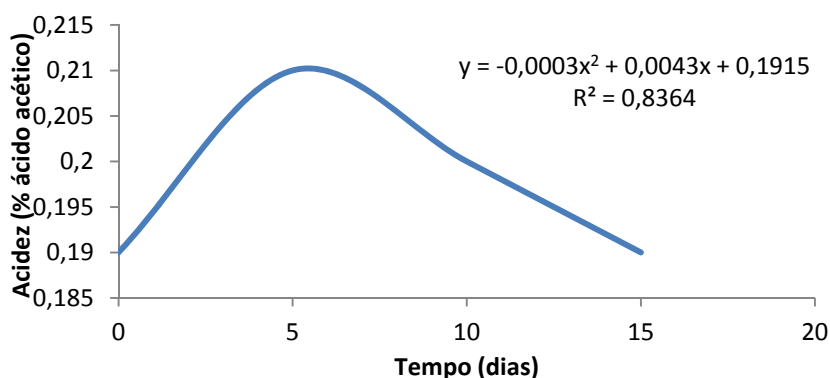


Figura 8. Variação da acidez (% ácido acético) das amostras de pães de forma durante o armazenamento a 25°C por 15 dias.

3.4.4. Potencial Hidrogeniônico (pH)

A avaliação do potencial hidrogeniônico ao longo do tempo de armazenamento dos pães de forma, não apresentou interação ($p > 0,05$) entre os fatores tipo de embalagens e tempo de armazenamento. Assim, estudou-se o efeito de cada fator isoladamente.

Os diferentes tipos de embalagens aplicadas nos pães de forma, não apresentaram diferença ($p > 0,05$) para o parâmetro de pH. O valor médio do pH foi de $5,29 \pm 0,14$. Assim, verificou-se, que a utilização dos filmes incorporados com as emulsões O/A tradicionais e com nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano não afetaram o pH das amostras de pães de forma.

Com relação ao tempo de armazenamento dos pães de forma nas embalagens, obteve-se diferença ($p \leq 0,05$) para o parâmetro de pH.

Através da análise de regressão foi possível visualizar variações do parâmetro de potencial hidrogeniônico ao longo do tempo de armazenamento (Figura 9). Observou-se que os valores de pH encontrados para as diferentes amostras de pães de forma estão em torno de 5, sendo assim, as variações obtidas foram pequenas e, possivelmente não interferiram na qualidade dos pães de forma.

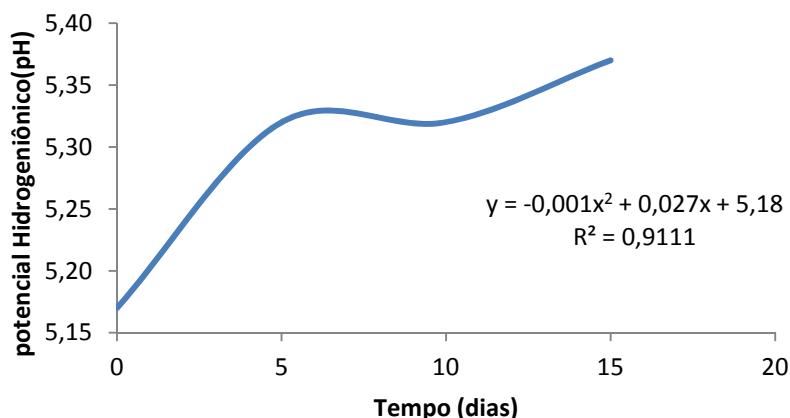


Figura 9. Variação do pH das amostras de pães de forma durante o armazenamento a 25°C por 15 dias..

Percebeu-se também, que no geral, ocorreu aumento do pH com o armazenamento. Este resultado pode ser correlacionado com o resultado obtido para o teor de acidez, onde foi notável diminuição da acidez com o tempo.

Quaglia (1991) considera ótimo o pH 5,20, para o pão de forma. Quílez *et al* (2006) relataram valores de pH variando 5,6 a 6,3 para amostras de pão tipo baguete comprado no mercado espanhol.

