

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Estudo de nanocompósitos de pectina com
nanopartículas de quitosana e carvacrol para aplicação em
embalagens”**

Juliana Reghine Souza

“Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRA EM QUÍMICA, área de
concentração: FÍSICO-QUÍMICA”

**São Carlos - SP
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

“Estudo de nanocompósitos de pectina com nanopartículas de quitosana e carvacrol para aplicação em embalagens”

Juliana Reghine Souza*

“Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM QUÍMICA, área de concentração: FÍSICO-QUÍMICA”

Orientador: Luiz Henrique Capparelli Mattoso

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Juliana Reghine Souza, realizada em 27/10/2017:

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Embrapa

Profa. Dra. Marcia Regina de Moura Aouada
UNESP

Profa. Dra. Alessandra de Almeida Lucas
UFSCar

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus.

Aos meus pais, Marilene e Vanderlim,

Minha irmã, Daniela,

Por todo amor, carinho e apoio,

Em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmã e demais familiares por todo apoio nesta longa trajetória.

Ao meu orientador, Luiz Henrique Capparelli Mattoso, pela paciência, por todo crescimento pessoal e profissional que me proporcionou.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa Marcos Lorevice, Kelvi Miranda, Caio Otoni, Francys Moreira, Pedro Ivo, Liliane Leite, por toda a ajuda dentro e fora do laboratório e pelas discussões para execução deste projeto. Obrigada!

Ao Rodrigo Gounella, pelo companheirismo, compreensão e por toda a paciência que teve comigo até o momento.

À professora Dra. Márcia de Moura, pela preocupação e por todos os conselhos desde a iniciação científica até agora. Meu muito obrigada.

Aos meus colegas de sala, Paulo Augusto, Taís Téó e João Malafatti, pelas risadas durante o dia e pela ajuda com meu projeto.

Aos técnicos, Adriana Thomazi, Alice Raabe, Viviane Soares, Silviane, Matteo e Joana, por todo auxílio e treinamento em equipamentos para que fosse possível a execução deste projeto.

Aos meus amigos sempre presentes de São Carlos e Bauru, obrigada por ajudar a deixar esta trajetória um pouco mais fácil.

Ao departamento de Física e Química da Universidade Paulista – UNESP campus Ilha Solteira, por ter aberto as portas para eu desenvolver parte da minha pesquisa, em especial aos alunos que estiveram comigo, Vanessa Solfa, Juliana Nunes, Pamela Thais e Renan Fernandes.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado acadêmico.

A Embrapa Instrumentação pela infraestrutura para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos (PPGQ-UFSCar) pela oportunidade de estudo do mestrado.

Enfim a todos que me ajudaram direta ou indiretamente na conclusão de mais essa etapa em minha vida. Muito obrigada a todos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

ATR – *Attenuated total reflectance*

CBM – Concentração bactericida mínima, do inglês minimum bactericidal concentration)

CIM – Concentração inibitória mínima, do inglês minimum inhibitory concentration

CRV – Carvacrol

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

DTG – Curva termogravimétrica derivada

E – Módulo de elasticidade

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Er – Elongação na ruptura

F – Força máxima suportada no ensaio de tração

FT-IR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

GM – Grau de metoxilação

GRAS – “*Generally Recognized as Safe*”

IPd – Índice de polidispersividade

MEV/FEG – Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo

Mw – Massa molar média ponderal

NPQS – Nanopartículas de quitosana

NPs – Nanopartículas

OE – Óleo essencial

PEC – Pectina

PEC_NPQS – Nanocompósito de pectina e nanopartícula de quitosana

PEC_NPQS_CRV – Nanocompósito de pectina, nanopartícula de quitosana e carvacrol

pH – Potencial Hidrogeniônico

PMMA – Polimetil metacrilato

PVA - Permeabilidade ao vapor de água

QS – Quitosana

RH - Umidade relativa

TD – Temperatura de degradação

TG – Termogravimetria

TPP – Tripolifosfato de sódio

TPE – Temperatura do pico endotérmico

(σ) - Resistência à Tração

UFC – Unidade formação de colônias

UV – Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA 4-1: Formulações dos filmes de pectina.....	25
TABELA 5-1: Valores do tamanho médio, potencial zeta e índice de polidispersividade (IPd) das NPQS.....	35
TABELA 5-2: Bandas de espectroscopia no infravermelho da quitosana, tripolifosfato de sódio (TPP) e nanopartículas de quitosana (NPQS).	44
TABELA 5-3: Temperatura do pico endotérmico (TPE) e variação de entalpia (ΔH) da quitosana e nanopartícula de quitosana (NPQS).....	50
TABELA 5-4: Concentração inibitória mínima (CIM) e valores de concentração bactericida mínima (CBM) para quitosana, nanopartículas de quitosana (NPQS), carvacrol para <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	50
TABELA 5-5: Espessura dos filmes de pectina 5% (m/m) e dos nanocompósitos (PEC5%_NPQS 2%).....	54
TABELA 5-7: Valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de pectina 2% e pectina 5%.....	65
TABELA 5-6: Espessura dos filmes de pectina 2% (m/m) e dos nanocompósitos (PEC 2%_NPQS).	55
TABELA 5-7: Valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de pectina 2% e pectina 5%	74
TABELA 5-8: Valores médios e desvio padrão da tensão máxima, módulo elástico e alongação na ruptura dos filmes de pectina 2% e dos nanocompósitos com ou sem carvacrol.....	72
TABELA 5-9: Valores médios e desvio padrão da tensão máxima, módulo elástico e alongação na ruptura dos filmes de pectina 5% e PEC5%_NPQS 2% preparados por casting contínuo e batelada.	75
TABELA 5-10: Valores das temperaturas de degradação dos filmes de pectina 2% e dos nanocompósitos com e sem carvacrol.	79

TABELA 5-11: Valores das temperaturas no pico endotérmico (TPE) e da variação de entalpia (ΔH) da pectina e filmes de pectina 2%.....	83
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: Esquema de formação do complexo de polieletrólitos quitosana-pectina.	9
FIGURA 2.2: Estrutura química da pectina. Adaptado (HAMMAN, 2010).....	10
FIGURA 2.3: Estrutura da quitina após reação de desacetilação com hidróxido de sódio, transforma-se em quitosana (adaptado de ANITHA et al., 2014).....	12
FIGURA 2.4: Apresenta a solubilidade da quitosana em pH maior ou menor que 6,5. Fonte: DASH et al., 2011.	13
FIGURA 4.1: Suspensão coloidal de nanopartículas de quitosana.	21
FIGURA 5.2: Distribuição do tamanho das nanopartículas de quitosana (NPQS).	36
FIGURA 5.3: Tamanho médio das nanopartículas de quitosana em função do pH.	37
FIGURA 5.4: Dependência do potencial Zeta com a variação de pH das suspensões de nanopartículas de quitosana (NPQS) (0,1%, m/m) e pectina (PEC) (0,1%, m/m) em valores de pH variando de 1,5 a 11.....	40
FIGURA 5.5: Espectro de FT-IR do tripolifosfato de sódio, quitosana e nanopartícula de quitosana.	43
FIGURA 5.6: Imagens de MEV/FEG das nanopartículas de quitosana. Em a) NPQS com aumento de 20.000 vezes e b) aumento de 90.000 vezes.	45
FIGURA 5.7: Curvas termogravimétricas de degradação e DTGA das nanopartículas de quitosana (NPQS) e quitosana (QS).	47
FIGURA 5.8: Curvas de calorimetria exploratória diferencial da quitosana (QS) e nanopartícula de quitosana (NPQS).	49
FIGURA 5.9: Filmes de pectina 2% e nanocompósitos: a) PEC, b) PEC2%_NPQS 1%, c) PEC2%_NPQS 1,5%, d) PEC2%_NPQS 2%, e) PEC2%_NPQS 1%_CRV, f) PEC2%_NPQS 1,5%_CRV, g) PEC2%_NPQS 2%_CRV.	53

FIGURA 5.10: Ângulo de contato dos filmes de pectina 2% e nanocompósitos: (a) Pectina 2%, (b) PEC 2%_NPQS 1%, (c) PEC 2%_NPQS 1,5%, (d) PEC 2%_NPQS 2%.....	56
FIGURA 5.11: Ângulo de contato dos filmes de pectina 2%: (a) pectina 2%, (b) PEC 2%_NPQS 1%_CRV, (c) PEC 2%_NPQS 1,5%_CRV, (d) PEC 2%_NPQS 2%_CRV.....	57
FIGURA 5.12: Imagens de MEV/FEG – Observação da superfície de fraturas criogênicas dos filmes obtidos por <i>casting</i> batelada: (a) pectina 2%, (b) PEC2%_NPQS 1%, (c) PEC2%_NPQS 1,5%, (d) PEC2%_NPQS 2%.....	59
FIGURA 5.13: Imagens de MEV/FEG - Fraturas criogênicas dos Filmes: (a) PEC2%_NPQS 1%_CRV (b) PEC2%_NPQS 1,5%_CRV, (c) PEC2%_NPQS 2%_CRV. Micrografias com aumentos de 50.000 a 100.000 vezes.....	60
FIGURA 5.14: Imagens de MEV/FEG – Superfície dos filmes de pectina 2% e nanocompósitos: a) PEC 2%, b) PEC2%_NPQS 1%, (c) PEC2%_NPQS 1,5%, (d) PEC2%_NPQS 2%. Micrografias com aumentos de 50.000 vezes.....	61
FIGURA 5.15: Imagens de MEV/FEG – Superfície dos filmes de pectina 2% e nanocompósitos: (e) PEC2%_NPQS 1%_CRV (f) PEC2%_NPQS 1,5%_CRV, (g) PEC2%_NPQS 2%_CRV. Micrografias com aumentos de 50.000 vezes....	62
FIGURA 5.16: Imagens de MEV/FEG – Superfície dos filmes de pectina 5% produzidos por <i>casting</i> contínuo. (a) pectina 5% e (b) PEC5%_NPQS 2%. Micrografias com aumentos de 1.000 vezes	63
FIGURA 5.17: Espectro de infravermelho dos filmes de pectina 2% puro e com 1%, 1,5%, 2% de nanopartícula de quitosana (PEC 2%_NPQS) e carvacrol.....	64
FIGURA 5.18: Valores de PVA para os filmes de pectina 2% (cinza) produzidos por batelada e pectina 5% (verde) produzidos por <i>casting</i> contínuo.....	66
FIGURA 5.19: Tensão Máxima de todos os filmes de pectina 2% e os nanocompósitos com e sem carvacrol (PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV).	70

FIGURA 5.20: Elongação na ruptura de todos os filmes de pectina 2% e os nanocompósitos com e sem carvacrol (PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV).	70
FIGURA 5.21: Módulo Elástico de todos os filmes de pectina 2% e os nanocompósitos com e sem carvacrol (PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV).	71
FIGURA 5.22: Curva termogravimétrica do carvacrol.	76
FIGURA 5.23: Curvas termogravimétricas dos filmes de pectina 2%, PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV.....	77
FIGURA 5.24: Curva de calorimetria exploratória diferencial da pectina.....	80
FIGURA 5.25: Curva de calorimetria exploratória diferencial dos filmes de pectina 2%, PEC_NPQS e PEC_NPQS_CRV.....	81
FIGURA 25.6: Região aproximada de - 50 a - 40 °C do filme pectina 2%.....	82
FIGURA 0.27: Apresentam os filmes de PEC 2%_NPQS 1,5%. Em a) com CRV e b) sem CRV para as bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	84

RESUMO

ESTUDO DE NANOCOMPÓSITOS DE PECTINA COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E CARVACROL PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS: O Brasil tem realizado várias pesquisas e desenvolvido diversos produtos a partir de materiais nanoestruturados, o que resultou em uma expansão em suas pesquisas. Um destes está focado em minimizar o impacto ambiental causado pelas embalagens derivadas do petróleo que cada vez mais são utilizadas em nosso cotidiano. Neste contexto, as indústrias de alimentos vêm enfrentando vários desafios no sentido de reduzir os danos ambientais causados por embalagens baseadas em polímeros sintéticos, sendo uma das alternativas a produção de filmes biodegradáveis produzidos a partir de fontes renováveis. Portanto, este trabalho teve como objetivo produzir nanopartículas de quitosana (NPQS) e incorporá-las em filmes de pectina com carvacrol, substância majoritária do óleo essencial de orégano. Os materiais utilizados foram pectina (de baixo grau de metoxilação, GM), quitosana e carvacrol. As NPQS foram sintetizadas por gelatinização ionotrópica na proporção mássica de 2:1 (quitosana/tripolifosfato de sódio) e caracterizadas segundo seu tamanho médio, potencial Zeta, análise térmica, morfologias e propriedades antimicrobianas. O tamanho médio das NPQS ficou próximo dos 100 nm e potencial Zeta acima de + 30 mV, o que indica boa estabilidade da suspensão em água. O valor de índice de polidispersividade 0,5 indica suspensões mais homogêneas. A concentração inibitória mínima (CIM) para a quitosana foi de 0,15 mg/ml, já para as NPQS exibiram valores de 0,10mg/ml. Os filmes foram produzidos por *casting* contínuo e *casting* batelada nas concentrações volumétricas de 5% e 2% de pectina em solução aquosa. Estes foram caracterizados quanto à espessura, espectroscopia no infravermelho, propriedades mecânicas, térmicas, permeabilidade ao vapor de água, morfologia e atividade antimicrobiana. A adição de NPQS na concentração mássica de 1% em relação à massa de pectina obteve incrementos de 100% nas propriedades

mecânicas. A presença de NPQS e carvacrol aumentou a segunda temperatura de degradação (TD) o que indica que pode existir uma interação de hidrogênio entre a quitosana e a pectina. A propriedade de barreira manteve-se inalterada com a adição de NPQS e carvacrol podendo haver competição entre ambos os efeitos de reforço produzidos pelas NPQS e/ou plastificante do carvacrol.

Palavras-chaves: Nanocompósitos, nanopartículas de quitosana, carvacrol, embalagens de alimentos.

ABSTRACT

PECTIN NANOCOMPOSITES WITH CHITOSAN NANOPARTICLES AND CARVACROL FOR APPLICATION IN PACKAGING. Brazilian researchers have performed out several works and developed several products from nanostructured materials, which has resulted in an expansion in its research. One of these research fields is focused on minimizing the environmental impact caused by petroleum-derived packaging, which has been increasingly used in our daily lives. From this context, food industries are facing several challenges of reducing environmental damage caused by synthetic polymers, being the production of biodegradable films produced from renewable sources one of the alternatives. Therefore, this project aimed to formulate pectin films with chitosan nanoparticles (CSNP) and carvacrol, the major substance of the oregano essential oil. The materials used were pectin (low methoxyl degree, MD), chitosan and carvacrol. The CSNP were synthesized by ionotropic gelatinization in the mass ratio 2:1 (chitosan/sodium triphosphate) and characterized by particle size distribution, zeta potential, infrared spectroscopy, thermal analyze, morphologies and antimicrobial activity. The mean size NPQS was close to 100 nm and Zeta potential above + 30 mV, indicating good suspension stability in water. The value of polydispersity index 0.5 indicates more homogeneous suspensions. The minimum inhibitory concentration (MIC) for chitosan was 0.15 mg/ml, whereas the NPQS values were 0.10 mg / ml. The films were produced by continuous casting and batch casting at the volumetric concentrations of 5% and 2% pectin in aqueous solution. They were characterized by thickness, infrared spectroscopy, mechanical and thermal properties, water vapor permeability, morphology and antimicrobial activity. The addition of NPQS in the 1% mass concentration of the pectin mass resulted in 100% increments in the mechanical properties. The presence of NPQS and carvacrol increased the second degradation temperature (TD) indicating that there may be a hydrogen

interaction between chitosan and pectin. The barrier property remained unchanged with the addition of NPQS and carvacrol, and there could be competition between both reinforcing effects produced by NPQS and the plasticizer of carvacrol.

Keywords: Nanocomposite, chitosan nanoparticles, carvacrol, food packaging.

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO	Erro! Indicador não definido.
DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
Lista de Abreviaturas	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
SUMÁRIO.....	xviii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1- Embalagens de Alimentos e Inovações	5
2.2- Complexação de Polieletrólitos	7
2.3- Pectina.....	9
2.4- Quitosana	11
2.5 - Formação de Nanopartícula de Quitosana.....	14
2.6 – Carvacrol.....	16
3. OBJETIVOS	19
4- MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1- Material	20
4.2- Métodos.....	20
4.2.1 - Síntese das Nanopartículas de Quitosana.....	20
4.2.2 - Caracterização das Nanopartículas de Quitosana.....	21

4.2.3	- Preparo e Caracterização dos Nanocompósitos de Pectina.....	25
4.2.4	- Métodos de Obtenção dos Filmes	26
4.2.5	- Caracterização dos Nanocompósitos de Pectina	28
4.2.5.1	– Propriedades Físicas	28
4.2.5.1.1	– Determinação da espessura dos filmes.....	28
4.2.5.1.2	– Ângulo de Contato.....	29
4.2.5.2	– Morfologia dos Filmes.....	29
4.2.5.2.1	– Microscopia Eletrônica de Varredura com fonte de emissão de campo	29
4.2.5.2.2	– Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier - Refletância total atenuada (FTIR-ATR)	30
4.2.5.3	– Propriedade de Barreira.....	30
4.2.5.3.1	– Permeabilidade ao Vapor de água (PVA)	30
4.2.5.4	– Propriedades Mecânicas	31
4.2.5.5	– Propriedades Térmicas	32
4.2.5.5.1	– Termogravimetria	32
4.2.5.5.2	– Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	32
4.2.5.6	- Análise de halo de inibição para determinação da atividade antimicrobiana.....	33
4.2.5.7	– Análise Estatística.....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	– Caracterizações das Nanopartículas de Quitosana	35
5.1.1	- Tamanho médio e Potencial Zeta (ζ).....	35
5.1.2	- Estudo da interação pectina-nanopartículas de quitosana com a variação do pH	39

5.1.3	- Espectroscopia de Infravermelho	42
5.1.4	- Microscopia Eletrônica de Varredura com fonte de emissão de campo 45	
5.1.5	- Termogravimetria	46
5.1.6	- Calorimetria Exploratória Diferencial.....	48
5.1.7	- Concentração Mínima Inibitória (CIM).....	50
5.2	- Caracterizações dos Nanocompósitos de Pectina.....	52
5.2.1	- Propriedades Físicas	53
5.2.1.1	- Espessura	53
5.2.1.2	- Ângulo de Contato.....	55
5.2.2	- Morfologia dos Filmes.....	58
5.2.2.1	- Microscopia Eletrônica de Varredura.....	58
5.2.2.2	- Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier - Refletância total atenuada.....	63
5.2.3	- Propriedades de Barreira.....	65
5.2.3.1	- Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)	65
5.2.4	- Propriedades Mecânicas	69
5.2.5	- Análises Térmicas.....	75
5.2.5.1	- Termogravimetria	76
5.2.5.2	- Calorimetria Exploratória Diferencial.....	79
5.2.6	- Análise de halo de inibição para determinação da atividade antimicrobiana.....	84
6	- Conclusões Finais	86
7	- Referências Bibliográficas.....	88

1- INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos vem enfrentando vários desafios para aumentar a forma de prolongar a vida útil dos alimentos frescos, mantendo as características sensoriais e qualidade *in natura* durante o transporte e armazenamento por longos períodos de tempo (CAMPOS-REQUENA et al., 2015). A segurança alimentar e as propriedades sensoriais dos alimentos podem sofrer várias reações, que diminuem a qualidade sensorial, nutricional e de segurança no alimento, por exemplo, os processos de oxidação e deterioração microbiana. Estas reações diminuem o valor nutricional dos alimentos devido à hidrólise e/ou desnaturação de substâncias com propriedades benéficas (ácidos graxos, vitaminas e proteínas). No aspecto sensorial a produção de sabores indesejáveis e odores; e na visão de segurança alimentar, a ingestão de alimentos por parte dos consumidores, de alimentos deteriorados e/ou contaminados por microrganismos patogênicos ou toxinas (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015).

Em face desta necessidade, as indústrias de embalagens visam o prolongamento da vida de prateleira de produtos perecíveis, promovendo maior qualidade e padrões sensoriais e nutricionais dos alimentos próximo a sua forma *in natura*. Em vista disso, o conceito tradicional de embalagem de alimentos em aumentar a qualidade, segurança e o frescor dos produtos perecíveis, as indústrias alimentícias desenvolveram um novo sistema de embalagem conhecido como "embalagem ativa" (SUNG et al., 2013), definido como embalagens que interagem de forma desejável com o alimento, aumentando sua estabilidade (SCHREIBER et al., 2013; MOURA et al., 2014). As embalagens ativas são capazes de estender a vida útil do produto, podendo melhorar ou melhorar algumas propriedades da própria embalagem (VERMEIREN et al., 1999). Um dos modos pelos quais as embalagens ativas interagem com os

alimentos é através da liberação gradual de agentes antimicrobianos incorporados inicialmente na própria matriz polimérica da embalagem ao invés de adicioná-la diretamente na matriz alimentar, sendo chamadas de substâncias bioativas (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002; MOURA et al., 2012; OTONI et al., 2014).

A incorporação de substâncias bioativas, como óleos essenciais (OEs) extraídos de vegetais, em filmes vem atraindo os setores de pesquisa e desenvolvimento de áreas multidisciplinares. Os filmes biodegradáveis produzidos a partir de fontes renováveis são uma alternativa na substituição dos filmes sintéticos, pois além da sua capacidade de encapsulação e incorporação de agentes ativos, não são poluentes ao meio ambiente (MOGOŞANU e GRUMEZESCU, 2014).

As embalagens antimicrobianas têm atraído à atenção da indústria de alimentos, principalmente com a utilização de OEs e seus compostos majoritários, os quais podem ser incorporados nas formulações de embalagens ativas como agentes bioativos de ação antimicrobiana (HYLDGAARD et al., 2012; SEOW et al., 2014). Os OEs, tais como os de cravo, orégano, tomilho, noz-moscada, manjeriço, mostarda e canela, são categorizados como GRAS (*generally recognized as safe*) pelo órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA, 2013) (MANSO et al., 2014). Os OEs são formados principalmente por substâncias lipofílicas cujos compostos são geralmente hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, dentre outros, em diferentes concentrações. Os OEs são incorporados nas matrizes poliméricas devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas, que incluem as atividades bactericida, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica (SUNTRES et al., 2013). O OE de orégano é caracterizado pelos altos teores de carvacrol (64-22%) e timol (19-1,4%). Carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) e o seu isômero, o timol (2-isopropil-5-metilfenol), são os principais compostos de tomilho e manjerona.

Carvacrol e timol são geralmente utilizados devido a efeitos antimicrobianos em bactérias, fungos e leveduras, bem como devido às propriedades inseticidas e antioxidantes (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). Segundo a literatura, estes compostos rompem as membranas bacterianas, causando a sua permeabilização (LAMBERT et al., 2001).

Outra maneira de melhorar as propriedades de barreira e mecânicas dos filmes é a inclusão de nanopartículas às matrizes poliméricas, produzindo nanocompósitos com propriedades muito melhores que os filmes apenas com um polissacarídeo (AZEREDO et al., 2009b; SANCHEZ-GARCIA et al., 2010; PERALTA-VIDEA et al., 2011).

Os filmes biopoliméricos para serem aplicados em embalagens devem apresentar as seguintes características: eficiência à barreira (ao vapor de água e gases), resistência mecânica e estabilidade térmica. Devem ser não poluentes e ter baixo custo e de fácil produção (NUSSINOVITCH et al., 2009). Uma forma encontrada e reportada na literatura é a adição de compostos às matrizes biopoliméricas dos filmes de forma a melhorar as propriedades (MOURA et al., 2011b). Compostos com hidrofobicidade como os OEs incrementam a barreira ao vapor de água (BONILLA et al., 2012; MA et al., 2012; PEREDA et al., 2012; MATSAKIDOU et al., 2013; VALENZUELA et al., 2013).

Para o estudo de novas embalagens biodegradáveis, podem ser citados dois polissacarídeos: pectina e quitosana. A pectina é um composto solúvel em água que se polimeriza na forma de películas por moldagem e secagem (ESPITIA et al., 2014) e pode servir como matriz para a produção de filmes biodegradáveis e comestíveis. Naturalmente encontrada em paredes de células de vegetais, a pectina é composta predominantemente de ácido poli A1-4-galacturônico, exibindo elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade (ANTONIOU et al., 2015). A quitosana tem importante papel como matriz polimérica na elaboração de filmes e na síntese de estruturas nanométricas,

como pode ser observado na literatura (MOURA et al., 2008; JIA et al., 2009; MOURA et al., 2009; KONG et al., 2010; GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; MOURA et al., 2011a; HOSSEINI et al., 2013). É um polissacarídeo catiônico natural encontrado em alguns fungos e obtido sinteticamente pela parcial ou total desacetilação da quitina um polissacarídeo abundante na natureza, biocompatível, insolúvel em água, presente na carapaça de crustáceos marinhos, como camarão, lagosta e siri e nas paredes celulares de fungos (BADAWY e RABEA, 2011; POLLETO et al., 2011).

Portanto, este trabalho objetivou formular filmes de pectina adicionados de nanopartículas de quitosana encapsuladas com carvacrol com o objetivo de melhorar as propriedades físicas, de barreira e mecânicas.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Embalagens de Alimentos e Inovações

O plástico conquistou aos poucos seu espaço como material de grande importância para a sociedade. Atualmente seu descarte é um problema para o mundo e principalmente para o Brasil. A produção de plásticos de fontes petrolíferas mundial é de aproximadamente 260 milhões de toneladas, segundo dados da Associação Brasileira da Indústria do Plástico (ABIPLAST) publicado em 2015. No Brasil, cerca de 13,5% do plástico são descartados incorretamente no meio ambiente causando impactos negativos ao meio ambiente, por exemplo, a poluição dos oceanos e aumento do volume de lixo nos aterros. De acordo com o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada IPEA, publicou, em (2012), que aproximadamente 2,7 milhões de toneladas de embalagens plásticas são consumidas, sendo que 93% desse total são relativas às embalagens pós-consumo.

A procura por alimentos livres de aditivos e produtos minimamente processados (alimentos práticos e rápido consumo) tem levado a pesquisa por novos materiais de embalagem, a fim de satisfazer as necessidades e exigências dos consumidores. As indústrias alimentícias vêm enfrentando vários desafios de reduzir os danos ambientais causados por polímeros sintéticos devidos a resistência à degradação (MUSCAT et al., 2012), sendo uma das alternativas a produção de filmes e revestimentos biodegradáveis produzidos a partir de fontes renováveis. Os polímeros utilizados como matriz para filmes biodegradáveis podem ser renováveis, abundantes e preferencialmente de baixo custo (CAZÓN et al., 2017).

Filmes comestíveis e biodegradáveis podem ser uma alternativa para a manutenção da qualidade e durabilidade dos alimentos quanto às características sensoriais e nutricionais, através de melhoria nas condições de

segurança que venham a retardar ou inibir os processos de deterioração (bacteriana e/ou físico-química).

A busca para desenvolver filmes biopoliméricos incluem principalmente, proteínas de origem animal ou vegetal, lipídios e polissacarídeos. A elaboração de filmes à base de polissacarídeos como a pectina para produtos alimentícios pode ser uma alternativa para redução do impacto ambiental devido sua abundância, biodegradabilidade, viabilidade e o seu baixo custo. Filmes à base de polissacarídeos são geralmente muito hidrofílicos, resultando em um material com baixas propriedades de barreira a água (PVA) e gases. As propriedades de barreira (vapor de água e gases) são importantes para aplicação em embalagens, pois retarda a desidratação de produtos frescos ou a perda de crocância em alimentos secos.

Os filmes de polissacarídeos podem ser aplicados em alimentos com baixa atividade de água como produtos de origem vegetal, chocolate, bolachas, pães, alguns temperos, legumes ou até mesmo em embalagem para gelatina em pó sendo consumida com o produto. A literatura apresenta trabalhos relacionados a filmes com matriz polissacarídica. BOTRE et al. (2010) desenvolveram filmes de base celulósica com incorporação de óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta refrigerada. Outro estudo apresentado por CHAICHI et al. (2016) incorporaram diferentes concentrações de nanocristais de celulose em filmes comestíveis a base de pectina para avaliar o desempenho mecânico, térmico e de barreira dessas destes filmes produzidos por *casting* descontínuo. Em seguida BERNHARDT et al. (2017) produziram filmes comestíveis a base de pectina de baixo grau de metoxilação com fibra extraída da casca de milho para melhorar as propriedades mecânicas e de barreira.

Os filmes podem ser obtidos por vários métodos, dentre eles o método *casting*. Este método consiste na dissolução do polímero em solventes adequados ou em água. A solução filmogênica é depositada em um substrato

plano e não adesivo para evaporação do solvente à temperatura e condições de umidade relativa desejada, seguida de remoção do filme formado, previamente seco. Os filmes podem ser processados de forma contínua ou descontínuo (batelada). Segundo DU et al. (2011), os métodos diferem nas condições de secagem que podem variar de 12 minutos com ar quente a 12 h à temperatura ambiente. MANRICH et al. (2017) produziu filmes comestíveis a base de pectina com tomate por *casting* contínuo.

2.2- Complexação de Polieletrólitos

Complexos polieletrólíticos são compostos de macromoléculas, que são dissolvidos em um solvente polar, geralmente água, adquirindo um grande número de cargas elementares, as quais são distribuídas ao longo da cadeia macromolecular, geralmente indicadas como polieletrólito. Estes complexos são formados pela interação iônica entre os compostos catiônicos e os aniônicos (BERGER et al., 2004). A reação de complexação pode ser conduzida pela atração coulômbica ou outras interações, como ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação de transferência de carga, e os efeitos hidrofóbicos (PATIL et al., 2015). Este método é bastante pesquisado para o desenvolvimento de novos materiais e tecnologias, visando à aplicação em diferentes áreas, tais como novas embalagens e liberação de substâncias bioativas em alimentos, entre outras (PREZOTTI et al., 2014). As propriedades dos complexos são influenciadas pela posição dos grupos carregados, a densidade de carga, a concentração de polímeros aniônicos e catiônicos, a proporção de cargas opostas, a massa molar dos polímeros e tempo e temperatura de agitação e pH do meio da reação (SCHAFFER et al., 2000; TSUCHIDA & ABE, 1982).

Os polissacarídeos aniônicos mais comumente utilizados para formar complexos com a quitosana são alginato, pectina, sulfato de dextrana, goma arábica, carragena ou xantenos.

Diferentes estudos relatam a formação de complexos de polieletrólitos com a quitosana. Segundo SHIN-YA et al. (2004), produziram complexos de polieletrólito entre o copolímero de óxido de polietileno-ácido maleico e quitosana pelo método de *casting*. Outros pesquisadores investigaram a possibilidade de usar misturas e / ou complexos de polieletrólitos tanto de quitosana-alginato quanto de quitosana-carragena como sistemas de liberação de fármacos (TAPIA et al., 2004). WANG et al. (2011a) avaliaram o complexo formado entre quitosana e alginato para aplicação em implantes biodegradáveis. Para TSAI et al. (2014), o estudo de novas membranas com o complexo de polieletrólitos de pectina/ quitosana / goma arábica apresentou eficiência para uso na área biomédica. MACIEL (2015) estudou a formação do complexo dos polieletrólitos quitosana-pectina, visando à obtenção de sistemas carreadores de compostos bioativos, nas formas de membrana e nanocomplexos. LOREVICE et al. (2016) adicionaram nanopartículas de quitosana em matrizes de pectina de baixo e alto teor de metoxilação para avaliar as propriedades mecânicas, barreira e térmicas dos filmes nanocompósitos.

Os complexos formados entre pectina e quitosana são por interações eletrostáticas entre os grupos aniônicos da pectina (COO^-) e os grupos catiônicos da quitosana (NH_3^+) (Figura 2.1). Estas interações diretas entre as cadeias poliméricas formam redes tridimensionais, não necessitando do uso de agentes reticulantes (HAMMAN, 2010).

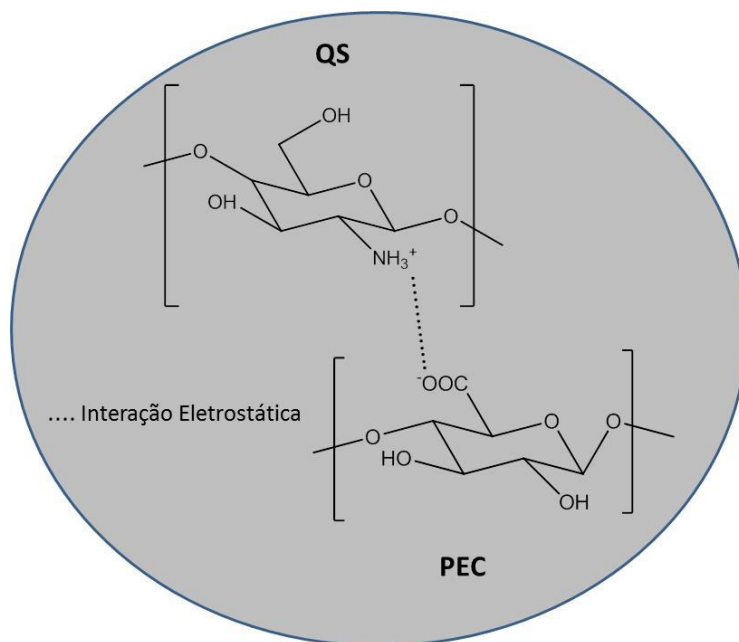


FIGURA 2.1: Esquema de formação do complexo de polieletrólitos quitosana-pectina.

2.3- Pectina

As pectinas consistem em uma família aniônica de polissacarídeos complexos presentes na parede celular das plantas, as quais fazem parte de uma variada classe de substâncias denominadas de pécticas (BAWA et al., 2013), geralmente são extraídas de frutas cítricas ou maçã. A pectina é um polímero comestível reconhecida como segura para o consumo humano (GRAS – *generally recognized as safe*) pela FDA (Food and Drug Administration – USA) (FDA, 2013). Considerada um biopolímero com capacidade de formar géis, sendo amplamente utilizado em indústrias de alimentos no preparo de geleias, doces e sucos de frutas. A estrutura química da pectina (Figura 2.2) é composta por uma cadeia linear de unidades de D1-4 ácido galacturônico, muitas das unidades são esterificadas com metanol e éster podendo ser removido pela ação de enzimas ou álcalis (MISHRA et al., 2012).

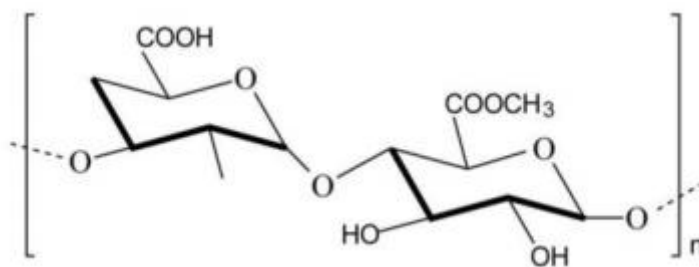


FIGURA 2.2: Estrutura química da pectina. Adaptado (HAMMAN, 2010).

Segundo JINDAL et al. (2013), as propriedades físico-químicas das PEC são decorrentes do grau de metil-esterificação (GM), força iônica, pH, temperatura e capacidade de formar géis. As pectinas podem ser classificadas de acordo com o GM em: pectinas de baixo grau de metoxilação (BGM), as quais possuem um GM < 50% e pectinas de alto grau de metoxilação (AGM), que apresentam GM > 50 %. A PEC de BGM forma gel na presença de íons multivalentes por interações eletrostáticas, interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio entre os cátions adicionados e os ânions das cadeias de pectina (FRAEYE et al., 2010).

MOREIRA et al. (2013) avaliaram filmes de pectina com nanopartículas de Mg(OH)₂ e observaram que o GM influencia nas propriedades mecânicas dos filmes. Os autores observaram que os filmes contendo PEC de BGM resultaram em filmes mais resistentes que os filmes de PEC de AGM e atribuíram esse comportamento à ocorrência maior de grupos de hidroxilas na estrutura da PEC de BGM resultando em um número maior de ligações de hidrogênio e uma matriz mais compacta.

O pKa da pectina está em aproximadamente entre 2,9 a 3,2 próximo ao pKa do ácido do monômero galacturônico. A pectina vem sendo reportada na literatura como matriz polimérica para aplicação em filmes. Segundo MOURA et al. (2014) relataram a utilização de filmes comestíveis de pectina com nanoemulsão de canela para aplicação em embalagens de alimentos.

A literatura apresenta estudos de pectina para aplicação em embalagens de alimentos. Este polímero é biocompatível, atóxico e totalmente degradado por bactérias (BIGUCCI et al., 2008; BIGUCCI et al., 2009). Espitia et al. (2014) os quais produziram filmes comestíveis a base de pectina para aplicação em embalagens. OTONI et al. (2014a) avaliaram o desempenho mecânico e propriedades antimicrobianas de nanoemulsão de cinamaldeído em filmes de pectina para aplicação em embalagens.

2.4- Quitosana

A Quitosana (QS) é um biopolímero natural derivado da quitina que pode ser encontrada em exoesqueleto de crustáceos, nas paredes de células fúngicas e em outros materiais biológicos. Após o processo de desproteinização com NaOH; desmineralização com HCl e despigmentação em etanol, meio ácido ou EDTA, para purificação devido a presença de outros compostos, a quitina passa para a forma de quitosana (ALMEIDA, 2009).

A quitosana é derivada da desacetilação da quitina em meios básicos (ABDOU et al., 2008), resultando em um grau de desacetilação igual ou acima a 65% (ABUGOCH et al., 2011) tornando-se um composto com unidades desacetiladas e acetiladas (NHCOCH_3). Dificilmente ocorrerá 100% de desacetilação da quitina em quitosana devido às diversas reações consecutivas, que favorecem sua despolimerização (MÜLLER, 2013). Esta, por sua vez, é considerada um copolímero composto por uma cadeia linear constituída por β -(1-4)- 2-amino-2-desóxi-D-glicose, biodegradável, biocompatível, de fonte renovável e baixa toxicidade (Dutta et al., 2009) e atividade antimicrobiana contra fungos, leveduras e bactérias (Aider, 2010; Amaral et al., 2015; Lekjing, 2016) a quitosana tem se mostrado um biopolímero de alta potencialidade de uso e aplicação na área de alimentos, como componente bioativo para elaboração de embalagens ativas, por exemplo. Segundo GARCIA (2011) o mecanismo de

ação da quitosana contra as bactérias gram positivas e negativas, ocorre de acordo com a massa molar. A quitosana com elevada massa molar ataca os microorganismos gram positivos, formando uma fina camada ao redor da célula bacteriana, inibindo a absorção de nutrientes. A quitosana com baixa massa molar penetra facilmente nas bactérias gram negativas, promovendo distúrbios no metabolismo do patógeno. A Figura 2.3 representa esquematicamente as estruturas químicas da quitina e quitosana.

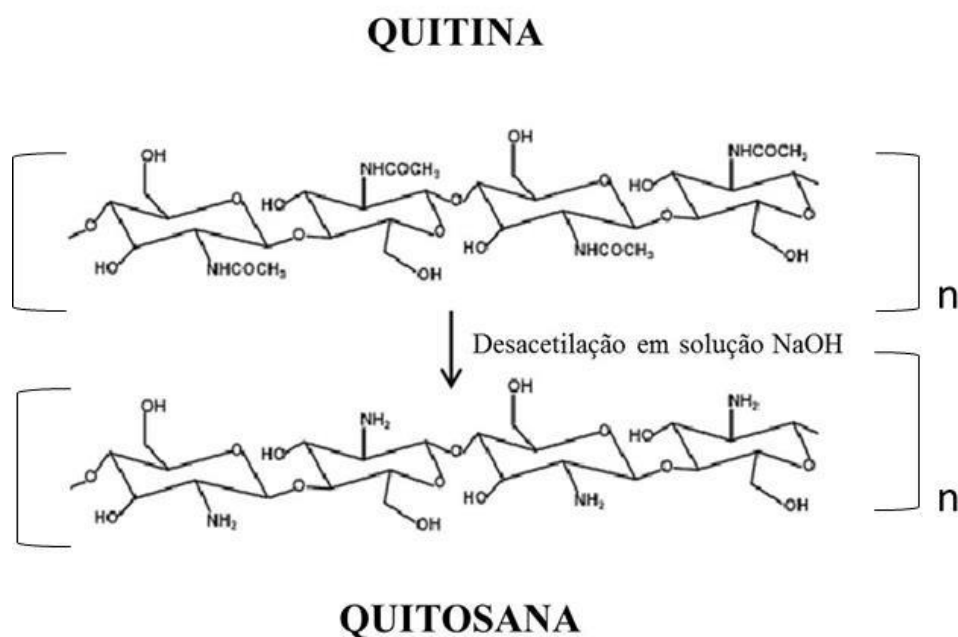


FIGURA 2.3: Estrutura da quitina após reação de desacetilação com hidróxido de sódio, transforma-se em quitosana (adaptado de ANITHA et al., 2014).

A quitosana possui alta solubilidade em pH ácidos que favorecerá a protonação dos grupos amino funcionais na posição do segundo carbono de resíduos de D-glucosamina que será convertido em um polication (PATIL et al.,

2015) e insolúvel em pH superior a 6,5 (DAMIAN et al., 2005), devido ao aumento de grupos NH_2 na estrutura (Figura 2.4). O grau de desacetilação e a massa molar influenciam na solubilidade da quitosana (SANTOS, 2006). Assim como RINAUDO (2006) existe uma relação entre a quantidade de ácido e a quantidade de quitosana a ser dissolvida. A concentração de íons hidrogênio necessária deve ser igual à concentração de unidades $-\text{NH}_2$ presentes na molécula de QS.

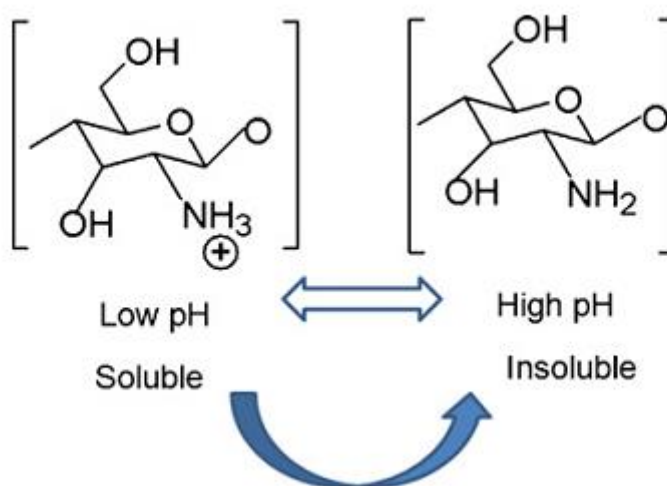


FIGURA 2.4: Apresenta a solubilidade da quitosana em pH maior ou menor que 6,5. Fonte: DASH et al., 2011.

A quitosana pode ser aplicada em diversos campos da ciência, podendo ser utilizada indústria alimentícia, na agricultura, no tratamento de águas e biomaterial. No processo de formação das nanopartículas, são obtidas por gelatinização ionotrópica, método considerado eficaz, simples, rápido, atóxico, livre de solventes orgânicos e não necessitando de equipamentos específicos para obtenção. O método baseia-se na capacidade dos polieletrólitos de se reticularem na presença de contra íons para formação de géis (PATIL et al., 2015). Os ânions formam estruturas tridimensionais em contato com os cátions em solução. A quitosana carregada positivamente interage com

dialdeídos como o glutaraldeído (XIONG et al., 2009) ou com ânions multivalentes como o tripolifosfato de sódio (LIU & GAO, 2009) e citrato (CHEN et al., 2008).