Rosenkvist e Hansen (1995) relataram valores de pH 5,7, 5,6 e 5,8 para o pão branco, integral e produzido em laboratório, respectivamente.

Os valores de pH encontrados no presente trabalho estão próximos aos relatados na literatura para os diferentes tipos de pães. No entanto, no trabalho de Latou *et al.*(2010), o pH inicial (dia 0) foi de 6,4 e 6,3 para amostras de pães de trigo sem conservantes e contendo conservantes comerciais, respectivamente. Segundo os autores, as diferenças no pH gerados em diferentes estudos podem ser relacionados com a utilização de diferentes ingredientes na sua produção e aos processos de assamento diferenciados.

3.4.5. Análise de cor

Não houve interação ($p > 0,05$) para os parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) ao longo do tempo de armazenamento dos pães de forma, entre os fatores tipo de embalagem e tempo de armazenamento. Assim, estudou-se o efeito de cada fator isoladamente.

Os diferentes tipos de embalagens aplicadas nos pães de forma, não apresentaram diferença ($p > 0,05$) com relação aos parâmetros de cor. Os valores médios para L^* foi de $57,04 \pm 2,87$, para a^* de $-0,28 \pm 0,18$ e b^* de $7,34 \pm 1,85$. Assim, verificou-se que a utilização dos filmes incorporados com as emulsões O/A tradicionais e com nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e de orégano não afetaram a coloração das amostras de pães de forma.

Com relação ao tempo de armazenamento dos pães de forma nas diferentes embalagens, obteve-se diferença ($p \leq 0,05$) para o parâmetro de cor b^* . Para os demais parâmetros de cor não houve variação com o tempo.

Os valores de L^* variam do claro ao escuro, sendo o valor 100 correspondente à cor branca e o valor 0 (zero) à cor preta. O índice a^* , quando positivo indica presença de cor vermelha e, quando negativa cor verde. O índice b^* é responsável pela cor amarela (valores positivos) e cor azul (valores negativos).

De acordo os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , obtidos no presente trabalho, a coloração apresentada pelas amostras de pães de forma foi amarela clara.

Para a variação do parâmetro b^* em função do tempo, observou-se aumento da coloração amarela clara, a qual foi também observada visualmente com o tempo de armazenamento. Possivelmente, devido à absorção dos compostos voláteis difundidos dos filmes para as amostras de pães de forma. Através do valor de R^2 obtido na regressão, observa-se que o modelo linear apresentou bom ajuste para representar a variação de b^* com o tempo (Figura 10).

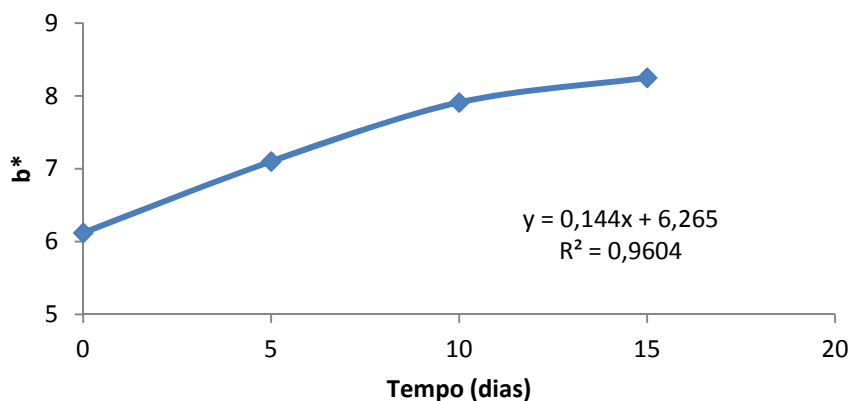


Figura 10. Variação do parâmetro de cor b^* das amostras de pão de forma durante o armazenamento a 25°C por 15 dias.

Segundo Esteller e Lannes (2005) algumas variações nos valores de a^* e b^* para diferentes grupos de produtos de panificação podem estar, também, relacionadas com o grau de aeração (porosidade da massa) e mudanças na luz que incide na superfície do material.

3.5. Avaliação Sensorial

3.5.1. Grupo de foco

Quanto aos dados demográficos referentes aos 24 participantes das sessões de grupo de foco, 62,5% dos participantes são do sexo feminino e 37,5% foram do sexo masculino; a faixa etária predominante foi de 18 a 28 anos (91,6%); dentre os participantes, 41,6% estavam cursando pós-graduação na Universidade Federal de Viçosa (UFV), e os demais estavam cursando graduação da referida instituição. Em relação a renda familiar, 58,3% disseram ter renda familiar mensal acima de cinco salários mínimos.

De acordo ao questionário respondido pelos participantes das sessões, quanto ao consumo de pão de forma, todos os participantes afirmaram que gostam de pão de forma, variando o gosto desde ligeiramente a muito, sendo que, 50% dos participantes consumiam pão de forma de 2 a 3 vezes por semana, e 62,5% dos consumidores, consumiam o pão de forma com sanduíches.

Pão e cereais constituem dos alimentos mais consumidos no mundo, sob diferentes formas, dependendo dos hábitos culturais (CAYOT, 2007; POZO-BAYÓN *et al.*, 2006).

Em relação às amostras dos pães de forma controle, sem adição de conservantes, e sem a utilização de embalagens antimicrobianas, 41,6% dos participantes relataram terem gostado moderadamente desta amostra e, descreveram que o sabor, aroma e textura eram semelhantes aos pães de forma tradicional. Além disso, os provadores relataram que esta era a “melhor amostra” dentre as apresentadas nas sessões de grupo de foco e, que o sabor destas amostras era “bom”, “normal” e, apresentavam um “aroma bem suave”. Estas informações demonstram que, os consumidores conseguiram diferenciar e identificar as amostras que estavam sendo apresentadas e consumidas.

Em relação às amostras de pão de forma embalada nos filmes incorporados com as nanoemulsões de óleo essencial de orégano, 33,33% dos participantes relataram terem desgostado muito do sabor e aroma das amostras, e os demais participantes relataram terem desgostado de alguma forma destas amostras, devido principalmente ao

“sabor muito picante”, “ardido”, “ácido”, e ao “cheiro forte de pizza”. Quanto ao atributo textura, 62% dos participantes acharam a textura destas amostras similares ao pão tradicional fresco, e os demais participantes, acharam a textura dura.

Em relação às amostras de pão de forma embaladas nos filmes incorporados com as nanoemulsões produzidas com o óleo essencial de cravo, 33,33% dos participantes relataram terem desgostado extremamente do aroma e sabor destas amostras, e os demais provadores, relataram terem desgostado de alguma forma destas amostras, devido principalmente ao “sabor muito ardido”, ter “anestesiado a língua”, “sabor ácido”, “gosto ruim”, e ao “gosto forte”. Quanto ao atributo textura, a maioria dos participantes (70 %) descreveram a textura como similar ao pão tradicional fresco e, os demais provadores, descreveram a textura como um pouco mais seca.

Possivelmente, a utilização das embalagens incorporadas das emulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano pode ter modificado muito intensamente as características sensoriais dos pães a ponto de ter mascarado a textura dos mesmos, ou o tempo de armazenamento de apenas 5 dias não tenha sido suficiente para desencadear em alterações neste atributo sensorial, apesar de ter afetado negativamente o sabor e aroma das amostras de pães de forma, não prejudicaram a textura.

O fato do pão de forma ter ficado em contato direto com o filme incorporado com as nanoemulsões dos óleos essenciais pode ter ocorrido uma intensa migração dos compostos voláteis dos óleos essenciais de cravo e orégano para os pães, conferindo a estes um sabor e aroma muito forte, o que possivelmente interferiu na aceitação destes produtos, já que o atributo sensorial sabor é um dos principais fatores que influenciam as preferências dos consumidores (POZO-BAYÓN *et al.*, 2006).

Quanto à intenção de compra, 75% dos consumidores não comprariam os pães embalados nos filmes incorporados com as nanoemulsões produzidas com os óleos essenciais, e os demais consumidores relataram que comprariam desde que houvesse algum “apelo diferencial”, como por exemplo, estes produtos fossem mais saudáveis. Se estes produtos tivessem a informação livre de conservantes químicos, 50 % dos consumidores relataram que estes seriam mais aceitos.