MOURA et al. (2009a) investigaram o efeito de nanopartículas de quitosana e TPP nas propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água em filmes de HPMC. KASPAR et al. (2013) relataram a utilização de micropartículas de quitosana com agente reticulante TPP obtidos via pulverização para possíveis aplicações em microencapsulação.

LIMA (2013) em seu trabalho desenvolveu nanopartículas de quitosana com TPP pelo método de gelatinização iônica, visando a nanoencapsulação de quercetina. MÜLLER (2013) avaliou a incorporação de óleo essencial de cravo em membranas de quitosana quanto a atividade cicatrizante e antimicrobiana.

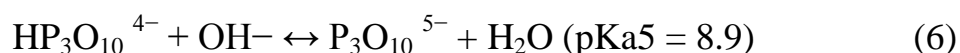
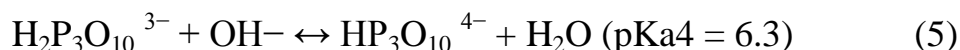
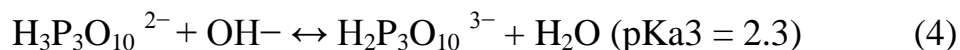
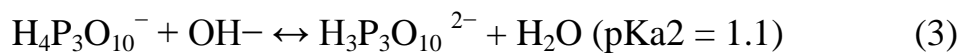
2.5 - Formação de Nanopartícula de Quitosana

A formação das NPQS ocorre, segundo descrito por CALVO et al. (1997), por interação de cargas opostas. A quitosana possui a capacidade de formar géis iônicos pelo processo de gelatinização ionotrópica, pois possui características catiônicas podendo interagir com um contra íon de múltipla valência. Em pH baixo os grupos amino da quitosana são protonados, o que possibilita uma reação com o agente de reticulação de carga oposta em solução. O TPP foi escolhido como agente de reticulação para a formação das NPQS por ser um composto atóxico, multivalente, além de permitir a formação de géis por interações iônicas. As interações podem ser controladas pela densidade de carga do TPP e da quitosana, que dependem do pH da suspensão (ZHAO et al., 2011). O uso de agentes reticulantes pode reduzir a mobilidade da estrutura do polímero e, em alguns casos, melhorar as propriedades mecânicas, e de barreira à água (BALAGUER et al., 2011), resistências ao calor e à luz e estabilidades dimensional e química, assim como reduzir sua solubilidade em água

(CARVALHO et al., 2004; MENZEL et al., 2013) e o intumescimento (BOANINI et al., 2010).

O mecanismo de formação consiste na adição de uma fase alcalina em uma fase ácida. A fase alcalina (TPP) é dissolvida em água (Equação 4.1) e a fase ácida (quitosana) é solubilizada em solução de ácido acético. A formação das NPQS se dá a partir de interações intermoleculares (Figura 5.1). Segundo LAUS et al. (2010), as interações ocorridas no processo de gelatinização iônica podem ser controladas pela densidade de carga do TPP e da quitosana, que varia com o pH da suspensão. O TPP pode ser dissolvido em água para se dissociar em -OH e íons trifosfatos, como mostrado nas equações a seguir:

Equação 4.1 : Dissociação do tripolifosfato de sódio em água.



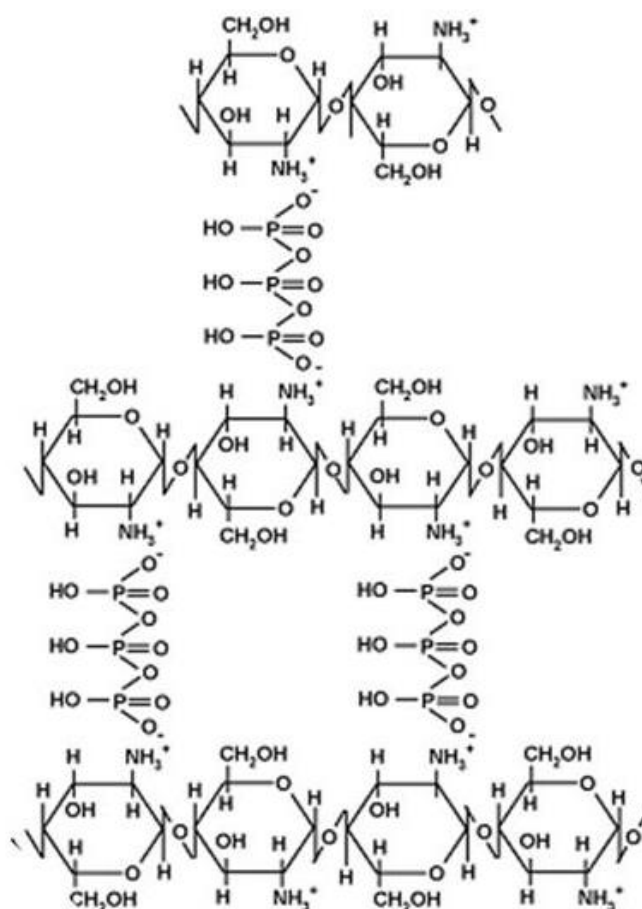


FIGURA 2.5: Esquema de representação das interações químicas formadas entre gelatinização ionotrópica. Adaptada KEAWCHAOON & YOKSAN, 2011.

2.6 – Carvacrol

A incorporação de agentes antimicrobianos em embalagem de alimentos vem crescendo nos últimos anos. Filmes com atividade antimicrobiana podem controlar o crescimento de patógenos e microorganismos (AZEREDO, 2009a). Segundo OJAGH et al. (2010) a incorporação de substâncias antimicrobianas em filmes pode ser considerada como embalagens ativas.

O carvacrol (Figura 2.5) é o composto majoritário do óleo essencial de orégano considerado uma substância GRAS, satisfazendo os requisitos de alimentos saudáveis e sem aditivos químicos (ESPITIA et al., 2014). O orégano (*Origanum vulgare*) pertence à família *Lamiaceae*, planta herbácea, perene, ereta, aromática e algumas vezes arroxeadas de 30-50 cm de altura (SANTURIO, 2011). O óleo essencial de orégano tem como compostos principais, o carvacrol e o seu isômero timol (ambos monoterpênicos fenólicos), são utilizados em baixas concentrações como ingrediente nutritivo, aromatizante e conservante.

Os óleos essenciais (OEs) são considerados misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas formadas de hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, éteres e compostos aromáticos. A composição química depende de vários fatores, tanto como os climáticos, ação de predadores, idade da planta, etc. (Gobbo Neto & Lopes, 2007). A utilização dos OEs tem sido apresentada como uma forma da indústria de alimentos em promover maior conservação e aumento da vida útil produtos, podendo inibir o crescimento de patógenos indesejáveis dos alimentos (TRAJANO et al., 2009). Os OEs são incorporados em matrizes poliméricas devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas, que incluem efeitos bactericidas, antifúngicos, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórios e anticancerígenos (SUNTRES et al., 2013).

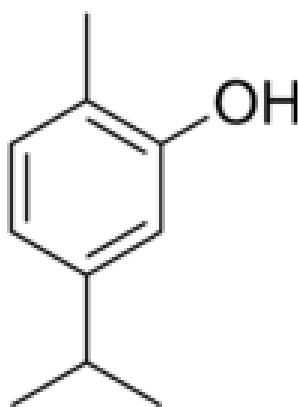


FIGURA 2.6 - Estrutura química do carvacrol

MOREIRA et al. (2005) investigaram os parâmetros da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de eucaliptos, árvore de chá, alecrim, menta, rosa moschata, cravo, limão, orégano, pinheiro e manjerição doce sobre o crescimento de diferentes cepas de *Escherichia coli*.

GUARDA et al. (2011) utilizaram microcápsulas contendo carvacrol e o timol incorporados em filmes para aplicação em embalagens de peixe fresco refrigerado e em carnes. DU et al. (2012) avaliaram o efeito da adição de carvacrol em filmes a base de maçã e tomate, e também a incorporação de cinamaldeído em filmes a base de maçã para aplicação frango assado.

Moura et al. (2014) produziram filmes de pectina com nanoemulsão de óleo essencial de canela para reforçar mecanicamente a matriz de polissacarídeos. Severino et al. 2015 produziram revestimento de quitosana modificado, contendo nanoemulsão de óleos essenciais em feijão verde, resultando em efeitos antimicrobianos.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas de quitosana (NPQS) e incorporá-las em filmes de pectina (PEC) com carvacrol (CRV), de forma a investigar as propriedades mecânicas, térmicas, de barreira ao vapor de água e antimicrobianas. Os objetivos específicos são:

- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de quitosana (NPQS);
- Desenvolver e otimizar a preparação de nanocompósitos de pectina (PEC), NPQS e carvacrol;
- Investigar o processo de obtenção de filmes por *casting* batelada.
- Avaliar o desempenho dos filmes quanto as suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, térmicas e investigar a correlação preparação-morfologia-propriedades.
- Analisar as propriedades antimicrobianas da quitosana, NPQS, nanocompósitos incorporados com carvacrol.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Material

Quitosana ($M_w = 71,3$ kDa, grau de desacetilação = 94%) foi fornecida pela Polymar (Fortaleza, Brasil). Carvacrol, tripolifosfato de sódio (TPP) e ácido acético foram adquiridos da Sigma Aldrich Ltda (São Paulo, Brasil). Pectina de baixo grau de metoxilação (GM < 50%, and M_w 170.000 g/mol) com teor de poli ácido galacturônico de 84% foi doada pela CP Kelco Ltda. (Limeira, Brasil). Tween 80 e DMSO foram adquiridos pela LabSynth (Diadema-SP, Brasil). Caldo Mueller Hinton e Agar foram comprados da Himedia Laboratories (Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai, India). O corante cloreto de trifetil tetrazolio e estreptomicina foram obtidos da Sigma Aldrich.

4.2- Métodos

4.2.1 - Síntese das Nanopartículas de Quitosana

As nanopartículas de quitosana (NPQS) com TPP foram obtidas de acordo com o método descrito primeiramente por CALVO et al. (1997). Na primeira etapa foram produzidas uma fase aquosa e uma fase orgânica. Preparou-se uma suspensão de quitosana 0,1% (m/v) sob agitação numa solução aquosa de ácido acético 0,2% (m/m) em relação à massa de quitosana a temperatura ambiente (25 ° C) durante a noite. A suspensão de quitosana após total dissolução apresentou-se sob um aspecto claro, transparente e sem a presença de grumos. A concentração de TPP foi mantida constante 0,5% (m/v) dissolvida em água deionizada. As NPQS foram produzidas adicionando-se 28 mL da solução de TPP em 70 mL da suspensão de quitosana sob agitação

mecânica de 2500 rpm e taxa de adição constante de 1 mL/min por aproximadamente 30 min à temperatura ambiente. A Figura 4.1 apresenta a suspensão de NPQS.



FIGURA 4.1: Suspensão coloidal de nanopartículas de quitosana.

4.2.2 - Caracterização das Nanopartículas de Quitosana

4.2.2.1 - Tamanho médio e Potencial Zeta

O tamanho médio e o índice de polidispersividade das NPQS foram determinados em aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., Irvine, Calif., E.U.A.), o qual utiliza o princípio da difração do raio laser, o detector está posicionado em um ângulo fixo de 173° em relação ao ângulo de incidência. Para as medidas de tamanho médio e índice de polidispersividade (IPd) as amostras foram submetidas a um banho ultrassônico (Ultracleaner 1400 – Unique, Brasil) por 30 minutos para melhor dispersão. Três gotas de cada suspensão de NPQS foram diluídas em 3 mL de água deionizada, e as medidas foram realizadas em triplicata a 25°C . Foi investigado o efeito do pH no tamanho médio e IPd das NPQS, que variou de 1,5 a 12. O potencial Zeta (ζ) foi

medido utilizando o mesmo equipamento para medir tamanho médio das NPQS, alterando apenas a configuração do equipamento do modo size para o modo Zeta. Os dados foram coletados a 25° C.

4.2.2.2 – Estudo da interação pectina-nanopartícula de quitosana com a variação do pH

A estabilidade das NPQS com o aumento do pH foi estudada aumentando-se gradualmente o pH com soluções de NaOH 1M ou diminuindo-se o pH com HCl 1M, e analisando o tamanho e o potencial Zeta das NPQS e o potencial Zeta da PEC. O pH ideal para formulação dos nanocompósitos, onde houvesse a melhor interação entre os polímeros foi avaliado pela medida do potencial Zeta das cargas das soluções de pectina e quitosana 1:1 em diferentes valores de pH. Foi utilizado um pHmetro (ANALION, Ribeirão Preto, Brasil) e o tamanho baseado em intensidade e o potencial Zeta foram medidos conforme descrito anteriormente.

4.2.2.3 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Para as análises de espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) foi utilizado um equipamento Paragon 1000 Perkin-Elmer Spectrum (Perkin-Elmer Life and Analytical Science, Inc., Waltham, MA E.U.A.). As amostras foram preparadas das suspensões de NPQS secas, e $1,0 \pm 0,1$ mg de amostra foi macerada com $100,0 \pm 0,1$ mg de brometo de potássio (KBr). A mistura foi prensada em forma de pastilha para as análises, que foram feitas com variação no número de onda de 4000 até 400 cm^{-1} , com resolução de $2,0\text{ cm}^{-1}$ e 128 scans.

4.2.2.4 – Microscopia Eletrônica de Varredura com fonte de emissão de campo

As análises foram realizadas em microscópios eletrônicos de varredura Carl Zeiss (Alemanha) modelo Supra 35-VP e Philips XL 30 FEG. Para as análises das NPQS, foram preparadas as amostras diluindo as suspensões coloidais das NPQS e estas depositadas em placa de silício e fixadas em stubs com fita carbono, de modo a estudar a morfologia das NPs.

4.2.2.5 – Termogravimetria

As análises foram realizadas no aparelho TGA Q-500 (TA Instruments, Inc, NC, E.U.A). Colocou-se aproximadamente 6-8 mg de amostra na panela de platina. Os experimentos foram programados com rampa de aquecimento de 25 até 700 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min para cada amostra. A vazão de ar sintético foi de 60 mL/min, a fim de verificar a degradação dos biopolímeros e bem como avaliar a estabilidade térmica dos materiais desenvolvidos neste trabalho.

4.2.2.6 – Calorimetria Exploratória Diferencial

Todas as medidas de DSC foram realizadas em um equipamento de DSC Q100 (TA Instruments, Inc, NC, E.U.A). Pesou-se cerca de 5-6 mg de NPQS secas em porta amostra de alumínio, os quais foram selados e alocados no equipamento. A programação utilizada para todas as análises foi: rampa de aquecimento de -50 até 300 °C; razão de 10 ° C/min sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL·min⁻¹.

4.2.2.7 – Concentração Mínima Inibitória

A atividade antimicrobiana das amostras foi avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Para tanto, empregou-se o método de microdiluição de caldo padrão (M7) - CIM, de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). Resumidamente, culturas de 3 regiões diferentes a $1,0 \times 10^6$ UFC / mL foram inoculadas em 10 mL de caldo Müller Hinton adicionado em diluições seriadas de NPQS, quitosana solubilizada em ácido acético e carvacrol puro diluído em DMSO (5% (v / v)) e Tween 80 (5% (v / v)). O solvente isolado, DMSO e Tween 80, foram analisados para verificar qualquer efeito no crescimento microbiano. As concentrações iniciais foram estimadas por ensaios de CIM anteriores.

As culturas foram incubadas a 37 °C durante 24 h até atingir a turvação. Foi adicionado cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) a 0,1% a cada poço da microplaca para indicar o crescimento bacteriano no teste CIM. Para padronizar a densidade do inóculo, empregou-se uma amostra controle baseada em BaSO₄ com uma turbidez equivalente a uma solução padrão de McFarland 0,5. A densidade foi ajustada medindo a absorbância a 625 nm utilizando um espectrômetro de absorção UV-Vis (Perkinelmer, EUA). As concentrações mais baixas sem alteração visível de cor (assumidas como livres de crescimento bacteriano) foram definidas como CIMs. Após o teste CIM, o CBM foi realizado em Agar Muller Hinton os poços nos quais não se observou crescimento bacteriano visível. O agente antimicrobiano foi incorporado no meio Agar, em que cada placa continha uma concentração diferente do agente. O ponto final de CBM foi assumido como a concentração mais baixa das amostras onde não foi observado crescimento bacteriano visível nas placas de ágar.

4.2.3 - Preparo e Caracterização dos Nanocompósitos de Pectina

Para posteriores análises dos efeitos da adição de nanoestruturas à matriz de pectina, primeiramente, produziram-se filmes de pectina solubilizados em água, com concentrações diferentes de PEC (2% e 5%) em relação ao volume de água, denominados filmes controles. Os filmes foram produzidos por *casting* contínuo e *casting* descontínuo (batelada), para comparação de ambos os métodos. Os filmes de PEC 2% foram produzidos apenas por *casting* descontínuo, devido a menor viscosidade da solução em relação à solução filmogênica de pectina 5%, o que não é considerado apropriado para obtenção pelo método de *casting* contínuo.

TABELA 4-1: Formulações dos filmes de pectina

Abreviação do filme	Concentração de pectina (m/v)	Método de obtenção
PEC 5%	5%	<i>Casting</i> Contínuo
PEC 5%	5%	<i>Casting</i> descontínuo
PEC 2%	2%	<i>Casting</i> descontínuo

4.2.3.1 - Produção dos Filmes de Pectina Controle

Inicialmente, produziu-se 400 g de solução controle de PEC 5% e PEC 2% (m/v) em relação ao volume de água. A homogeneização e a remoção de bolhas das suspensões foram realizadas em um misturador a vácuo sob agitação mecânica de 2000 rpm por 3 horas. Esta foi armazenada em geladeira por 12 horas para degasagem e posterior preparação dos filmes.

4.2.3.2 - Produção dos Nanocompósitos de Pectina e Nanopartícula de Quitosana

Para a solução dos nanocompósitos PEC_NPQS, primeiramente colocaram-se as suspensões de NPQS em banho ultrassônico (Ultracleaner 1400 – Unique, Brasil) por 30 minutos para melhor dispersão e posterior adição na solução filmogênica de pectina e homogeneizou-se por 3 horas sob agitação mecânica de 2000 rpm e vácuo de 600 mmHg. As suspensões de nanoestruturas foram utilizadas nas concentrações mássicas de 1, 1,5 e 2 % em relação à massa de PEC. Estas dispersões filmogênicas foram acondicionadas em geladeira por 12 horas para degasagem e posteriormente utilizadas para produção dos filmes.

4.2.3.3 - Produção dos Nanocompósitos de Pectina, Nanopartículas de Quitosana e Carvacrol

Para o preparo dos nanocompósitos com o carvacrol, primeiramente produziu-se dispersão filmogênica de PEC com NPQS (PEC_NPQS), como descrito no item 4.2.3.2. Após a remoção de possíveis bolhas, adicionou-se 10% (m/m) de carvacrol em relação à massa de PEC, sob agitação de 500 rpm, por 1 hora, até a completa dispersão do carvacrol na solução de PEC_NPQS.

4.2.4 - Métodos de Obtenção dos Filmes

4.2.4.1 - *Casting* descontínuo (batelada)

Preparou-se 200 g de solução de pectina 2 e 5 % e dos nanocompósitos de PEC2%_NPQS e PEC5%_NPQS com e sem adição de carvacrol. As suspensões foram colocadas sobre um substrato de poliéster (Mylar, Dupont Teijin Films U.S. Ltd., EUA), sobre superfície plana, e as

espessuras das camadas filmogênicas foram ajustadas com uma barra de nível (abertura: 0,2 mm). As suspensões foram mantidas a temperatura ambiente por 36 horas. Os filmes secos retirados do substrato e mantidos em sacos plásticos.



FIGURA 4.1: Filme seco de PEC 2 % produzido por *casting* (descontínuo).

4.2.4.2 - *Casting* contínuo

Preparou-se 400g de solução filmogênica de pectina 5% e nanocompósitos de PEC5%_NPQS2%. Os filmes foram obtidos em sistema contínuo de laminação KTF-S-B (Werner Mathis AG, Suíça). A temperatura de secagem em forno convectivo foi de 100 °C e a espessura da lâmina úmida padronizada para 1,5mm. As suspensões filmogênicas foram processadas a uma velocidade de 0,13 m min⁻¹ que resultaram em filmes finos em 20 minutos. O filme seco foi destacado do substrato e estocado para posteriores análises. A Figura 4.3 ilustra a formulação por *casting* contínuo.

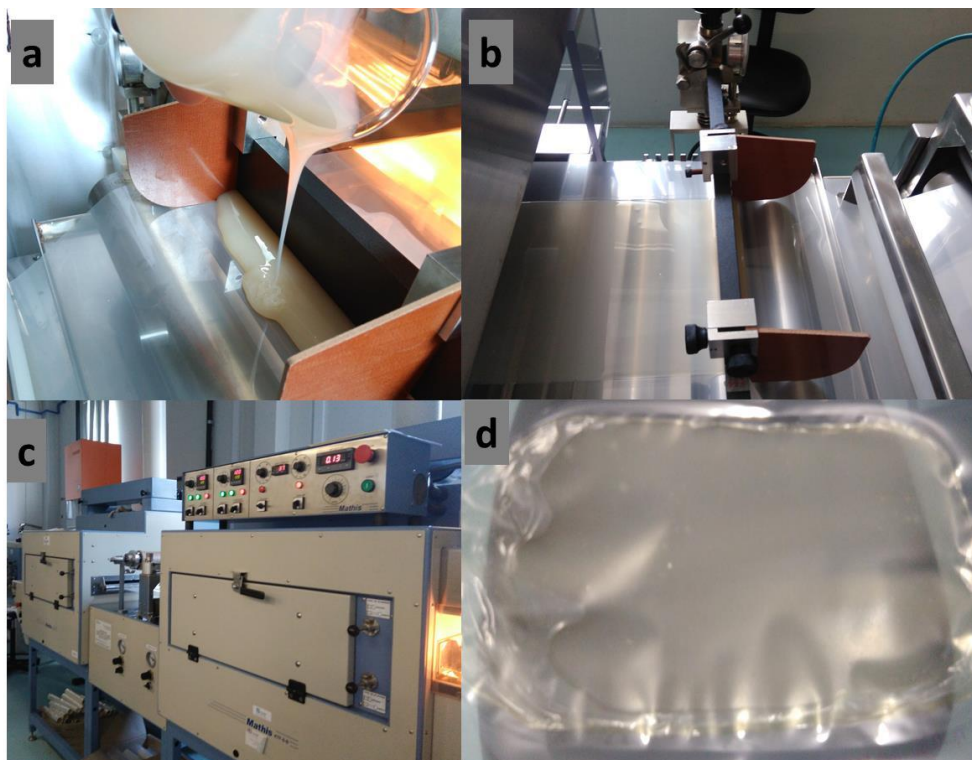


FIGURA 4.3: Representa a formulação por *casting* contínuo. A) solução filmogênica vertida em esteira transportadora, b) espatulada, c) estágio de pré-secagem com radiação infravermelha e câmeras de secagem a 100 °C e d) filme seco.