No que diz respeito ao custo por um produto sem conservantes químicos, 90 % dos participantes relataram que pagariam a mais por um produto livre destes conservantes, por considerarem que estes seriam mais saudáveis, desde que houvesse atributos sensoriais similares aos produtos tradicionalmente comercializados com a adição dos conservantes tradicionais.

Todos os consumidores que participaram das sessões de grupo de foco relataram que o aroma e o sabor, eram os principais atributos que deveriam ser melhorados em todas as amostras de pão de forma embaladas nos filmes incorporados com as diferentes nanoemulsões dos óleos essenciais, e que as impressões globais das amostras embaladas nos filmes antimicrobianos apresentaram-se ruim. Além disso, 20% dos consumidores relataram que a textura também deveria ser melhorada. O fato dos pães de forma terem ficado armazenados nos filmes antimicrobianos por 5 dias antes das sessões de grupo de foco, com o objetivo de absorver os compostos voláteis liberados pela embalagem, afetou negativamente as características sensoriais dos pães de forma.

A textura pode ser definida como um conjunto de características físicas que provém dos elementos estruturais dos alimentos. Estas características, ou parâmetros de textura, são quantificadas por meio das análises de textura, que podem ser sensoriais ou instrumentais. No caso do pão de forma, a textura apresenta-se como importante indicador de frescor e qualidade para o consumidor, sendo fator imprescindível para a aceitabilidade do produto no mercado (LASSOUED *et al.*, 2008).

LATOU *et al.*, (2010), estudaram o efeito das embalagens ativas (sachê emissor de etanol) ou (sachê emissor de etanol combinado com um absorvedor de oxigênio) sobre a extensão da vida de prateleira de pão de trigo fatiado armazenados a 20 °C, os autores relataram que nos tempos em que ocorreram as rejeições sensoriais nas amostras de pães fatiados embalados nos diferentes sistemas de embalagens ativas, a dureza das amostras haviam aumentado para 6,0;17,1; 10,1 e 15,7 N, no quarto dia para as amostras controles, no sexto dia para as amostras contendo um conservante comercial, no 24° dia para as amostras contendo o emissor de etileno; e no 30° dia para as amostras que foram armazenadas nas embalagens contendo um emissor de etileno e absorvedor de oxigênio, respectivamente. Estes resultados relatados pelos autores demonstram que a textura das amostras é um atributo fundamental para aceitação de um produto alimentício, e que à medida que as amostras de pães fatiados foram se tornando mais duras, ocorreu também a rejeição sensorial.

Em relação ao estudo do impacto da embalagem ativa na aceitação dos produtos alimentícios, dois dos três grupos arguidos sobre a definição de “embalagens ativas” não entendiam a definição desta expressão. Somente os consumidores do grupo constituído por estudantes do Departamento de Tecnologia de Alimentos sabiam o conceito deste tipo de embalagem, e já tinham tido contato com esta expressão, principalmente através do conteúdo ministrado em disciplinas da Universidade Federal de Viçosa e, através da leitura de artigos científicos. Para facilitar as discussões

posteriores, o moderador explicou o conceito de uma embalagem ativa em todas as sessões de grupo de foco.

Quando os consumidores foram arguidos sobre os pontos positivos e negativos da interação da embalagem com o alimento, todos os participantes (constituídos pelos três grupos de consumidores) descreveram como pontos positivos da interação da embalagem com o produto: “evitar a utilização de conservantes químicos”; “consumir menor quantidade de conservantes”; “melhorar a conservação do produto”. Foi relatado como ponto negativo desta interação pela maioria dos participantes (91,6%) a possível interferência dos atributos sensoriais pelos compostos da embalagem e, um possível valor mais alto cobrado pelo sistema de embalagens ativas.