4.2.5 - Caracterização dos Nanocompósitos de Pectina

4.2.5.1 – Propriedades Físicas

4.2.5.1.1 – Determinação da espessura dos filmes

As medidas das espessuras dos filmes foram realizadas utilizando um micrômetro digital (Mitutoyo Manufacturing, Tóquio, Japão) com a aproximação de 0,001 mm em cinco posições aleatórias ao redor dos filmes secos. Os valores obtidos foram utilizados para calcular as propriedades mecânicas e os valores de permeabilidade ao vapor de água.

4.2.5.1.2 – Ângulo de Contato

O fenômeno de molhabilidade de superfície dos filmes de PEC foi investigado em um goniômetro óptico (CAM 101, KSV Instruments, EUA) equipado com uma câmera digital CCD KSV-5000. Para cada medida padronizou-se 5,0 µL de água destilada na superfície do filme e 60 imagens foram gravadas automaticamente em um tempo experimental de 60 segundos. Usou-se o software KSV CAM2008. As determinações do ângulo de contato foram realizadas em 5 pontos dos filmes como descrito na ASTM D5725-99. O ângulo de contato foi calculado pela média aritmética dos ângulos determinados nas extremidades direita e esquerda da gota.

4.2.5.2 – Morfologia dos Filmes

4.2.5.2.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura com fonte de emissão de campo

As análises de fratura criogênica e superfície dos filmes foram realizadas em microscópios eletrônicos de varredura Carl Zeiss (Alemanha) modelo Supra 35-VP e Philips XL 30 FEG. As amostras dos filmes, para análise de sessão transversal, foram fraturadas em nitrogênio líquido, fixadas em stubs e recobertas com fita condutora de carbono (Ted Pella Inc., Redding, CA, U.S.A.) e recobertas pelo método de Evaporação de Carbono pelo equipamento Sputter Coater SCD050 (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Germany).

4.2.5.2 – Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier - Refletância total atenuada (FTIR-ATR)

Para as análises de FTIR com modo ATR (da sigla em inglês *Attenuated Total Reflectance*) com cristal de diamante operando em modo de refletância foi utilizado um equipamento Vertex 70 (Bruker, EUA), com variação do número de onda de 4000 até 400 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} e 128 scans.

4.2.5.3 – Propriedade de Barreira

4.2.5.3.1 – Permeabilidade ao Vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada por meio do método gravimétrico segundo método ASTM E96-00 modificado por MCHUGH et al., 1993. Cada filme foi cortado em cinco corpos de prova circulares. Foram utilizadas células de permeação com 49 mm de diâmetro e 13,2 mm de altura (Figura 4.4) contendo 6 mL de água destilada, mantendo um espaço livre na célula de aproximadamente 10 mm de altura.



FIGURA 4.4: Célula de permeação

Os filmes em formato de disco foram selados no topo das células, as quais foram colocadas em estufa com circulação de ar, contendo sílica gel previamente seca a 105 °C por 24 horas. As células foram mantidas a 30 ± 1 °C e $30 \pm 3\%$ UR durante aproximadamente 24 horas e pesadas 8 vezes ao longo do tempo, com intervalos de no mínimo, 1 hora. A perda de massa foi plotada em função do tempo. PVA foi definida como sendo:

$$PVA = \frac{g.e}{A.t.\Delta P}$$

Em que PVA é a permeabilidade ao vapor de água (g. mm/m².h.kPa), g é o ganho de peso dos filmes; t é o tempo total em horas; A é a área de permeação (m²); e espessura média dos filmes (mm); ΔP é a diferença de pressão de vapor do ambiente (kPa, 30 °C); g/t foi calculada por regressão linear entre os pontos de ganho de peso e tempo (regime permanente). Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento.

4.2.5.4 – Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas com base na concentração das NPQS nos filmes de pectina. Os filmes secos foram cortados em tiras retangulares de 6,32 mm de largura e 12,89 mm de comprimento (L_0) em Análise Dinâmico-Mecânica (modelo Q800-TA Instruments, Inc, NC, E.U.A), com velocidade de separação das garras de 0,1% / min até 50%. Quinze amostras de cada tipo de filme foram acondicionadas em um dessecador a 50% de umidade durante 48 h utilizando uma solução saturada de nitrato de magnésio hexa-hidratado à temperatura ambiente, para equilibrar a umidade em 50%, antes das medições. Os valores de força obtidos, bem como o valor máximo foram divididos pela área da secção transversal inicial para determinar a

resistência à tração (σ). A elongação na ruptura (ϵ_r) quantifica quanto o filme pode deformar antes de romper. O módulo elástico foi calculado a partir do módulo secante, devido a não linearidade das curvas tensão x deformação, esta é uma medida da elasticidade do filme refletindo quanta tensão pode ser aplicada antes da deformação plástica. A seguir estão as equações de Tensão (σ) e Elongação (ϵ_r):

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \qquad \epsilon_R = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100$$

4.2.5.5 – Propriedades Térmicas

4.2.5.5.1 – Termogravimetria

As análises foram realizadas em um aparelho TGA Q-500 (TA Instruments, Inc, NC, E.U.A). Colocou-se aproximadamente 6-7mg das amostras no porta amostras de platina. As curvas termogravimétrica (TG) e TG derivada (DTG) foram obtidas a partir da análise com rampa de aquecimento de 20 até 700 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min para cada amostra sob atmosfera de ar sintético com vazão de 60 mL/min.

4.2.5.5.2 – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Todas as medidas de DSC foram realizadas em um equipamento de DSC Q100 (TA Instruments, Inc, NC, E.U.A). Os filmes foram cortados em formatos circulares (5 ± 1 mm de diâmetro) e pesou-se cerca de 6 mg de filme em porta amostra de alumínio, os quais foram selados e alocados no equipamento. A programação utilizada para todas as análises foi de uma corrida

com rampa de aquecimento de -50 até 300°C; taxa de 10 °C·min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL·min⁻¹.

4.2.5.6 - Análise de halo de inibição para determinação da atividade antimicrobiana

As propriedades antimicrobianas dos filmes de pectina com e sem carvacrol foram avaliadas pelo método de disco de difusão amplamente utilizado (Hema, Ng, & Amirul, 2012; Heydari, Alemzadeh, & Vossoughi, 2013; Maizura, Fazilah, Norziah, & Karim, 2007). Amostras de filme foram cortadas em discos de 2 cm de diâmetro e esterilizado sob luz ultravioleta. Foram utilizadas a bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e a bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*). O inóculo foi preparado suspendendo-se as culturas em 10 mL de Muller Hinton Broth com aproximadamente 1,0 x 10⁶ UFC / mL. As suspensões resultantes foram espalhadas usando uma alça de Drigalski esterilizada em toda a superfície das placas de Petri contendo Agar Mueller Hinton garantindo assim uma distribuição uniforme do inoculado. As amostras dos filmes foram colocadas na superfície da placa de agar inoculada com ajuda de uma pinça estéril e suavemente pressionado para garantir contato total com a superfície. As placas de Petri com as amostras foram então incubadas a 37 ° C durante 24 h, depois a zona onde o filme foi colocado e seus arredores foram cuidadosamente observados. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

4.2.5.7 – Análise Estatística

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias, adotando-se o nível de significância de 5% (p = 0,05) além de análise de correlação e de regressão.

Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico Statistic versão 10 (StatSoft.Inc., 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Caracterizações das Nanopartículas de Quitosana

5.1.1 - Tamanho médio e Potencial Zeta (ζ)

A Tabela 5.1 apresenta os valores dos tamanhos médios, do índice de polidispersividade (IPd) e dos valores de potencial Zeta de três diferentes sínteses de NPQS. Para possíveis comparações dos filmes de pectina produzidos, avaliou-se a reprodutibilidade e repetibilidade das sínteses de NPQS.

TABELA 5.1: Valores do tamanho médio, potencial Zeta e índice de polidispersividade (IPd) das NPQS.

Amostras triplicatas	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	Polidispersividade (IPd)
NPQS ¹	95 ± 27 ^a	+ 41 ± 0,9 ^a	0,5 ± 0,1 ^a
NPQS ²	107 ± 20 ^a	+ 40 ± 1,2 ^a	0,5 ± 0,1 ^a
NPQS ³	117 ± 47 ^a	+ 39 ± 1,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^a

^a indica a significância do desvio padrão nas medidas. Mesma letra sobrescrita numa mesma coluna indica valores que não são diferentes ($p < 0,05$).

As NPQS formadas com proporção mássica de 2:1 (QS:TPP) apresentaram tamanho médio de 106 ± 31 nm nas três repetições, as quais foram iguais ($p < 0,05$). O índice de polidispersividade é usado para medir a

distribuição de tamanhos de partículas e possui um impacto determinante nas propriedades físico-químicas do produto final (MORRIS et al., 2011). A distribuição de tamanho para as NPQS é mostrada na Figura 5.2. O intervalo das triplicatas foi de 68 a 122 nm com uma distribuição unimodal. A partir dos valores constantes de diâmetro médio (de 95 a 117), desvio médio ($\pm 31,3$) e IPd em todas as NPQS sugerem que tal síntese possui caráter repetitivo.

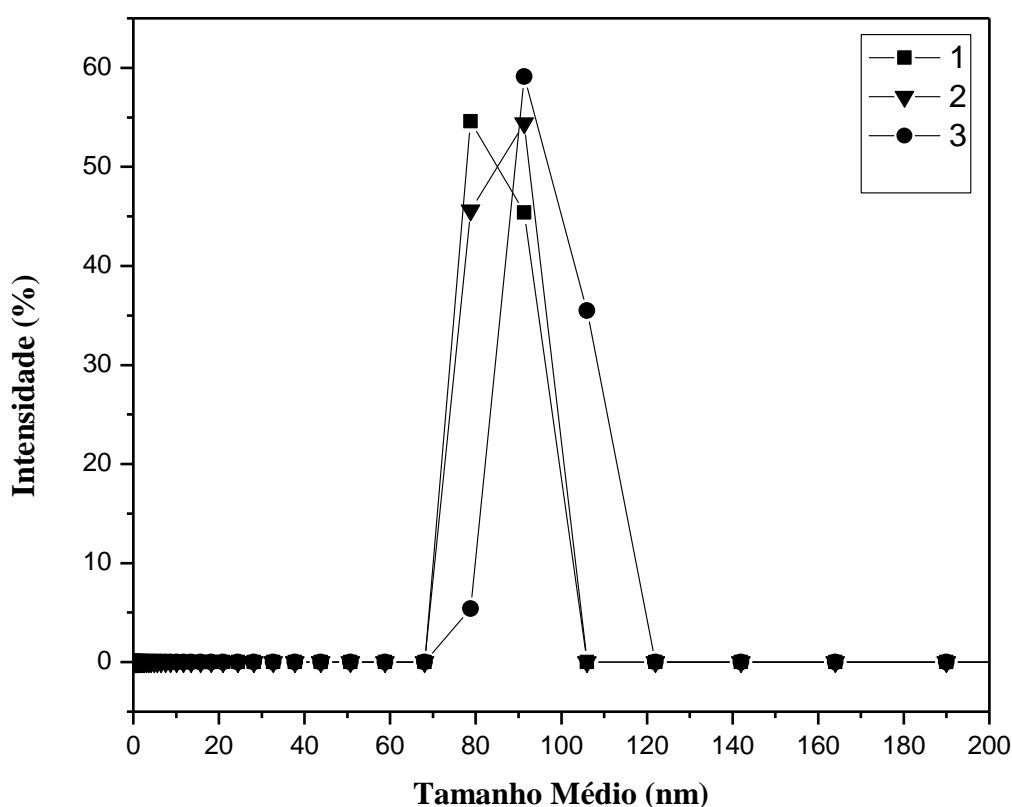


FIGURA 5.1: Distribuição do tamanho das nanopartículas de quitosana (NPQS).

Estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura. LOREVICE et al. (2014) obtiveram tamanhos médios das NPQS abaixo de 250 nm e concluíram que as NPs de tamanhos menores que 150 nm melhoraram de maneira satisfatória as propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água dos filmes à base de polissacarídeos. MOURA (2009), em seu trabalho mostraram a dependência do tamanho médio das NPQS com a variação da concentração de quitosana utilizada por dois métodos de preparação e a variação do pH da suspensão. HOSSEINI et al. (2013) obtiveram os tamanho das NPQS

próximos a 280 nm. A formação das NPQS foi verificada pela característica opalescente da suspensão e confirmada pelos espectros de FT-IR das NPQS em comparação com a quitosana pura.

Informações sobre a estabilidade das suspensões coloidais das NPQS podem ser obtidas pelo monitoramento do pH em função do tempo. Segundo SCHAFFAZICK et al. (2006) a alteração do pH pode ser um indicativo da degradação do polímero. Outra observação relevante é a adição de NPQS em matrizes de pectina, devido ao pka da pectina ser ácido ($pka = 3,0$ a $3,6$) o que poderia afetar os tamanhos das NPQS. Na Figura 5.3 é possível observar os efeitos no tamanho das NPQS em decorrência da dependência do pH. A partir da variação do pH da suspensão coloidal das NPQS, observaram-se alterações no tamanho médio das NPs em função do pH a temperatura ambiente.

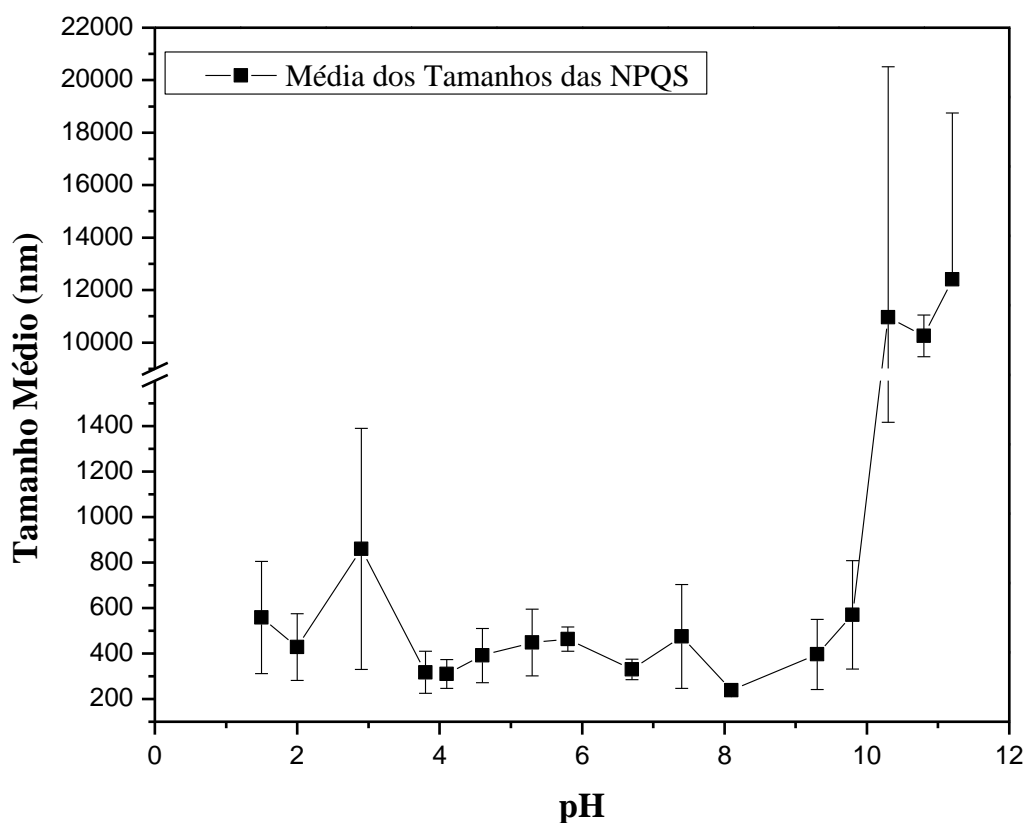


FIGURA 5.2: Tamanho médio das nanopartículas de quitosana em função do pH.

Observou-se que mudanças no pH podem afetar as propriedades físico-químicas, tais como tamanho de partícula, a intensidade da carga de superfície e a tendência de agregação das partículas (BAO et al., 2008).

O pH de síntese das NPQS encontrou-se próximo a 3,8. Para valores de pH mais altos (a partir de 9,8) observou-se um aumento do tamanho médio das NPQS de 317 para 570 nm. Notou-se uma agregação das partículas, uma vez que o valor do IPd aumentou ligeiramente à medida que o pH da suspensão tornou-se alcalino. Este incremento do tamanho pode ser explicado devido ao efeito de intumescimento da quitosana que, por ser um polieletrólito (que apresenta uma fração significativa de cargas na cadeia principal do polímero, sendo catiônica), aumenta seu tamanho com o grau de ionização, devido às repulsões eletrostáticas inter- e intra-moleculares existentes nos grupos ionizáveis.

Outra interpretação para o aumento é à medida que o pH se torna básico as moléculas de quitosana tornam-se insolúveis, podendo ocorrer a precipitação das NPQS e o aumento no tamanho. As cadeias começam a expandir-se em função da repulsão eletrostática gerada pela mudança do grau de ionização dos grupos carboxilas resultando na dissolução e aumento da cadeia do polímero. Com a diminuição do pH, o tamanho das NPQS e a viscosidade da suspensão aumentam. A quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico moderadamente básico ($pK_a = 6,3$) formando sais com ácidos, aumentando assim seu tamanho.

O sinal positivo do potencial Zeta das nanoestruturas vem sendo relacionado aos grupos amino (NH_3^+) que compõem a superfície das NPQS. Muitas substâncias quando entram em contato com um solvente polar (neste caso a água), adquirem cargas elétricas superficiais. Estas cargas possuem origem na formação de uma bicamada de íons em sua superfície devido a uma adsorção seletiva de íons do eletrólito, ou à ionização de suas moléculas

superficiais (LIMA et al., 2008). Contudo, no caso da quitosana, além das cargas positivas que a água pode gerar, o ácido acético promove uma maior protonação das NPQS. Valores, em módulo, maiores que 30 mV, indicam suspensões estáveis (VIMAL et al., 2012), o que sugere que as partículas eletricamente carregadas se repelem, evitando a agregação. Os valores de potencial Zeta das NPQS estão próximos de +40 mV, sugerindo suspensões coloidais estáveis e, evitando assim, a aglomeração entre elas. Isto pode permitir uma melhor dispersão das NPQS em matrizes de pectina. O potencial Zeta leva em conta a carga superficial da partícula e pode ser afetado pelo pH ou pela força iônica do meio, permitindo avaliar a estabilidade das suspensões coloidais.

5.1.2 - Estudo da interação pectina-nanopartículas de quitosana com a variação do pH

Esta caracterização objetivou o entendimento do efeito do pH sobre a síntese das NPQS e as interações destas com a pectina, assim como tentar elucidar as propriedades dos nanocompósitos PEC_NPQS.

As principais interações entre a matriz e o agente de reforço são as interações eletrostáticas entre os grupos amino ionizados (NH_3^+) da quitosana e os grupos carboxila ionizados (COO^-) da pectina (COIMBRA et al., 2011). Outras interações que podem ocorrer simultaneamente são as ligações de hidrogênio, interação dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas (IL'INA e VARLAMOV, 2005; LUO e WANG, 2014). A Figura 5.4 exibe a dependência dos valores de potencial Zeta com a variação no pH, resultando em mudança na densidade de carga das partículas.

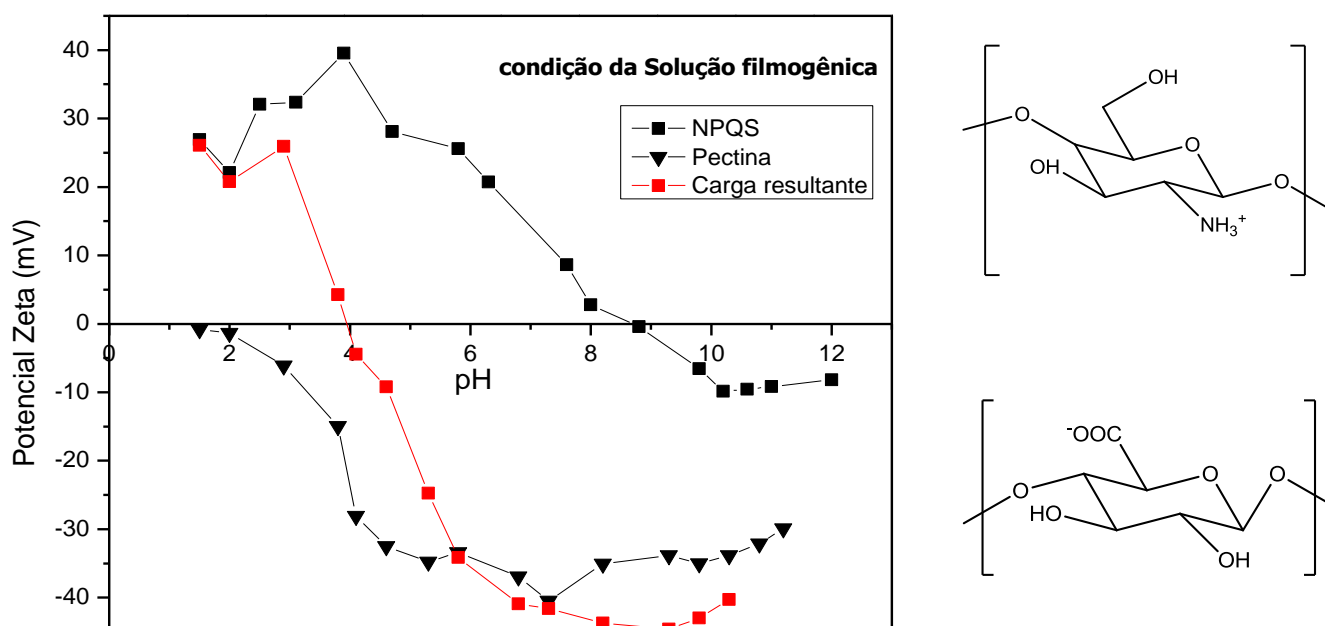


FIGURA 5.3: Dependência do potencial Zeta com a variação de pH das suspensões de nanopartículas de quitosana (NPQS) (0,1%, m/m) e pectina (PEC) (0,1%, m/m) em valores de pH variando de 1,5 a 11.

O potencial Zeta positivo e negativo são devidos às características catiônicas e aniônicas dos polímeros, quitosana e pectina, em pH inicial próximo a 3,8. No pH inicial (pH = 3,8), para as NPQS, o potencial Zeta está por volta de + 33 mV e para pectina (pH = 3,6) em - 28 mV. Estas suspensões foram analisadas separadamente na mesma concentração de 0,1% (m/m), e manteve-se o cuidado de adicionar volumes conhecidos de HCl e NaOH, de modo a, não variar a concentração inicial das suspensões. De acordo com a Figura 5.4, podemos analisar que ao aumentar o pH de 2,9 para 5,8 o potencial Zeta das NPQS diminuiu de + 32 mV para + 20,7 mV. Segundo VAARUM e SMIDSROD (2005), este valor de pH está próximo ao pKa da quitosana (6,2 - 7,0). Em pH abaixo dos valores de pKa, os grupos amino da quitosana estão protonados, o que confere característica catiônica à molécula. Com o aumento do pH para valores próximos de 8,2, os dados demonstraram uma diminuição do

potencial Zeta, tornando o valor da carga superficial das NPQS negativo. Esse fato pode ser atribuído à desprotonação da quitosana com a diminuição do grupo NH_3^+ e aumento de grupos NH_2 . Uma vez que o teor de grupamentos NH_3^+ diminui a carga superficial das NPs, sugere-se um aumento das cargas superficiais do TPP.

MOURA (2009), demonstrou que o potencial Zeta das NPQS com ácido PMMA tornou-se negativo em pH maiores que 4,6. Os valores obtidos para estas nanoestruturas variam entre + 33 mV (pH = 3,8) e - 8,1 mV (pH = 11,2). Estes resultados estão em concordância com aqueles reportados por YIN et al. (2017), que mostram que em pH acima de 9,0 os grupos carboxílicos na superfície das nanopartículas de carboximetil-quitosana (PICMCS) com ácido itacônico ($\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_4$) foram completamente dissociados e as NPs apresentaram carga de superficial negativa.

Já o pH alcalino para ambas as suspensões proporcionou menor ionização dos grupos amino da quitosana (NH_3^+) e maior ionização dos grupos carboxila da pectina (COO^-) deixando o potencial mais negativo (MACIEL et al., 2015). O ponto isoelétrico, onde a suspensão se torna instável, foi encontrado em pH próximo de 9,0 e 1,5 para quitosana e pectina, respectivamente. Neste ponto ocorre a mínima força de repulsão e atração entre as moléculas do polímero e as do solvente, de modo que a força gravitacional seja maior neste ponto levando à agregação das NPQS (GONZALEZ-MIRA et al., 2010).

Para valores de potencial Zeta da solução de pectina em pH ácidos, se aproximou de zero, o que, segundo GIANCONE et al. (2009), pode ser interpretado devido à não-dissociação dos grupos carboxílicos da estrutura do polímero. Com o aumento do pH de 3,0 para 5,3 o potencial Zeta da pectina se tornou mais negativo devido aos baixos valores de pKa (3,5 - 4,5) (ROLIN, 2002) que é determinado pela presença de ácido galacturônico da molécula de pectina, que esta carregada negativamente em uma ampla faixa de pH. Este

incremento no valor do potencial Zeta negativo da solução de pectina é decorrente a diminuição de íons H^+ , de modo que o equilíbrio da solução desloca-se no sentido de formação de íons carboxílicos resultando em aumento no valor de potencial Zeta. Em meio básico, os grupos carboxílicos na superfície da PEC apresentaram uma tendência aparentemente ionizada de $COOH$ para COO^- apresentando alta carga de superfície negativa.

A partir dos dados acima a interação entre os polímeros foi observada pelas cargas opostas dos mesmos em diferentes valores de pH favorecendo a complexação da pectina com as NPQS. Para melhor formulação dos filmes o pH ideal ocorreu com maior intensidade na faixa de pH entre 3,8 a 4,7 onde a resultante de carga das soluções esteve próxima a zero, indicado pela inversão de cargas da solução de ambos os polímeros. Isto significa que na região onde se encontram as NPQS, os grupos protonados (NH_3^+) estão interagindo por ligação de hidrogênio com os grupos aniônicos da matriz de PEC. A fim de manter uma boa estabilidade da suspensão coloidal, soluções filmogênicas foram preparadas em pH 4,0. A partir destes resultados podemos tentar correlacionar à estrutura – propriedades dos nanocompósitos.

5.1.3 - Espectroscopia de Infravermelho

A análise de espectroscopia foi importante para avaliar as interações e os grupos funcionais presentes em um determinado composto, além de permitir a caracterização estrutural e a composição química dos materiais utilizados neste trabalho. Por meio dos resultados obtidos por essa técnica é possível identificar e analisar as bandas características da quitosana, do TPP e das NPQS, e os possíveis deslocamentos de bandas que indiquem interações entre os grupos amino da quitosana e os grupos fosfatos do TPP, o que promove a formação de NPQS. A Figura 5.5 mostra os espectros da quitosana pura, do TPP e NPQS, as quais estão identificadas na Tabela 5.2.

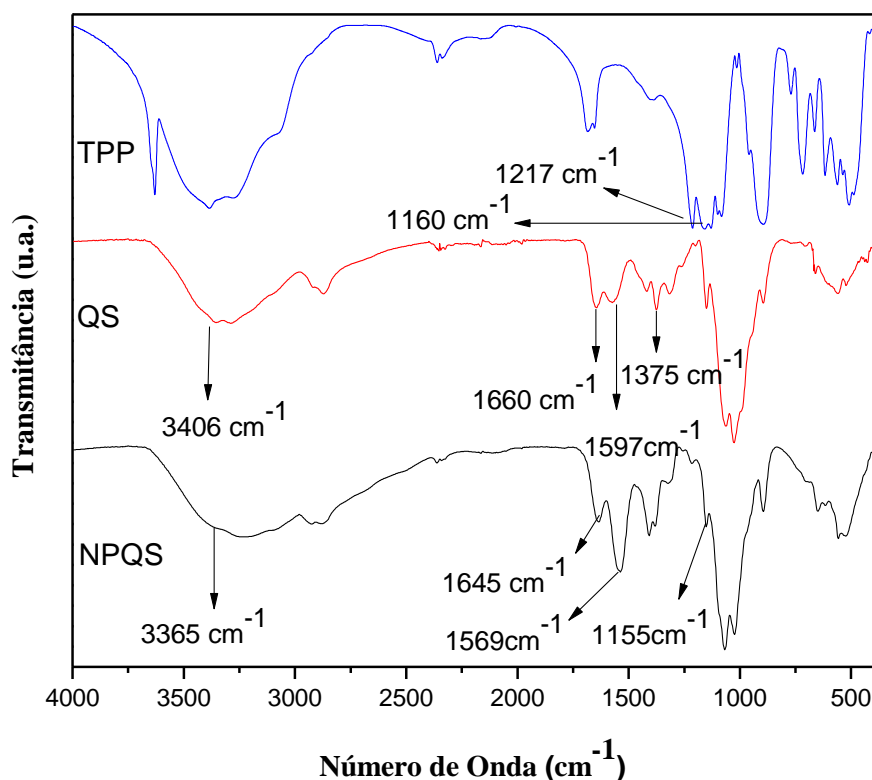


FIGURA 5.4: Espectro de FT-IR do tripolifosfato de sódio, quitosana e nanopartícula de quitosana.

A partir da Tabela 5.2 podemos identificar o espectro do TPP e suas bandas características na região de 1160 cm^{-1} relacionadas ao grupo fosfato ($\text{P}=\text{O}$) e em 1217 cm^{-1} característico ao grupo $\text{P}-\text{O}$. O espectro da quitosana mostrou uma banda intensa em 3406 cm^{-1} referente à vibração de estiramento OH e NH_2 assim como as ligações de hidrogênio presentes nos polissacarídeos. Entre as principais bandas características da quitosana encontra-se a amida I (deformação axial $\text{C}=\text{O}$) situada em 1660 cm^{-1} e em 1597 cm^{-1} referente ao grupo amida II e a vibração de flexão $\text{N}-\text{H}$ da amida II (Figura 5.5). Um resultado semelhante foi observado na literatura sobre NPQS-TPP (XU e DU, 2003) e em filmes de quitosana tratados com fosfato (NaH_2PO_4). Em 1375 cm^{-1} observa-se uma faixa na deformação angular CH_2 simétrica, em $1063 - 1026\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento $\text{C}-\text{O}$. As bandas de absorção em 1151 cm^{-1} (estiramento assimétrico $\text{C}-\text{O}-\text{C}$). No espectro das NPQS encontra-se o pico em

3365 cm^{-1} indica que ocorrem ligações de hidrogênio (MOURA et al., 2009). Existe um deslocamento do pico original entre 1645 cm^{-1} e 1569 cm^{-1} o que indica que os grupos amino NH_3^+ da quitosana foram envolvidos em ligação cruzada com fosfato POO^- do TPP. Há outro deslocamento do pico original entre 1068 cm^{-1} e 1024 cm^{-1} , indicando interações do grupo C-O da quitosana com o TPP; e os picos próximos de 1217 cm^{-1} e 1155 cm^{-1} estão relacionados aos estiramentos das ligações P-O e P=O do TPP, respectivamente. (VIMAL et al., 2013). O aparecimento desses picos sugere a formação das NPQS uma vez que aparece tanto características da quitosana quanto do TPP. Os resultados foram consistentes com dados publicados anteriormente (DUDHANI e KOSARAJU, 2010).

TABELA 5-2: Bandas de espectroscopia no infravermelho da quitosana (QS), tripolifosfato de sódio (TPP) e nanopartículas de quitosana (NPQS).

Bandas QS (cm^{-1})	Bandas NPQS (cm^{-1})	Grupos Característicos
3406	3365	OH e NH_2
1660	1645	Amida I (C=O)
1597	1569	Amida II (C-N)
Bandas (cm^{-1}) TPP	1213	P-O
	1160	1160

5.1.4 – Microscopia Eletrônica de Varredura com fonte de emissão de campo

As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo. A Figura 5.6 apresenta a morfologia da superfície das NPQS. Estas nanoestruturas recém-preparadas devem ser estáveis durante um longo período de armazenamento para que possam ser utilizados com sucesso sistemas de embalagens. A estabilidade das nanopartículas pode ser refletida pela morfologia, tamanho médio e distribuição de tamanhos.

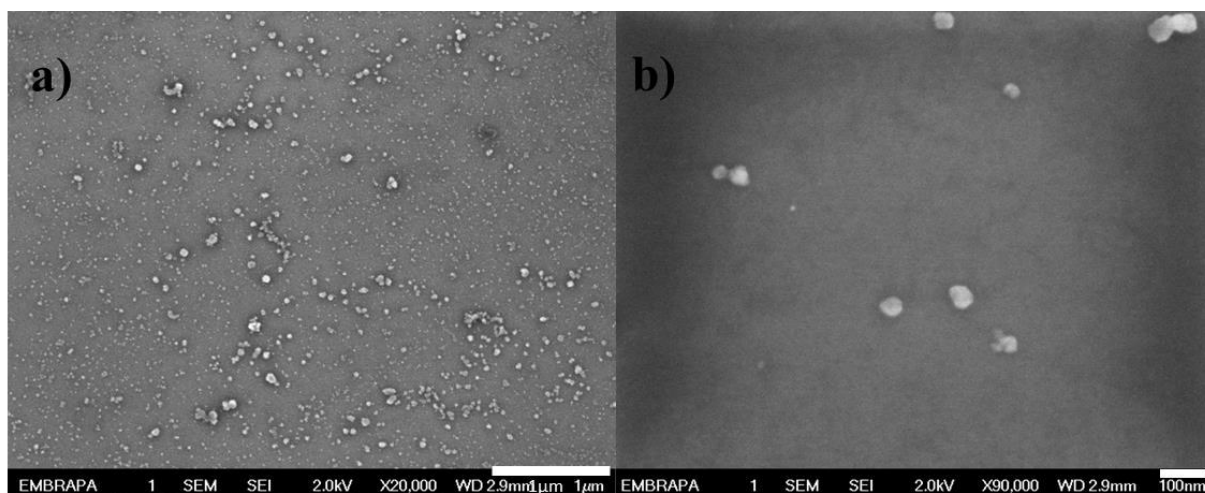


FIGURA 5.5: Imagens de MEV/FEG das nanopartículas de quitosana. Em a) NPQS com aumento de 20.000 vezes e b) aumento de 90.000 vezes.

Em (a) é possível visualizar partículas dispersas, distribuídas e uniformes. A Figura 5.6 (b) com um aumento de 90.000 vezes mostra que as nanoestruturas estão relativamente homogêneas e com tamanhos menores de 100 nm, aproximadamente. A partir desses resultados, pode-se observar que quando o tamanho de partícula é obtido por MEV/FEG ou por dispersão de luz dinâmica (DLS), surgem diferenças nos tamanhos. O tamanho médio das NPQS detectadas pela técnica DLS foi ligeiramente maior do que a MEV/FEG, o que

pode ser atribuído ao fato de que a medida MEV/FEG refletiu o tamanho no estado seco, enquanto a técnica de DLS refletiu o inchaço e a aglomeração em suspensão, que podem ter influenciado na medida do tamanho das partículas (GOYCOOLEA et al., 2012; LUQUE-ALCARAZ et al., 2016). WORANUCH e YOKSAN (2013) relataram uma faixa de tamanho das NPQS de 80 e 100 nm, medidas por microscopia de transmissão (MET), porém quando usou a técnica de DLS, a faixa de tamanho foi de 586 e 683 nm.

5.1.5 – Termogravimetria

A termogravimetria foi feita de forma a compreender possíveis mudanças físico-químicas dos materiais quando estes são aquecidos em altas temperaturas. A degradação térmica é uma reação que envolve a ruptura das ligações das cadeias principais e secundárias. Um dos fatores determinantes da estabilidade térmica do polímero é a energia das ligações entre os átomos da cadeia principal (LIM e WAN, 1995). A Figura 5.7 mostra o comportamento térmico da quitosana na forma pó e das nanopartículas de quitosana. Os resultados mostraram uma semelhança entre as curvas.

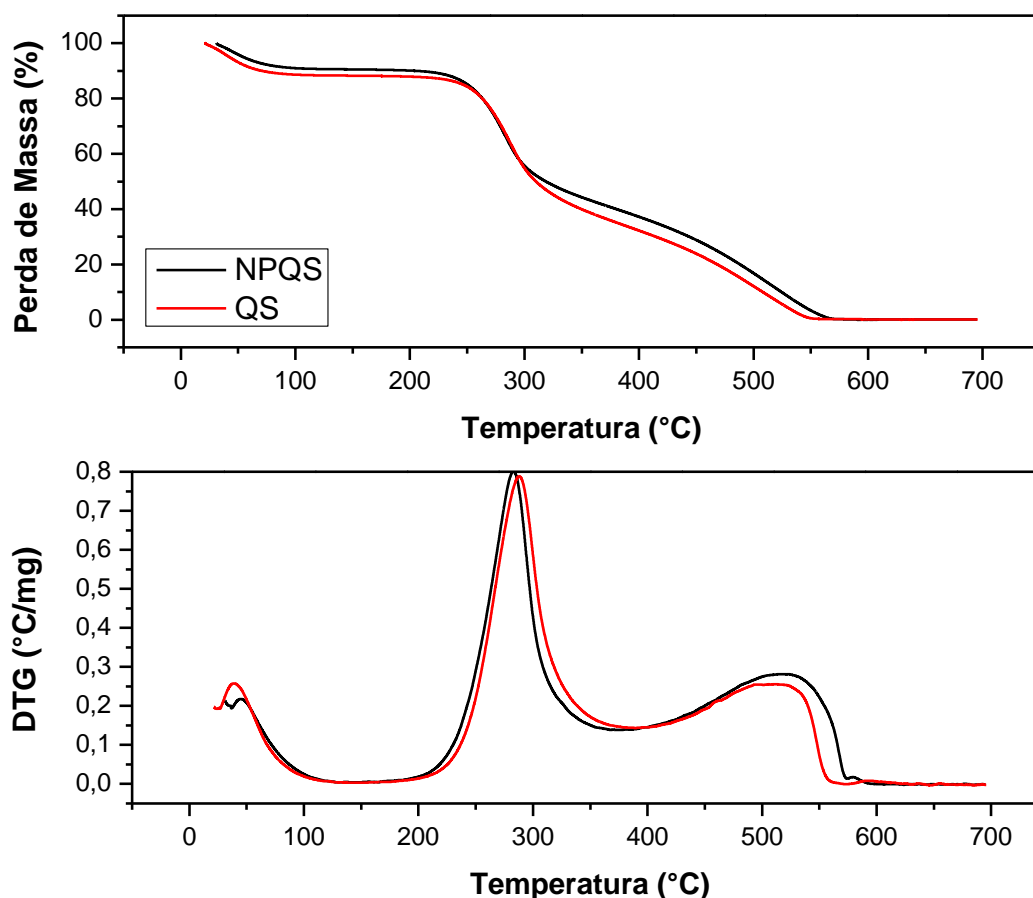


FIGURA 5.6: Curvas termogravimétricas de degradação e DTGA das nanopartículas de quitosana (NPQS) e quitosana (QS).

A partir da Figura 5.7 podemos observar que até 100 °C ocorreu uma perda de massa de 10% para as NPQS e 12% para quitosana pura referente às perdas das moléculas de água. As propriedades de hidratação dependem da estrutura primária e supramolecular dos polímeros, esta água ligada possui uma forte influência sobre a natureza polimorfa da quitosana (PRASHANTH e THARANATHAN, 2002), comprovando assim sua natureza hidrofílica.

Segundo GOMATHI et al. (2017), ocorre uma perda de massa lenta a partir de 140 a 200 ° C referente à decomposição de polímero com baixa massa molar como NH_3^+ , CO. A primeira temperatura de degradação (TD 1) tanto para as NPQS e quitosana ocorrem entre 240 e 299 °C, este primeiro pico corresponde ao processo de desidratação do anel anidro glucosídico presente na

molécula da quitosana (REJINOLD et al., 2011), despolimerização e decomposição de grupos de cadeia lateral (FENG e XIA, 2011). A taxa máxima de perda de massa foi em 280 °C. Em 600 °C houve a formação de 0,2% de resíduo. O segundo pico encontrado salienta uma perda de massa acentuada entre 446 a 566 °C para as NPQS e de 450 a 544 °C para quitosana, referente à carbonização do polissacarídeo. Esta leve diferença de temperatura da quitosana quando comparado com NPQS justifica as interações inter e intra-moleculares da quitosana com TPP durante o processo de reticulação alterando o comportamento térmico da quitosana. Estes dados estão de acordo com o trabalho encontrado na literatura dos autores SANDFORDOS et al. (1990).

5.1.6 - Calorimetria Exploratória Diferencial

A análise de DSC determina a energia que é transferida sob a forma de calor (a pressão constante) em um processo físico ou químico. A partir desta análise, investigou-se o comportamento térmico dos materiais separadamente. A Figura 5.8 apresenta as curvas calorimétricas da quitosana e nanopartícula de quitosana.

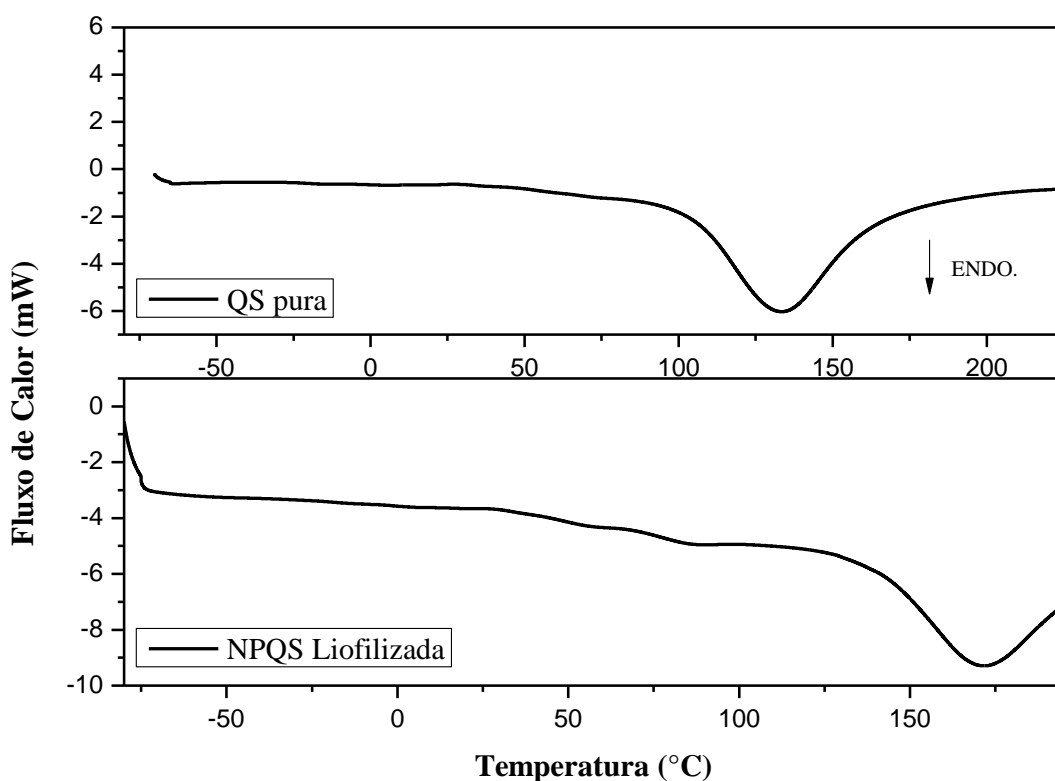


FIGURA 5.7: Curvas de calorimetria exploratória diferencial da quitosana (QS) e nanopartícula de quitosana (NPQS).