Quando os consumidores foram questionados se consideravam interessante/vantagem que o aditivo (conservantes, acidulantes, aromatizantes, etc...) dos alimentos estivessem na embalagem e não no alimento, dois grupos do estudo não sabiam falar sobre o assunto, representando assim, 62,5% dos participantes, principalmente por até o momento desconhecer o termo “embalagem ativa”, os demais participantes (grupo constituído pelos estudantes do DTA) acharam interessante que o aditivo estivesse na embalagem ao invés do alimento, como no sistema de embalagens ativas.

A respeito do consumo de aditivos químicos, 62,5% dos participantes do grupo formado por estudantes do Departamento de Administração, relataram que “evitam o consumo de produtos que contenham conservantes químicos”. O grupo formado pelos integrantes de uma mesma religião, somente 30% dos participantes relataram que “tinham receio do consumo de aditivos químicos”. Enquanto que, o grupo formado pelos estudantes do DTA somente 22,2% dos participantes relataram que “tinham receio do consumo destes produtos, principalmente, pelo fato de que nem todas as empresas atendiam a quantidade limite para uso de aditivos estipulada pela legislação”, e os demais participantes relataram que “não tinham receio porque no geral, os produtos eram produzidos de acordo a legislação vigente e, assim, a quantidade dos aditivos químicos utilizados nos alimentos não era prejudicial a saúde”. Todos os participantes das sessões de grupo de foco relataram que no geral, preferiam aditivos naturais.

Quando os consumidores foram questionados se pagariam a mais por um produto embalado numa embalagem ativa, 62,5% dos participantes, referentes aos três grupos formados, pagariam a mais por um alimento embalado numa embalagem ativa, e os demais consumidores pagariam a mais dependendo da função extra fornecida pela embalagem ativa, caso a função transmitida, fosse simplesmente “uma ação de

amaciamento de carne”, por exemplo, não pagariam a mais por este sistema de embalagem. Além disso, os consumidores (91,6%) relataram que pagariam somente entre 10 a 20% a mais pelo sistema de embalagens ativas, e os demais participantes relataram que pagariam até 30%.

Quando os consumidores foram questionados sobre a segurança dos alimentos embalados em embalagens ativas, 87,5% dos consumidores, constituídos pelos participantes dos três grupos, relataram “ser mais seguro os conservantes estarem na embalagem ao invés do alimento”, e os demais participantes não sabiam opinar ou relataram que ambas as formas da utilização dos conservantes apresentavam efeito similar na conservação dos alimentos, desde que a quantidade presente estivesse de acordo a legislação vigente.

Percebeu-se através das sessões de grupo de foco que a expressão “embalagem ativa” é um conceito inovador, e ainda pouco conhecido pelos consumidores de pão de forma, sendo mais conhecido entre os estudantes dos cursos de alimentos, e que mesmo para esta classe de consumidores existem muitas dúvidas sobre o real benefício com a sua aplicação, mostrando que esta área necessita ainda de muitas pesquisas e divulgações para elucidar possíveis dúvidas quanto a utilização de embalagens ativas em alimentos. Além disto, notou-se que de maneira geral, os consumidores declararam que tinham restrições quanto a utilização de aditivos químicos em alimentos, e preferindo o emprego dos aditivos naturais nos sistemas de embalagens ativas, considerando-o como um ponto forte para a sua produção e aceitação.

4. CONCLUSÕES

As nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano apresentaram diâmetro de gotículas na escala nanométrica.

Os filmes incorporados com as nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano na concentração de 40 mg.mL^{-1} foram efetivos na redução das contagens de leveduras e bolores em pães de forma durante o armazenamento a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 dias, mas, a redução das gotículas somente demonstrou ter potencializado esse efeito.

Notou-se a extensão da vida útil desses produtos para 10 dias, sem a visualização de desenvolvimento fúngico.

Ao longo do armazenamento, as amostras de pães de forma embaladas nos filmes ativos foram se tornando mais duras, e seu teor de umidade sofreu variações que se correlacionaram diretamente com as variações no parâmetro de textura.

Os parâmetros de pH, acidez e cor das amostras de pães não foram afetados pela utilização dos filmes incorporados com as nanoemulsões dos óleos essenciais.

Conclui-se, portanto, que os filmes incorporados com as nanoemulsões dos óleos essenciais foram efetivos na conservação microbiológica de pães de forma pelo período de 10 dias.