Os dados para quitosana pura são mostrados na Figura 5.8 onde foi encontrado um pico endotérmico em aproximadamente 130 °C que foi atribuído à desidratação das moléculas de água presentes na quitosana, típica de polímeros amorfos (MURA et al., 2011). De acordo com SARMENTO et al. (2006) em torno de 320 °C correspondente à degradação térmica do polímero, dado que não está mostrado.

A Figura 5.8 apresenta o termograma das NPQS com um comportamento térmico típico de polissacarídeos com dois picos. O primeiro pico endotérmico de menor intensidade foi encontrado a 80 °C correspondente à desidratação das NPQS. Segundo DMOUR e TAHA (2017) o segundo pico endotérmico próximo a 170 °C é referente à quebra de ligações de hidrogênio de cristalitos presentes na molécula quitosana, os autores relataram que aparece um terceiro pico exotérmico representado pela degradação polimérica (300 - 320

°C). NEUFELD et al. (2017) atribuiu este segundo evento endotérmico das NPQS com a quebra de quebra de interações eletrostáticas entre as moléculas de quitosana e TPP.

TABELA 5-3: Temperatura do pico endotérmico (TPE) e variação de entalpia (ΔH) da quitosana e nanopartícula de quitosana.

Polímero	TPE (°C)	ΔH (J/g)
Quitosana	134,3	255,3
NPQS	170	143

5.1.7 – Concentração Mínima Inibitória (CIM)

A atividade antimicrobiana foi testada contra duas bactérias veiculadas por alimentos, *E. coli* e *S. aureus*, foram avaliadas para amostras de quitosana solubilizada em ácido acético, NPQS, carvacrol, DMSO e Tween 80, todas feitas em triplicatas. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.4.

TABELA 5-4: Concentração inibitória mínima (CIM) e valores de concentração bactericida mínima (CBM) para quitosana, nanopartículas de quitosana (NPQS), carvacrol para *E. coli* e *S. aureus*.

Bactéria	CIM (mg/mL) Quitosana	CIM (mg/mL) NPQS	CIM (mg/mL) Carvacrol
<i>Escherichia coli</i>	0,15	0,10	$1,03 \times 10^{-3}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,15	0,10	$1,03 \times 10^{-3}$
CBM	Bacteriostático	Bacteriostático	Bactericida

A Tabela 5.4 mostra os resultados da quitosana solubilizada em ácido acético que apresentou um valor de CIM, concentração inibitória mínima, que produziu a não turbidez do meio onde continham as culturas de bactérias após a incubação, para os dois microorganismos, *E. coli* e *S. aureus*, igual a 0,15 mg/mL. As NPQS exibiram valores de CIM para ambas as bactérias de 0,10 mg/mL. Esta diferença nos valores de CIM, da quitosana e das NPQS, é em vista da maior área superficial e densidade de carga das NPQS, o que possibilita uma maior interação com as membranas das células bacterianas. Sabe-se que as atividades antifúngicas e antimicrobianas da quitosana originam-se da sua natureza policatiônica. Uma hipótese para a ação antimicrobiana da quitosana são devido às forças eletrostáticas entre os grupos amino protonados (NH_2) da quitosana e os resíduos negativos nas superfícies celulares. LIU et al. (2004), afirmam que a atividade bactericida da quitosana é causada pela interação eletrostática entre grupos NH_3^+ da quitosana e a grupos fosforil da membrana celular. Neste estudo o objetivo foi combinar os efeitos antimicrobianos das nanoestruturas de quitosana com outro agente antimicrobiano, o carvacrol, sendo o componente majoritário do óleo essencial de orégano e tomilho. O carvacrol inibiu os microorganismos na concentração de $1,03 \times 10^{-3}$ mg/mL. Muitos estudos demonstraram previamente a atividade antibacteriana do carvacrol contra bactérias patogênicas. O mecanismo sugerido para atividade antimicrobiana de compostos fenólicos, como o carvacrol, age principalmente contra a membrana celular aniônica, devido à sua natureza hidrofóbica, afetando o ácido graxo insaturado na membrana e desse modo alterando sua estrutura (SEVERINO et al., 2014). Em particular, os compostos fenólicos atuam como um transportador de prótons através das bicamadas lipídicas, o que causa o aumento da permeabilidade e a ruptura e vazamento do material intracelular (KIM et al., 1995). O solvente DMSO inibiu o crescimento de ambos os microorganismos na concentração de $1,6 \times 10^{-2}$ mg/mL. O Tween 80 utilizado

para dissolver o carvacrol, junto com o DMSO, não possui atividade antimicrobiana.

Propriedades antibacterianas da quitosana já foram relatadas em outros trabalhos (CORREIA et al., 2013; HOSSEINI et al., 2013; HU et al., 2015). Vários estudos mostraram a eficácia antimicrobiana do carvacrol, contra uma ampla variedade de bactérias patogênicas, (KEAWCHAOON e YOKSAN, 2011; NDOTI-NEMBE et al., 2013). A partir destes resultados a quitosana e carvacrol, possuem um efeito sinérgico na atividade antimicrobiana contra os patógenos testados na alimentação (BILIA et al., 2014; WANG et al., 2011).

5.2 - Caracterizações dos Nanocompósitos de Pectina

Os filmes produzidos por *casting* contínuo e *casting* descontínuo (batelada), foram avaliados primeiramente por características visuais. Nesta avaliação foram observadas as seguintes características: continuidade (ausência de rupturas e fraturas após a secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis visíveis a olho nu, zonas de opacidade ou de cores diferenciadas) e manuseabilidade (possibilidade de manusear o filme sem ruptura), para possíveis comparações com as embalagens convencionais.

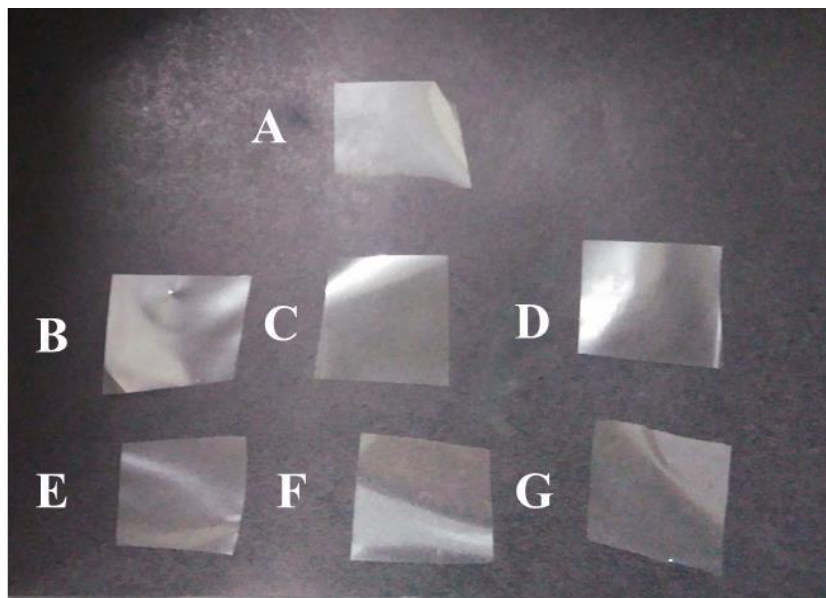


FIGURA 5.8: Filmes de pectina 2% e nanocompósitos: a) PEC, b) PEC2%_NPQS 1%, c) PEC2%_NPQS 1,5%, d) PEC2%_NPQS 2%, e) PEC2%_NPQS 1%_CRV, f) PEC2%_NPQS 1,5%_CRV, g) PEC2%_NPQS 2%_CRV.

Como visto na Figura 5.9, os filmes de pectina e os nanocompósitos com e sem carvacrol estão visualmente homogêneos, ou seja, sem a presença do polímero não solubilizado ou de aglomerados. Todos os filmes apresentaram transparência, característica importante, se considerar uma futura aplicação como embalagem para alimento (LOREVICE, 2015). A secagem dos filmes, tanto à temperatura ambiente quanto em elevadas temperaturas, não resultou em filmes descontínuos, com rachaduras ou fraturas macroscópicas.

5.2.1 – Propriedades Físicas

5.2.1.1 - Espessura

Segundo GENNADIOS et al. (1994), o controle da espessura é importante para a uniformidade dos filmes formados, reprodutibilidade das medidas realizadas e validade da comparação entre filmes. A partir das Tabelas 5.5 e 5.6 pode-se considerar que os filmes com 5% (m/m) de pectina e dos

nanocompósitos com 2% (m/m) de nanopartículas de quitosana (PEC 5%_NPQS 2%) que foram produzidos por *casting* contínuo, apresentaram espessura maior que os filmes com 2% (m/m) de pectina, o que se deve ao aumento da viscosidade das suspensões devido ao aumento da concentração do polímero.

TABELA 5-5: Espessura dos filmes de pectina 5% e dos nanocompósitos (PEC5%_NPQS 2%).

Filmes	Espessura (μm)
Pectina 5% Batelada	$58 \pm 6,6$
PEC 5% <i>casting</i> contínuo	$40 \pm 3,9$
PEC5%_NPQS 2% Batelada	$64 \pm 6,8$
PEC5%_NPQS 2% <i>casting</i> contínuo	$70 \pm 9,8$

TABELA 5-6: Espessura dos filmes de pectina 2% e dos nanocompósitos (PEC 2%_NPQS).

Filmes	Espessura (μm)
Pectina 2%	$38 \pm 5,9$
PEC2%_NPQS1%	$30 \pm 2,5$
PEC2%_NPQS1,5%	$36 \pm 3,5$
PEC2%_NPQS2%	$34 \pm 3,8$
PEC2%_NPQS1%_CRV	$33 \pm 3,3$
PEC2%_NPQS1,5%_CRV	$27 \pm 3,5$
PEC2%_NPQS 2%_CRV	$30 \pm 2,3$

5.2.1.2 – Ângulo de Contato

As medidas do ângulo de contato permitem avaliar o efeito de incorporação das NPQS e carvacrol sobre a polaridade da superfície dos filmes. O ângulo de contato é usado como um indicativo do grau de hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade superficial (SU et al., 2010). Filmes com ângulo de contato com a água superior a 65° são identificados como superfícies hidrofóbicas (VOGLER, 1998). A Figura 5.10 mostra os valores médios do ângulo de contato no tempo zero ($t = 0\text{s}$), isto é, o ângulo de contato inicial no primeiro contato da gota com o filme, para os filmes de PEC 2% e os nanocompósitos com e sem carvacrol produzidos por *casting* batelada.

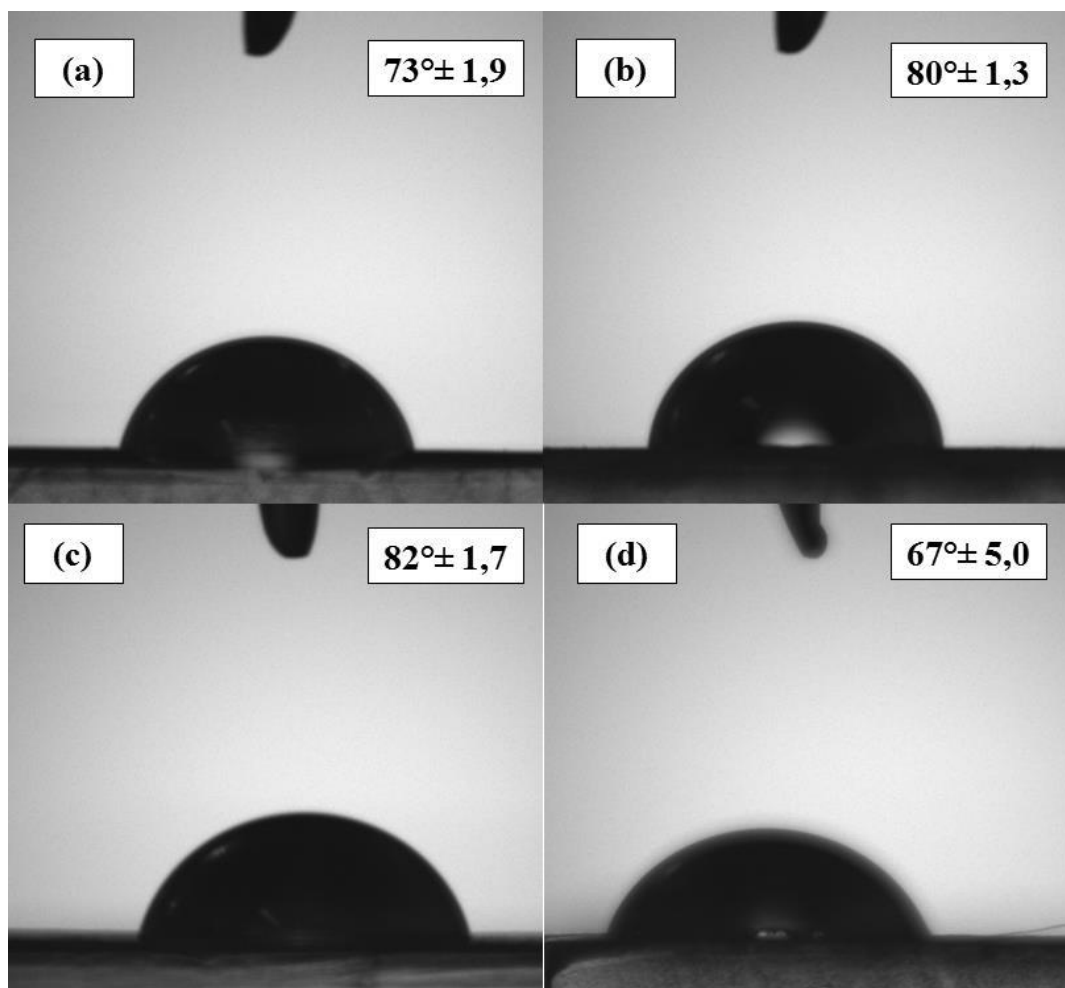


FIGURA 5.9: Ângulo de contato dos filmes de pectina 2% e nanocompósitos: (a) Pectina 2%, (b) PEC 2%_NPQS 1%, (c) PEC 2%_NPQS 1,5%, (d) PEC 2%_NPQS 2%.

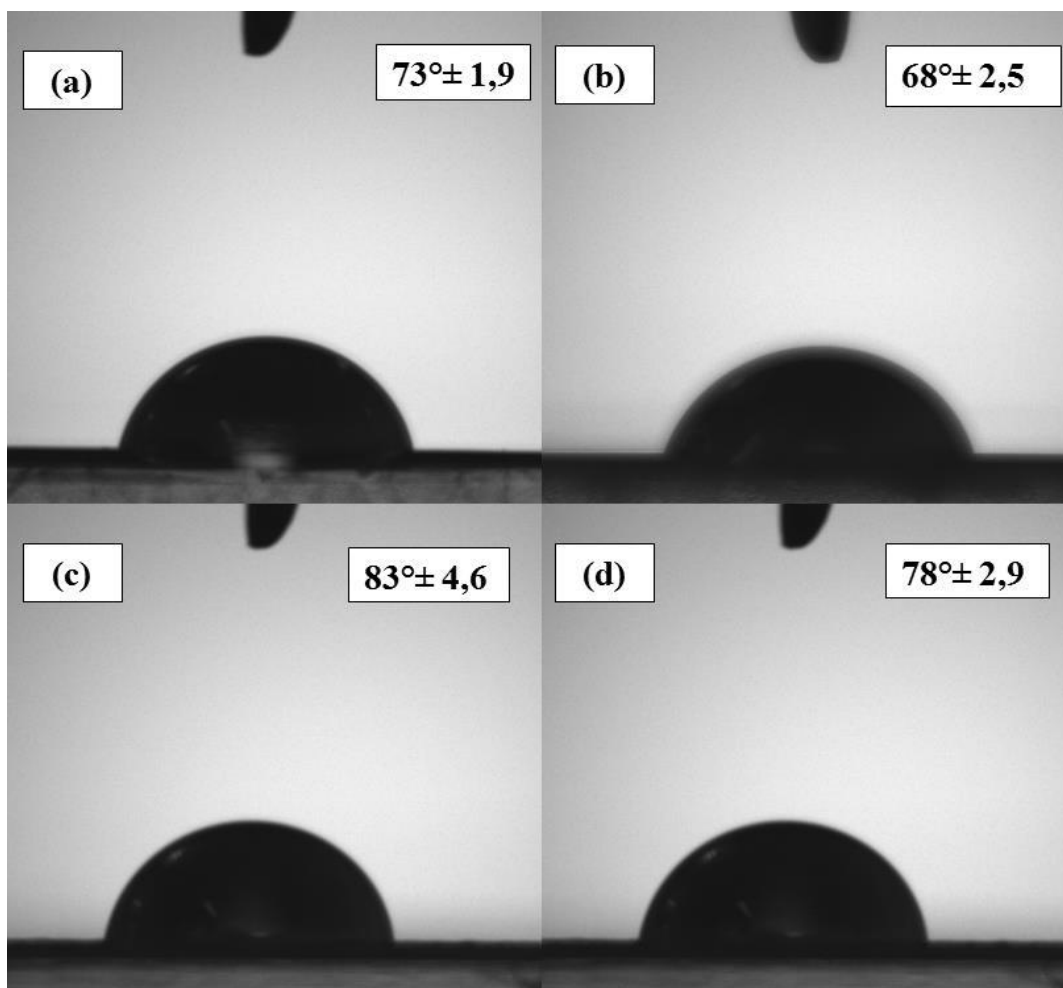


FIGURA 5.10: Ângulo de contato dos filmes de pectina 2%: (a) pectina 2%, (b) PEC 2%_NPQS 1%_CRV, (c) PEC 2%_NPQS 1,5%_CRV, (d) PEC 2%_NPQS 2%_CRV.

Esta é uma análise que a afinidade entre o líquido e a superfície do material. Portanto, espera-se que a adição de NPQS e carvacrol possam produzir ângulos de contato, entre a gota de água e superfícies do filme, superiores ao filme puro. O efeito da incorporação de NPQS sobre as propriedades de molhabilidade dos filmes a base de pectina levou um pequeno aumento do valor do ângulo de contato de 73 para 82° . Tal comportamento pode ser associado ao surgimento de uma interação efetiva entre as NPQS e o grupo carboxílico na estrutura molecular da pectina, sugerindo uma diminuição de polaridade do

sistema, de maneira que a energia da superfície teve uma tendência de melhorar à medida que adicionou NPQS e carvacrol, favorecendo uma interação efetiva. Outra explicação para tal aumento é devido à rugosidade da superfície dos filmes com NPQS, que pode aumentar à medida que ocorre a formação de aglomerados de NPQS, especialmente no limite de altas concentrações. Como consequência, o ângulo de contato obtido em uma superfície áspera tende a exibir um valor superior ao de uma superfície lisa, devido à histerese induzida pela não homogeneidade da base de substrato pectina (LEGER e JOANNY, 1992). Além da composição da superfície, a morfologia da superfície do filme afeta as propriedades de molhabilidade do filme, sendo que uma morfologia mais densa contribui para valores de ângulo de contato mais altos. (BASIAK et al., 2015), como será visto no próximo item nas imagens de MEV/FEG para os nanocompósitos. Não foram observadas diferenças de ângulo de contato significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de NPQS e os nanocompósitos com carvacrol.

Segundo MOURA et al. (2014) a adição de nanoemulsão de canela em filmes de pectina, resultou em uma matriz mais hidrofóbica, o que colobra para uma possível aplicação de filmes de polissacarídeos em alimentos com elevado teor de umidade, o que seria inadequado em filmes contendo somente pectina.

5.2.2 – Morfologia dos Filmes

5.2.2.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia dos filmes de PEC 2% e dos nanocompósitos com ou sem carvacrol foram avaliadas a partir de MEV/FEG, no intuito de investigar seus aspectos de fratura criogênica, bem como a presença de partículas e

homogeneidade do material produzido. A Figura 5.12 apresenta as micrografias dos filmes de PEC 2% obtidos por *casting* batelada.

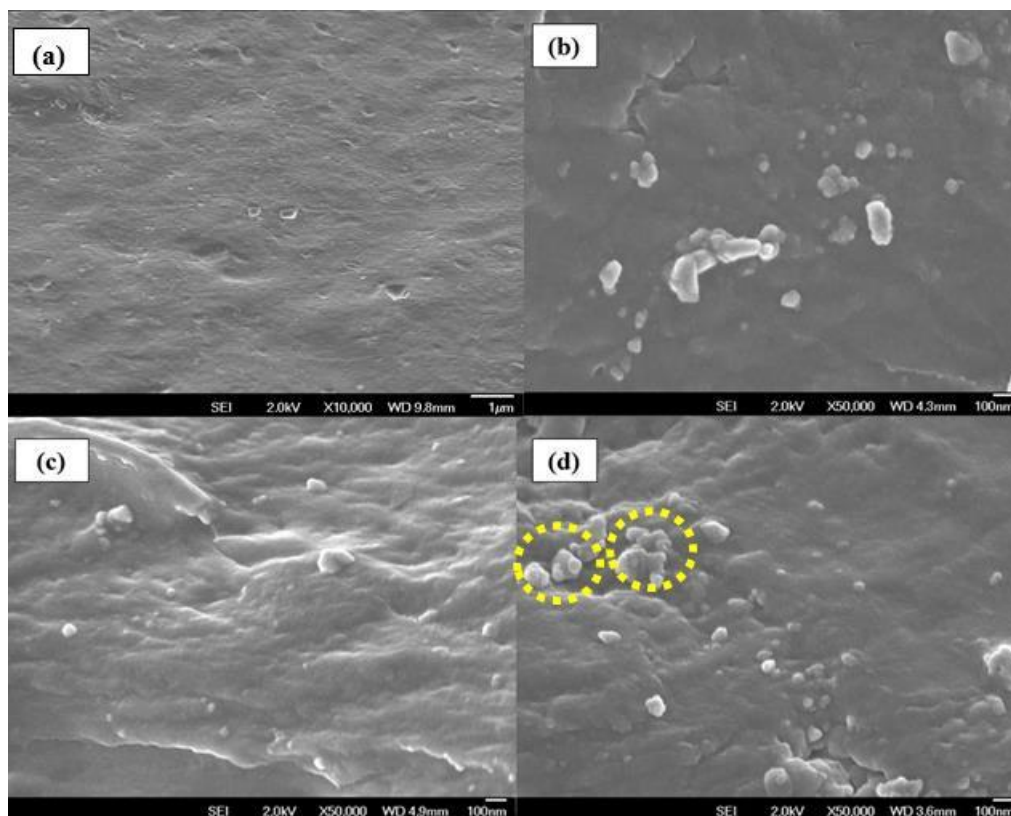


FIGURA 5.11: Imagens de MEV/FEG – Observação da superfície de fraturas criogênicas dos filmes obtidos por *casting* batelada: (a) pectina 2%, (b) PEC2%_NPQS 1%, (c) PEC2%_NPQS 1,5%, (d) PEC2%_NPQS 2%.

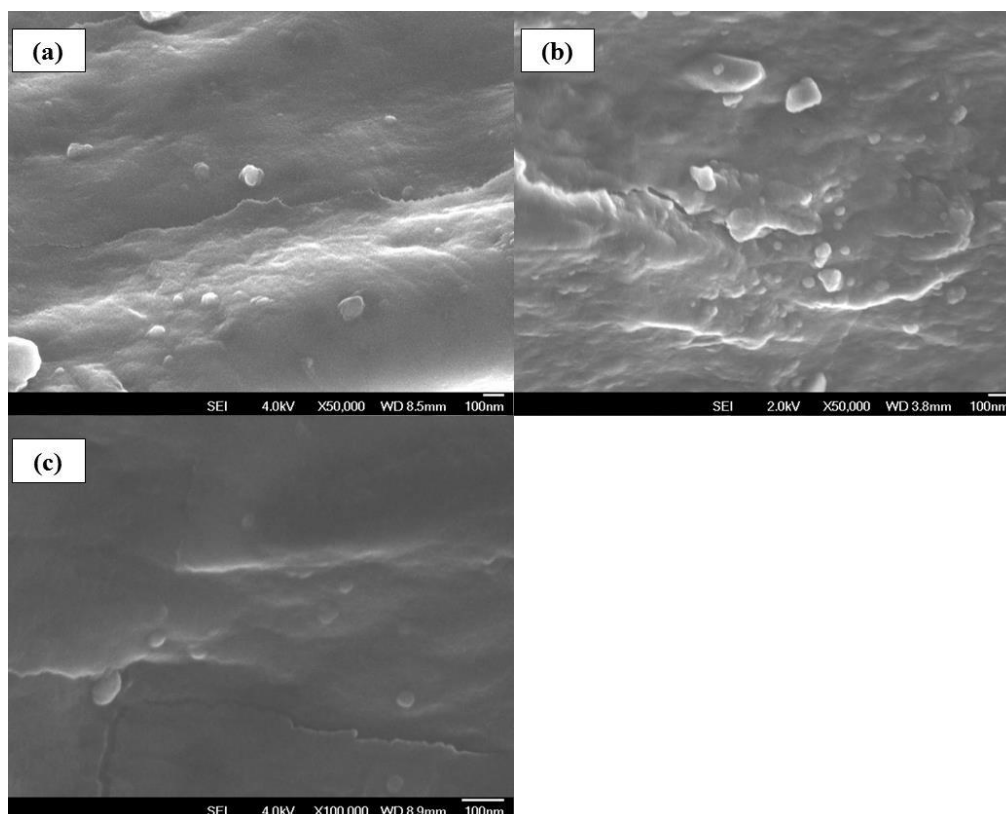


FIGURA 5.12: Imagens de MEV/FEG - Fraturas criogênicas dos Filmes: (a) PEC2%_NPQS 1%_CRV (b) PEC2%_NPQS 1,5%_CRV, (c) PEC2%_NPQS 2%_CRV. Micrografias com aumentos de 50.000 a 100.000 vezes.

A partir das imagens de fraturas (5.12 e 5.13) de MEV/FEG pode-se observar a formação de uma fratura frágil, ou seja, sem deformação plástica, um filme denso, homogêneo e sem a presença de poros na matriz, importante para se ter filmes com bom desempenho mecânico. O filme de pectina 2% puro (Figura 5.12 a) apresentou-se contínuo, compacto e homogêneo. Nas micrografias dos nanocompósitos (Figura 5.12 b - d e Figura 5.13 a - c) foi possível avaliar a presença de NPQS, com tamanhos menores que 100 nm, como já foram mostrados nas imagens da Figura 5.6 das NPQS. De acordo com estas imagens observa-se uma boa interação das nanoestruturas com a pectina, por estarem bem inseridas na matriz. Por investigação de MEV/FEG, constatou-se a formação de alguns aglomerados de NPs (Figura 5.12 d) dos filmes de PEC2%_NPQS 2%. Todos os filmes obtidos foram densos e demonstravam

continuidade e homogeneidade, não verificando diferença visual entre filmes de PEC e dos nanocompósitos PEC_NPQS e PEC_NPQS_CRV.

A morfologia da superfície dos filmes de pectina 2%, dos nanocompósitos com e sem carvacrol foram relativamente plana, lisa e compacta indicando aparentemente uma boa mistura dos polímeros (Figuras 5.14 e 5.15).

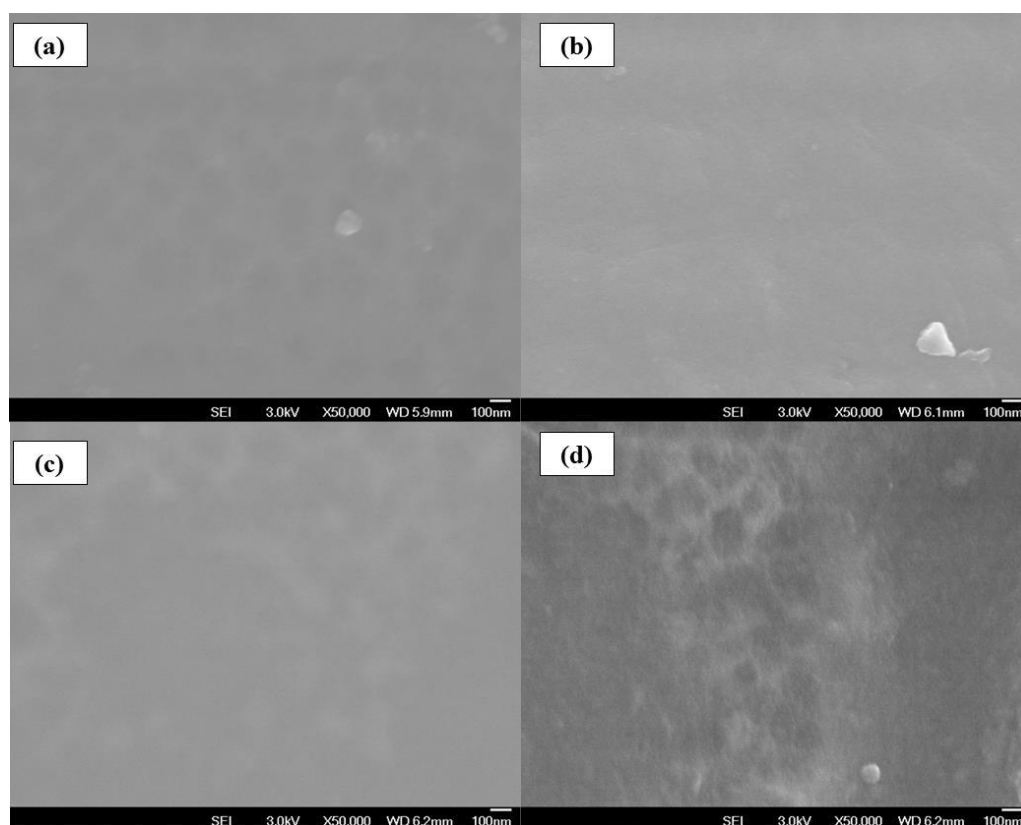


FIGURA 5.13: Imagens de MEV/FEG – Superfície dos filmes de pectina 2% e nanocompósitos: a) PEC 2%, b) PEC2%_NPQS 1%, (c) PEC2%_NPQS 1,5%, (d) PEC2%_NPQS 2%. Micrografias com aumentos de 50.000 vezes.

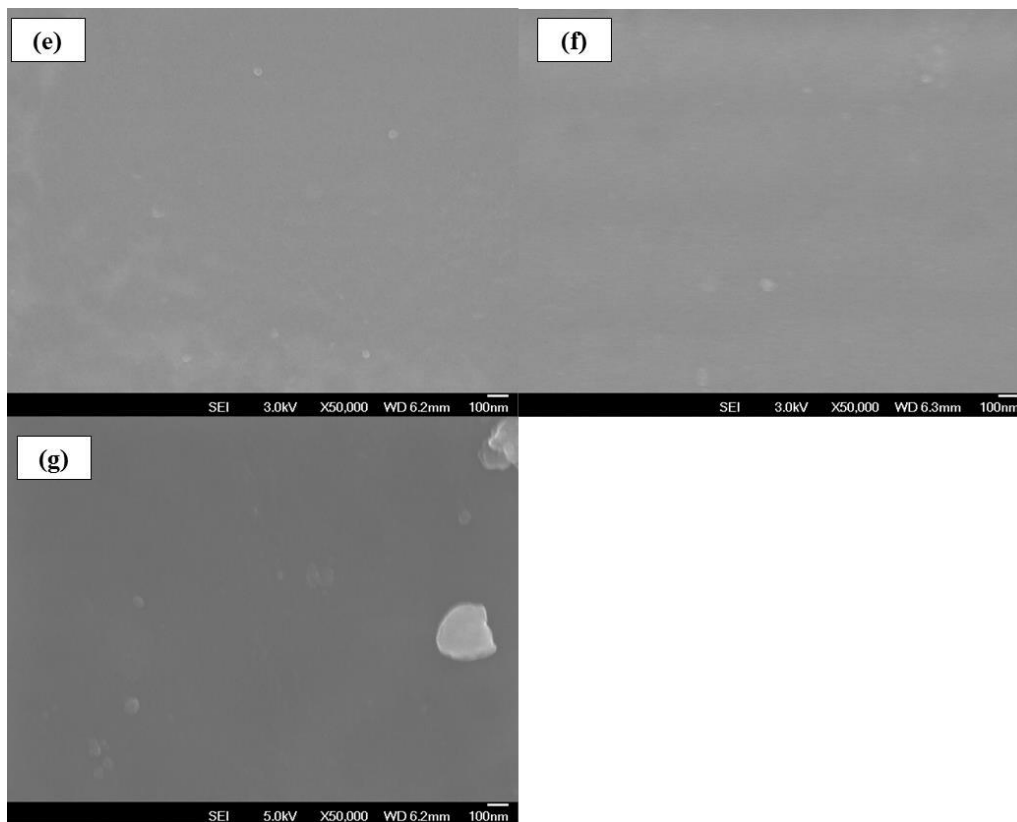


FIGURA 5.14: Imagens de MEV/FEG – Superfície dos filmes de pectina 2% e nanocompósitos: (e) PEC2%_NPQS 1%_CRV (f) PEC2%_NPQS 1,5%_CRV, (g) PEC2%_NPQS 2%_CRV. Micrografias com aumentos de 50.000 vezes.

A partir das Figuras 5.16 (a – b) dos filmes de pectina 5% nota-se, que a superfície do filme obteve aspecto craquelado, com trincas em algumas regiões da superfície dos filmes. Estas trincas foram observadas somente nos filmes formulados por *casting* contínuo, sugerindo que estas sejam resultado das altas temperaturas de secagem no processamento dos materiais. O processo de evaporação de água da solução filmogênica, acontece em poucos minutos, assim não há tempo suficiente das moléculas poliméricas se reorganizarem no filme, tornando o filme quebradiço e criando alguns pontos concentradores de tensão. Estas trincas foram evidenciadas apenas para os filmes de PEC 5% e PEC 5%_NPQS 2% obtidos por *casting* contínuo.

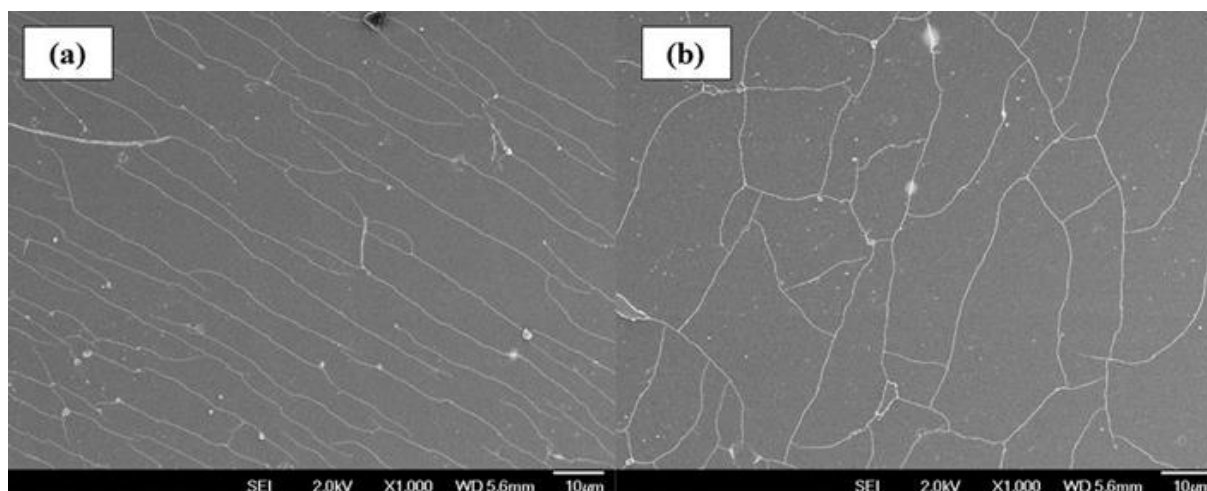


FIGURA 5.15: Imagens de MEV/FEG – Superfície dos filmes de pectina 5% produzidos por *casting* contínuo. (a) pectina 5% e (b) PEC5%_NPQS 2%. Micrografias com aumentos de 1.000 vezes

5.2.2.2 - Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier - Refletância total atenuada

Amostras de filmes de pectina puros, nanocompósitos e nanocompósitos com carvacrol foram analisados por espectroscopia FTIR com modo ATR (Figura 5.17). Esta análise foi feita para verificar uma possível interação entre os polímeros pectina-quitosana e o óleo essencial adicionado.

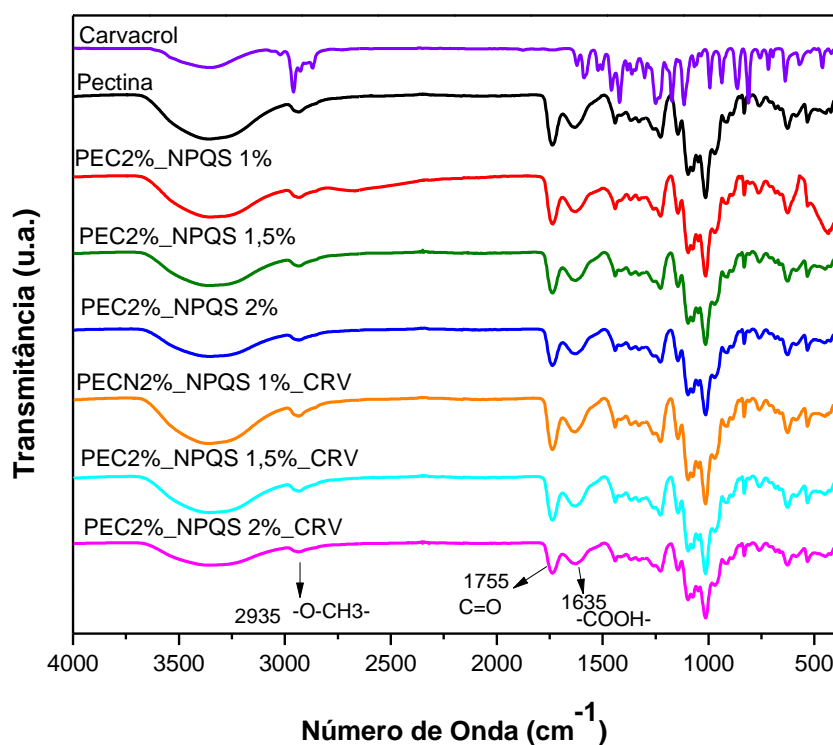


FIGURA 5.16: Espectro de infravermelho dos filmes de pectina 2% puro e com 1%, 1,5%, 2% de nanopartícula de quitosana (PEC 2%_NPQS) e carvacrol.

No espectro da pectina, podemos notar as principais bandas relacionadas ao estiramento - OH na região de $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ devido às interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio, estas hidroxilas são provenientes do monômero da pectina (STUART, 2004). Identifica-se a banda em 2935 cm^{-1} referente ao grupo $-O-CH_3-$ presentes no ácido galacturônico da estrutura da pectina; as vibrações do alongamento correspondentes aos grupos metil-éster ($COOCH_3$) e ácido carboxílico não dissociado ($COOH$) foram encontrada na região de em 1755 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 1974; LOREVICE, 2015; COIMBRA et al., 2011). Bandas em 1635 cm^{-1} e 1413 cm^{-1} relacionam-se, respectivamente, com o estiramento da carboxila assimétrico e simétrico do íon carboxilato, Podemos ainda ressaltar o estiramento de ligação - C-O-C- em 1145 cm^{-1} , devido à presença de ligação glicosídica; uma banda em 830 cm^{-1} relacionada a hidrogênios enoméricos equatoriais (SYNYTSYA et al., 2003). Nos espectros abaixo da pectina pura estão os nanocompósitos e os filmes com

carvacrol. Estes foram feitos de modo a avaliar possíveis interações que ocorrem entre a matriz polimérica (PEC) com as NPQS e assim, promover um entendimento maior acerca das propriedades físico-químicas dos filmes obtidos. Devido à similaridade das estruturas dos polissacarídeos quitosana e pectina a análise dos espectros de infravermelho, a diferenciação da contribuição de cada um dos polissacarídeos não pode ser identificada.

5.2.3 – Propriedades de Barreira

5.2.3.1 – Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A avaliação da PVA fornece informações adicionais valiosas para identificar possíveis aplicações desses filmes como embalagens de alimentos. Uma propriedade de barreira às trocas de vapor de água satisfatória permite prolongar a vida útil dos alimentos. Esta propriedade fornece uma medida de quão facilmente as moléculas de água podem penetrar um material em uma certa umidade relativa. O mecanismo de difusão consiste na adição de um permeante (moléculas de água, oxigênio, etc.), estas colidem com as moléculas do polímero presentes nos filmes, adsorvendo na superfície, assim difunde-se através da rede polimérica até o outro lado do filme. A Figura 5.18 apresenta os valores obtidos de permeabilidade ao vapor de água (PVA), para todos os filmes de pectina nas formulações com 2% e 5% (m/m), com e sem a adição das NPQS e carvacrol.

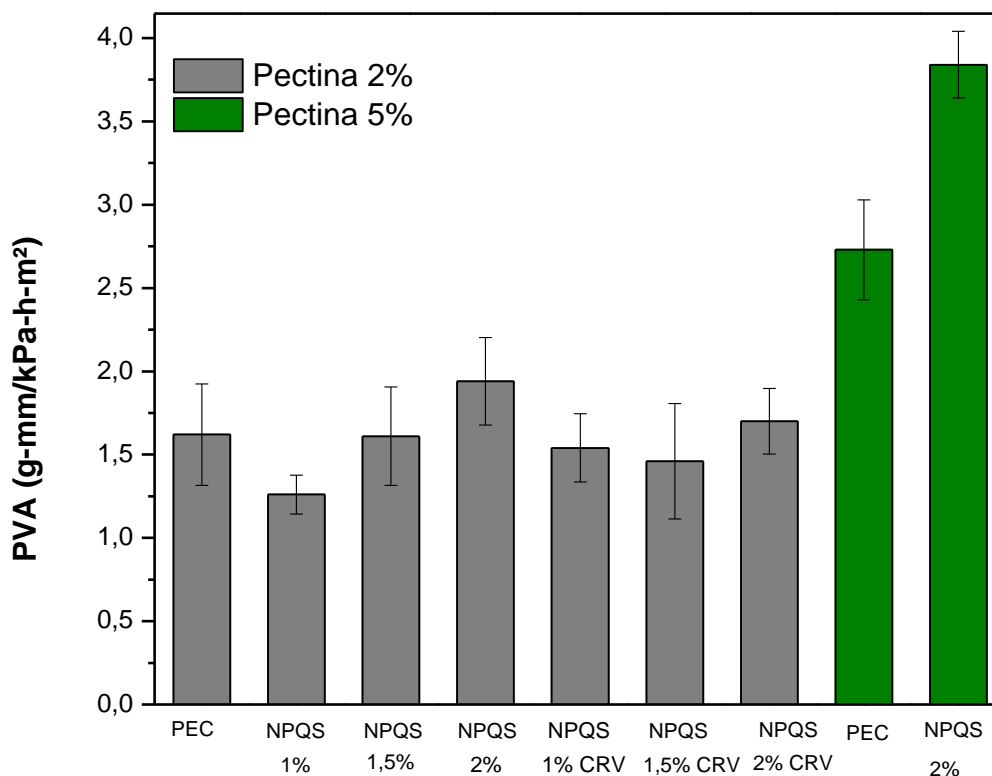


FIGURA 5.17: Valores de PVA para os filmes de pectina 2% (cinza) produzidos por batelada e pectina 5% (verde) produzidos por *casting* contínuo.