Por meio das sessões de grupo de foco, percebeu-se que a utilização das embalagens antimicrobianas interferiram negativamente nas características sensoriais dos pães de forma e, assim, acarretam em rejeição destes.

Além disto, notou-se ainda que a expressão “embalagem ativa” é um conceito inovador e pouco conhecido pelos consumidores de pão de forma, necessitando de mais divulgação deste conceito, para elucidar possíveis dúvidas sobre este sistema de embalagens.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS – AACC Approved methods of analysis of the AACC (10th edition). **AACC International**, St. Paul, Minnesota, USA.2000

ARES, G.; BARREIRO, C.; DELIZA, R.; GIMÉNEZ, A.; GÁMBARO, A. Application of a check-all-that-apply question to the development of chocolate milk desserts. **Journal of Sensory Studies**, Manhattan, v. 25, n. 2, p. 67–86, Apr. 2010.

BERTAN, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma**. 2008. 203 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. Livraria Varela, 3º Ed., p. 100, 2001.

BORLIEU, C., GUILLARD, V., VALLÈS-PAMIÈS, B., GONTARD, N. Edible moisture barriers for food product stabilization. In J. M. Aguilera, P. J. Lillford (Eds.), **Food Materials Science**. Principles and practice. New York: Springer, p. 547–575, 2007.

BORLIEU, C., GUILLARD, V., VALLÈS-PAMIÈS, B., GUILBERT, S., GONTARD, N. Edible moisture barriers: How to assess of their potential and limits in food products shelf-life extension? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, V. 49, p. 474–499, 2009.

BOURNE, M.C. Food texture and viscosity: concept and measurement. San Diego, **Academic Press**. 400 p, 2002.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Portaria Nº 451, de 19 de setembro de 1997. Disponível em http://www.pqsys.com.br/links/p_451_1.htm. Acesso 08/02/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, 2001. Seção 1.

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.

CAYOT, N. Sensory quality of traditional foods. **Food Chemistry**, v.101 (1), p.154–162, 2007.

CEYLAN, E.; FUNG, D.Y.C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 12, p.1–55, 2004.

CHACON, P. A.; BUFFO, R. A.; HOLLEY, R. A. Inhibitory effects of microencapsulated allylthiocyanate (AIT) against *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed, finely chopped beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.231–237, 2006.

CHAUDHRY, Q.; SCOTTE, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B., BOXALL, A.; CASTLE, L. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives and Contaminants**, v. 25(3), p. 241–258, 2008.

CHIAVARO, E.; VITTADINI, E.; MUSCI, M.; BIANCHI, F.; CURTI, E. Shelf life stability of artisanally and industrially produced durum wheat sourdough bread (“Altamura bread”). **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 41, p. 58 – 70, 2008.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; DE MARCO, B.; BALESTRIERI, F.; PAOLETTI, F.; RUSSI, L. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48(7), p. 3044–3051, 2000.

DELLA LUCIA, S. M. **Métodos estatísticos para avaliação da influência de características não sensoriais na aceitação, intenção de compra e escolha do consumidor**. 2008. 116p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 2745–2749, 2006.

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

DONSÍ,F.; ANNUNZIATA,M.; VINCENSI, M.; FERRARI,G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, V. 159 (4), P. 342–350, 2012.

EMAMIFAR, A.; KADIVAR, M.; SHAHEDI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. **Food Control**, v. 22, 408–413, 2011.

ESTELLER, M. S.; LANNES, S. C. S. Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 802–806, 2005.

GALIC, K., _CURI_C, D., GABRI_C, D. Shelf life of packaged bakery goods: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 405–426, 2009.

GARCIA, E.E.C. et al. Embalagens plásticas: propriedades de barreira. Campinas: **Instituto de Tecnologia de Alimentos/ITAL**, 1989.

- GAYSINSKY, S., DAVIDSON, P.M., BRUCE, B.D., WEISS, J. Growth inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. **Journal of Food Protection**, v.68, p. 2559–2566, 2005a.
- GAYSINSKY, S., DAVIDSON, P.M., BRUCE, B.D., WEISS, J. Stability and antimicrobial efficiency of eugenol encapsulated in surfactant micelles as affected by temperature and pH. **Journal of Food Protection**, v. 68, p.1359–1366, 2005b.
- GONTARD, N. Active packaging. In: SOBRAL, P.J.A.; CHUZEL, G., eds. **Workshop sobre biopolímeros**. Pirassununga, FZEA, p. 23–27, 1997.
- GUARDA, A.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C.; GALOTTO, M. J. Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. **Food Hydrocolloids**, v.18, p. 241–247, 2004.
- HAN, J.H. Antimicrobial Food Packaging. In: AHVENAINEN, R. (Ed). **Novel Food Packaging Techniques**, 50–65, Washington: CRC Press, 2003.
- HE, H., HOSENEY, R.C. Changes in bread firmness and moisture during longterm storage. **Cereal Chemistry**, v.67, 603–605,1990.
- HUBER, M.; RUIZ, J.; CHASTELLAIN, F. Off-flavour release from packaging materials and its prevention: a foods company's approach. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p.221-228, 2002.
- IMRAN, I.; EL-FAHMY, S.; REVOL-JUNELLES, A.; DESOBRY, S. Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, 219–225, 2010.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2004. 1032p.
- KATINA, K.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; PARTANEN, R., FORSSELL, P.; AUTIO, K. Effects of sourdough and enzymes on staling of highfibre wheat bread. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39(5), p. 479–491, 2006.
- KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADEIRS, C, G. Thermal, mechanical and water barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.373–386, 2008.
- LASSOUED, N.; DELARUE, J.; LAUNAY, B.; MICHON, C. Baked product texture: correlations between instrumental and sensory characterization using Flash Profile. **Journal of Cereal Science**, London, v. 48, n. 1, p. 133–143, 2008.
- LATOU, E.; MEXIS, S.F.; BADEKA, A.V.; KONTOMINAS, M.G. Shelf life extension of sliced wheat bread using either an ethanol emitter or an ethanol emitter combined with an oxygen absorber as alternatives to chemical preservatives. **Journal of Cereal Science**, v. 52, p.457–465, 2010.

LEGAN, J.D.; VOYSEY, P.A. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p.361–371, 1991.

LIOLIOS, C.C., GORTZI, O., LALAS, S., TSAKNIS, J., CHINOU, I. LIPOSOMAL incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v.112, p. 77–83. 2009.

LORENZ, K.; MAGA, J. Staling of white bread: Changes in carbonyl composition and GLC headspace profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, p.211, 1972.

MARKARIAN, J. Consumer demands push growth in additives for active packaging. *Plastics*, **Additives and Compounding**, v.8, p. 30-33, 2006.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; LIMA, D. V.; PIRES, A. C. S. Avaliação da eficiência de filme antimicrobiano incorporado com nisina sobre o crescimento de *Staphylococcus* sp. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 91–95, 2006.

MURA, S.; CORRIAS, F.; STARA, G.; PICCININI, M.; SECCHI, N.; MARONGIU, D.; INNOCENZI, P.; IRUDAYARAJ, J.; GREPPI, G.F. Innovative Composite Films of Chitosan, Methylcellulose, and Nanoparticles. **Journal of Food Science**, V. 00, N.0, p.1–7, 2011.

NIELSEN, P.V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 219 –229, 2000.

PIRES, A.C.S. (2006) Desenvolvimento e avaliação de filmes e sachê antimicrobianos na conservação de queijo mussarela fatiado. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Mg, 73 p.

POZO-BAYÓN, M. A.; GUICHARD, E.; Cayot, N. Flavor control in baked cereal products. **Food Reviews International**, v.22, p. 335–379, 2006.

PRANOTO. Y.; RAKSHIT, S.K.; SALOKHE, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. Swiss Society of. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 859–865, 2005.

QUAGLIA, G. **Ciência y Tecnología de la Panificación**. Editora Acríbia, 1991. 485p.

QUÍLEZ, J.; RUIZ, J.A.; ROMERO, M.P. Relation between sensory flavor evaluation and volatile and nonvolatile compounds in commercial wheat bread type baguette. **Journal of Food Science**, v. 71, S423–S427, 2006.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. **Food Hydrocolloids**. v.29; p. 326–334, 2012.

RODRÍGUEZ, A.; BATLLE, R.; NERÍN, C. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. **Progress in Organic Coatings**, v.60, n.1, p.33–38, 2007.

RODRÍGUEZ, M.; MEDINA, L.M.; JORDANO, R. Effect of modified atmosphere packaging on the shelf life of sliced wheat flour bread. **Nahrung**, v. 44, N. 4, p. 247–252, 2000.

ROSENKVIST, H.; HANSEN, A. Contamination profiles and characterization of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.353–363, 1995.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N.F.S.; NOBREGA, J.E.; JUNIOR M.A.W.; BARBOSA K.B.F.; Volp ACP, Zerdas ERMA e Wurlitzer NJ. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA_ 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v.20, p.85–89, 2009.

SINO, M.A. - Plástico moderno, 282, p.24–31 (1997).

SKURTYS, O.; ACEVEDO, C.; PEDRESCHI, F.; ENRIONE, J.; OSORIO, F.; AGUILERA, J. M. Food hydrocolloid edible films and coatings. In C. Hollingworth (Ed.), **Food hydrocolloids: Characteristics, properties and structures** (pp. 41–80). New York: Nova Publishers, 2010.

SOARES, N. F. F.; RUTISHAUSER, D. M.; MELO, N.; CRUZ, R. S.; ANDRADE N.J. Inhibition of microbial growth in bread through active packaging. **Packaging Technology and Science**, v. 15, p. 129–132, 2002.

VASCONEZ, M. B.; FLORES, S. K.; CAMPOS, C. A.; ALVARADO, J.; GERSCHENSON, L. N. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, v. 42(7), 762–769, 2009.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; VAN BEES, M.; DEVEBERE, J. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.77-86, 1999.

WEISS, J., GAYSINKSY, S., DAVIDSON, M., MCCLEMENTS, J. 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.

ZIVANOVIC, S., CHI, S., DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of food science**, n.1, P.45–51, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

Diante do exposto pode-se concluir:

- Utilizando-se 2 % de óleo essencial de cravo, de canela ou de óregano, 1,5 % de tensoativo, potência de 400 W do ultrassônico por 10 minutos, as nanoemulsões produzidas apresentaram aparência leitosa, sem separação de fases e diâmetro nanométrico.
- As nanoemulsões dos óleos essenciais apresentaram estabilidade com relação ao diâmetro e turbidez.
- As observações de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de Varredura confirmaram que as gotículas das nanoemulsões de óleos essenciais estavam na escala nano.
- As nanoemulsões e, as emulsões produzidas com os óleos essenciais de cravo e de orégano, apresentaram atividade antifúngica *in vitro* para os micro-organismos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp. nas condições testadas.
- A incorporação das nanoemulsões nos filmes de metilcelulose acarretou em melhor alongamento e flexibilidade e não afetou as propriedades de barreiras dos filmes.
- O acondicionamento de pães de forma com os filmes de metilcelulose incorporados com as nanoemulsões dos óleos essenciais de cravo e orégano permitiu o controle de leveduras e bolores até o 10º dia de estocagem.
- Ao longo do armazenamento, as amostras de pão de forma embaladas nos filmes ativos foram se tornando mais duras, e seu teor de umidade sofreu variações que se correlacionaram diretamente com as variações no parâmetro de textura.
- Os parâmetros de pH, acidez e cor das amostras de pão não foram afetados pela incorporação das nanoemulsões dos óleos essenciais.
- Através das sessões de grupo de foco, percebeu-se que a utilização das embalagens antimicrobianas interferiu negativamente nas características sensoriais dos pães de forma e, assim, acarretou em rejeição destes.
- Notou-se ainda que a expressão “embalagem ativa” é um conceito inovador e pouco conhecido pelos consumidores de pão de forma, necessitando de divulgação deste conceito, além de elucidar possíveis dúvidas sobre este sistema de embalagens.