A Figura 5.18 apresenta a permeabilidade dos filmes de pectina 2% e pectina 5% produzidos por ambos os métodos, batelada e por *casting* contínuo, respectivamente. Os filmes com maior massa de pectina (5%) produzidos por *casting* contínuo obtiveram valores de PVA maiores que os filmes menos concentrados de pectina (2%), produzidos por *casting* descontínuo (Tabela 5.7). Isto sugere que o aumento de defeitos (Figura 5.16 a e b) na matriz tenha facilitado à difusão de moléculas de água. Isto pode ser comprovado pelas imagens de MEV/FEG da superfície dos filmes de pectina 5% e dos nanocompósitos de PEC 5%_NPQS 2%, que exibiram trincas, em algumas regiões do filme. Outra hipótese a ser considerada é devido a maior presença de

grupos hidroxilas na cadeia polimérica dos filmes de pectina 5% aumentando assim a interação com a água e facilitando o processo de difusão. A permeabilidade dos filmes poliméricos está relacionada ao transporte do permeante por regiões amorfas dos polímeros ou por meio de poros (FELDMAN, 2001).

TABELA 5-7: Valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de pectina 2% e pectina 5%

Filmes	PVA
Pectina 2%	1,62 ^{a,b} ± 0,3
PEC2%_NPQS 1%	1,26 ^a ± 0,1
PEC2%_NPQS 1,5%	1,61 ^{a,b} ± 0,3
PEC2%_NPQS 2%	1,94 ^b ± 0,3
PEC2%_NPQS 1% CRV	1,54 ^{a,b} ± 0,2
PEC2%_NPQS 1,5% CRV	1,46 ^{a,b} ± 0,3
PEC2%_NPQS 2% CRV	1,7 ^{a,b} ± 0,2
Pectina 5%	2,73 ± 0,3
PEC5%_NPQS 2%	3,84 ± 0,2

As letras sobrescritas a,b indicam significância do desvio padrão nas medidas. Mesmas letras sobrescritas indicam valores que não são diferentes ($p > 0.05$).

Os filmes com apenas 2% de massa de pectina o valor de PVA diminui se comparado com os filmes de pectina 5%, o que pode ser atribuído a menos defeitos na matriz, causados pelo processo de secagem a temperaturas menores. Com a adição de NPs 1% nos filmes de pectina 2% houve uma leve redução da PVA comparando-se com os filmes apenas com pectina 2% puro. Isto se deve ao fato de que as nanoestruturas preenchem os poros das matrizes, deixando-as mais compactas. De acordo com CHANG et al. (2010), a adição de

NPQS dificulta a passagem de moléculas de água pela matriz polimérica aumentando o caminho tortuoso que o vapor de água precisa percorrer até a superfície do filme. Porém com o acréscimo na concentração de NPQS (1,5 e 2%) nos filmes de pectina 2% a PVA não se alterou significativamente. Uma das possíveis explicações foi sugerida por LOREVICE, (2015) que encontrou aumento no PVA em sistema similar, associado com o intumescimento das NPQS presentes na matriz de PEC. O processo de difusão ocorre pelas interações dos grupos aminos protonados da quitosana com as moléculas de água, facilitando assim a propagação das moléculas de água remanescente na superfície interna do filme. ALMEIDA et al. (2013), em seu trabalho relata o incremento de PVA dos filmes contendo fécula de batata com celulose bacteriana, com a habilidade de hidratação do biofilme formado com o grande número de hidroxilas livres que reforçaram as interações com a água, favorecendo sua propagação e transmissão. Já MOURA et al. (2009) constataram diminuição nos valores de PVA de filmes de HPMC nanoestruturados, devido às ligações de hidrogênio entre as NPs e o polímero. Dados semelhantes foram encontrados por LOREVICE et al. (2014), em um estudo das propriedades de filmes de HPMC e polpa de mamão.

O carvacrol contém grupos hidroxilas que podem interagir com as moléculas de água e, conseqüentemente, facilitam a transferência de umidade através do filme. O carvacrol presente nos filmes de pectina teve ação plastificante, ou seja, ele se aloca entre as cadeias poliméricas afastando umas das outras, fazendo com que a tortuosidade do processo de difusão das moléculas de água diminui. KROCHTA (2002), afirmou que os plastificantes prejudicam a capacidade de barreira de um filme. Segundo a análise estatística, a permeabilidade não foi afetada ($p > 0,05$), tanto para os filmes com adição de NPQS como para o carvacrol. Estes efeitos descritos acima que ocorrem com a incorporação de ambos os compostos, NPQS e carvacrol, podem estar ocorrendo simultaneamente o que pode explicar a ausência de efeito de ambos os

componentes, assim não havendo diferenças estatísticas entre os filmes estudados.

Para os autores DEBEAUFORT, et al. (1998) filmes com baixa permeabilidade ao vapor de água são desejáveis para embalagem de alimentos com alta teor umidade, para evitar a perda de peso, desidratação da superfície, mudanças físicas, químicas e organolépticas como em vegetais, carnes, queijos.

5.2.4 – Propriedades Mecânicas

As análises de propriedades mecânicas são relevantes para aplicação em embalagens de alimentos, pois refletem a resistência à ruptura e flexibilidade dos filmes. Os nanocompósitos serão viáveis para aplicação industrial se estes apresentarem boas propriedades físicas (barreira ao vapor de água e propriedades mecânicas como alongação e tensão máxima) próximas ou superiores às embalagens produzidas a partir de polímeros sintéticos. Maiores valores de alongação indicam maior flexibilidade do filme, antes de se romper, e valores altos de tensão indicam filmes mais resistentes. A tensão máxima (σ), módulo elástico (E) e alongação na ruptura (E_r) dos filmes de PEC 5%, PEC 2% e os nanocompósitos com ou sem carvacrol estão mostrados nas Figuras 5.19 - 21.

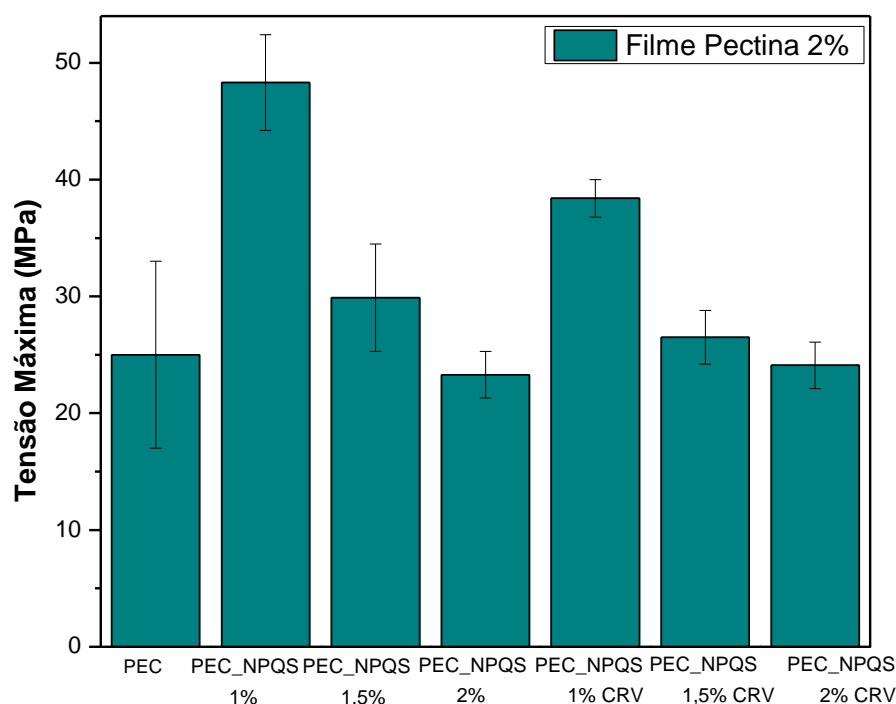


FIGURA 5.18: Tensão Máxima de todos os filmes de pectina 2% e os nanocompósitos com e sem carvacrol (PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV).

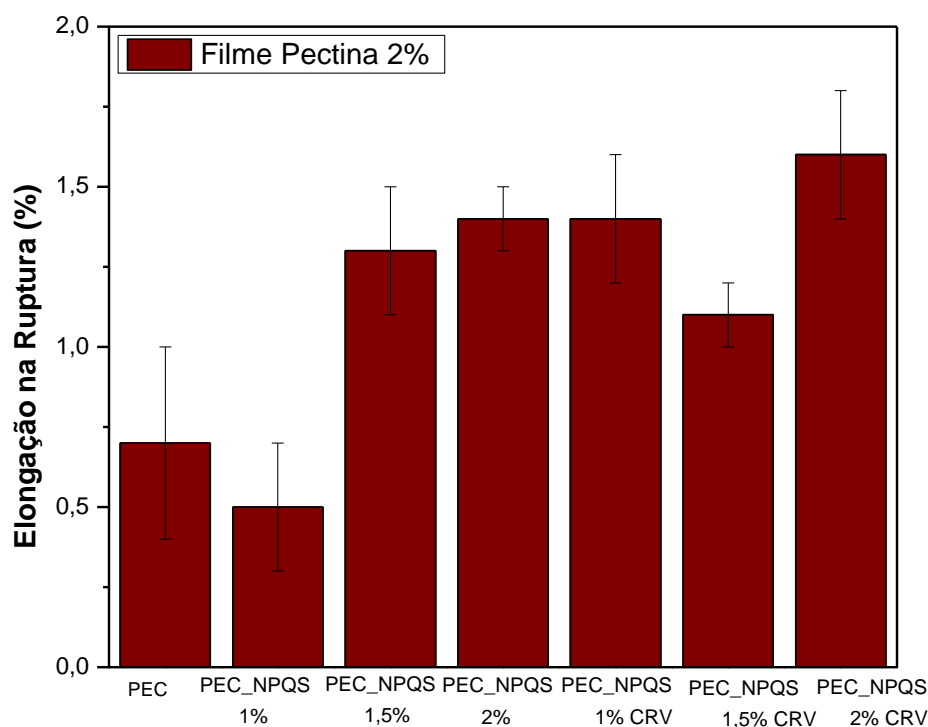


FIGURA 5.19: Elongação na ruptura de todos os filmes de pectina 2% e os nanocompósitos com e sem carvacrol (PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV).

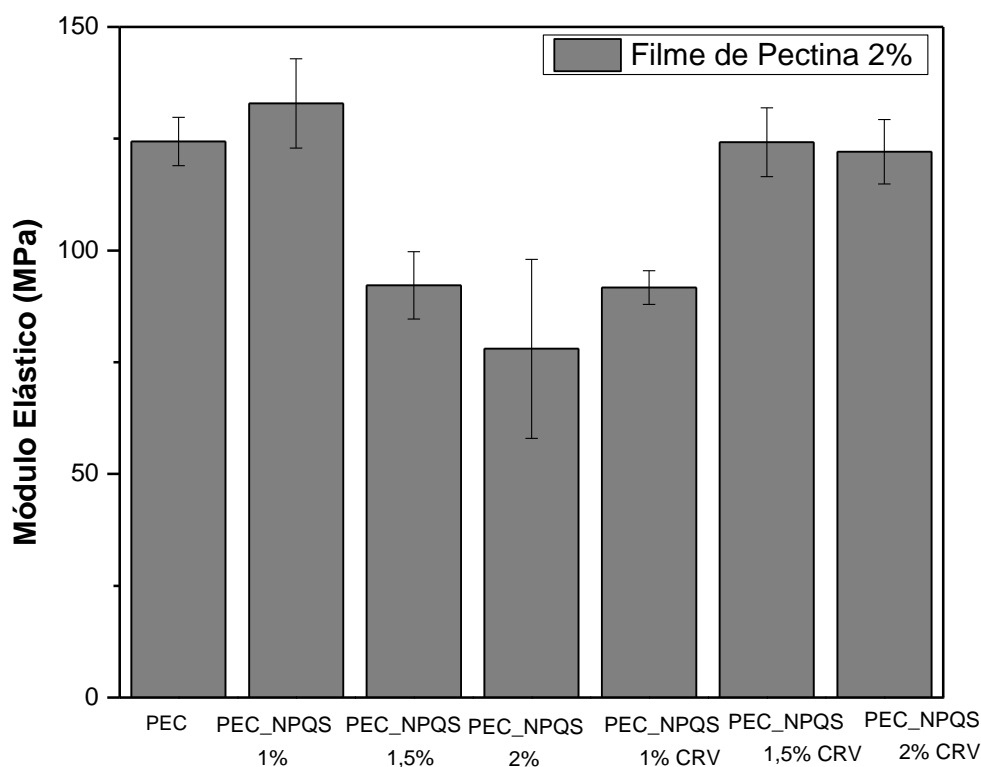


FIGURA 5.20: Módulo Elástico de todos os filmes de pectina 2% e os nanocompósitos com e sem carvacrol (PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV).

Os resultados obtidos para as propriedades mecânicas mostraram que somente a formulação do filme PEC2%_NPQS 1% apresentou diferenças estatísticas com nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey exibindo um incremento destas propriedades. O filme de PEC2%_NPQS 1% apresentou maior tensão máxima, quando comparados aos filmes de pectina 2% controle e aos nanocompósitos com 1,5 e 2% de NPQS com e sem carvacrol. A incorporação de 1% de NPQS que resultou em aumentos de quase 100%, pode ser explicada pela maior interação secundária de ligação de hidrogênio entre os grupos aminos (NH_3^+) das NPQS e os grupos carboxílicos da pectina. Para as formulações dos nanocompósitos (1,5 e 2% NPQS) a tensão máxima dos filmes não obteve diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação ao filme controle, o que pode ser atribuído à aglomeração das NPQS, formando pontos de concentração de tensão e ruptura nos filmes (Figura 5.12 d). A adição de carvacrol na

estrutura dos filmes de PEC2%_NPQS 1% resultou em um aumento da resistência à tração ao se comparar com os filmes de pectina 2% e PEC2%_NPQS 1,5%_CRV e PEC2%_NPQS 2%_CRV. Isto está associado ao fato das NPQS estarem bem dispersas na matriz de pectina neste caso. Ao avaliar os dados de tensão dos filmes de PEC2%_NPQS 1% e PEC2%_NPQS 1%_CRV, o carvacrol pode ter agido como plastificante, reduzindo as interações secundárias entre PEC-PEC e PEC-NPQS. Segundo SHOJAEE-ALIABADIA et al. (2013), a diminuição da tensão máxima pode ser explicada pela substituição das interações existente entre as cadeias poliméricas por fracas interações entre a cadeia da pectina e o carvacrol.

A menor alongação na ruptura está de acordo com o resultado de tensão máxima dos filmes de PEC2%_NPQS 1% ($E_r = 0,5\%$), pois devido às fortes interações PEC-NPQS, presentes no filme, as moléculas poliméricas estão mais emaranhadas, necessitando de mais energia para desemaranhar as cadeias até a ruptura, o que promove menores valores de alongação e maiores de resistência à tração. A Tabela 5.8 mostra os valores de propriedades mecânicas para todas as formulações de filmes de pectina 2%. O aumento na porcentagem de deformação sugere que o carvacrol atua como agente plastificante, podendo alterar a conformação das cadeias poliméricas, possibilitando um maior estiramento das cadeias, fornecendo maior deformação aos filmes. Estes dados são corroborados com FABRA et al. (2008), que relataram que os óleos essenciais podem estar no filme sob a forma de gotículas, a temperatura ambiente e podendo ser deformado, e portanto deixando os filmes mais extensíveis. Desta forma, o carvacrol na concentração de 10% (m/m) pode ter atuado como plastificante, diminuindo a resistência à tração do filme PEC2%_NPQS 1%. BOTRE et al. (2010) descreveram que adição de óleo essencial de orégano em filmes a base de resina celulósica obtiveram valores de deformação no ponto de ruptura maiores que os filmes sem óleo essencial.

O valor do módulo elástico (Módulo de Young) mede a rigidez dos materiais. As composições dos filmes diferiram entre si ($p > 0,05$) em relação ao valor do módulo de elasticidade, tendo os filmes com adição de carvacrol apresentados valores maiores quando comparados com os filmes de PEC2%_NPQS 1,5% e PEC2%_NPQS 2%. Dessa forma, um valor de módulo de elasticidade baixo caracteriza um filme de menor rigidez.

DU et al. (2009a) estudaram filmes comestíveis à base de purê de maçã e pectina com adição de pimenta da Jamaica, óleos essenciais de canela e cravo e observaram que a incorporação de OE diminuiu significativamente ($p > 0,05$) a resistência à tração e módulo elástico dos filmes.

Otoni et al. (2017) correlacionou as resistências à tração de filmes comestíveis baseados em frutas e vegetais com plásticos utilizados em embalagens de alimentos. Os valores para os filmes comestíveis variam de 0,03 a 30 MPa. Já os plásticos ficaram em uma faixa ampla, podendo variar de 4 Mpa (PCL) até os mais resistentes como poli (tereftalato de etileno) (PET, 157 a 177 MPa). De acordo com estes dados os filmes de pectina produzidos por *casting* contínuo e batelada neste trabalho podem ser comparados com os polímeros sintéticos, como o Poliestireno (31 a 49 MPa), Polietileno (17 MPa) e Polipropileno (30 MPa).

TABELA 5-8: Valores médios e desvio padrão da tensão máxima, módulo elástico e alongação na ruptura dos filmes de PEC 2% e dos nanocompósitos com ou sem carvacrol.

	Tensão Máxima (MPa)		Alongação na Ruptura (%)		Módulo Elástico (MPa)	
	Sem CRV	Com CRV	Sem CRV	Com CRV	Sem CRV	Com CRV
Pectina 2%	25,0 ± 8,0 ^a		0,7 ± 0,3 ^b		124,4 ± 5,4 ^{b,c}	
PEC2%_NP QS 1%	48,3 ± 4,1 ^{b,A}	38,4 ± 1,6 ^{b,B}	0,5 ± 0,2 ^{b,A}	1,4 ± 0,2 ^{a,B}	132,9 ± 10,0 ^{c,A}	91,7 ± 3,8 ^{a,B}
PEC2%_NP QS 1,5%	29,9 ± 4,6 ^{a,A}	26,5 ± 2,3 ^{a,b,A}	1,3 ± 0,2 ^{a,A}	1,1 ± 0,1 ^{a,b,A}	92,2 ± 7,5 ^{a,b,A}	124,2 ± 7,7 ^{b,B}
PEC2%_NP QS 2%	23,3 ± 2,0 ^{a,A}	24,1 ± 2,0 ^{a,A}	1,4 ± 0,1 ^{a,A}	1,6 ± 0,2 ^{a,A}	78,0 ± 20,0 ^{a,A}	122,1 ± 7,2 ^{b,B}

^{a,b,c} Numa mesma coluna com valores diferentes ($p > 0,05$) são seguidos por letras diferentes.

^{A,B} Numa mesma linha com valores diferentes ($p > 0,05$) são seguidos por letras diferentes.

A Tabela 5-9 apresenta os valores médios de propriedades mecânicas para os filmes de pectina 5% produzidos por *casting* contínuo e *casting* batelada. De acordo com os resultados, não houve diferenças estatística ($p < 0,05$) entre ambos os métodos testados neste trabalho. Com a adição de nanoestruturas a matriz polimérica de pectina, houve aumento significativo em ambos os métodos. O incremento na tensão máxima pode ser atribuído as fortes interações de ligação de hidrogênio entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxílicos da pectina, como foi discutido acima. Ao comparar os

filmes com concentrações diferentes de PEC (2 e 5 %), há diferença estatística para a formulação PEC2%_NPQS 2% e PEC5%_NPQS 2%. Esta distinção foi conferida as NPQS não estarem bem distribuídas na matriz.

TABELA 5-9: Valores médios e desvio padrão da tensão máxima, módulo elástico e alongação na ruptura dos filmes de PEC 5% e PEC5%_NPQS 2% preparados por casting contínuo e batelada.

Filme	Tensão Máxima (MPa)	Elongação na Ruptura (%)	Módulo Elástico (GPa)
PEC 5% Batelada	30,6 ± 0,6 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	9,0 ± 0,4 ^a
PEC 5% casting contínuo	34,6 ± 3,4 ^a	2,2 ± 0,4 ^a	8,5 ± 0,9 ^b
PEC 5% Batelada	30,6 ± 0,6 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	9,0 ± 0,4 ^a
PEC5%_NPQS2% Batelada	49,5 ± 9,5 ^b	1,3 ± 0,2 ^b	8,5 ± 0,1 ^a
PEC 5% casting contínuo	34,6 ± 3,4 ^a	2,2 ± 0,4 ^a	8,5 ± 0,9 ^b
PEC5%_NPQS2% casting contínuo	51,0 ± 3,0 ^b	1,2 ± 0,2 ^b	7,9 ± 0,4 ^b

^{a,b} Numa mesma coluna com valores diferentes ($p > 0,05$) são seguidos por letras diferentes.

5.2.5 – Análises Térmicas

Esta análise é considerada muito importante, pois é possível observar a variação da massa de um polímero em função do tempo ou temperatura, assim podemos avaliar a faixa de temperatura de estabilidade térmica dos mesmos em relação a sua composição química, a temperatura em que começam a se

decompor e o acompanhamento de reações como oxidação, combustão e desidratação (CANEVAROLO, 2004).

5.2.5.1 – Termogravimetria

Primeiramente analisou-se os compostos separadamente da matriz de pectina para descobrir quaisquer influências nas temperaturas de degradação do produto final. Na Figura 5.7 (curvas termogravimétricas das NPQS) foram apresentado as TD das NPQS e quitosana pura. A curva termogravimétrica do carvacrol esta representada na Figura 5.22, e os filmes de pectina 2% puros e os nanocompósitos estão representados na Figura 5.23.

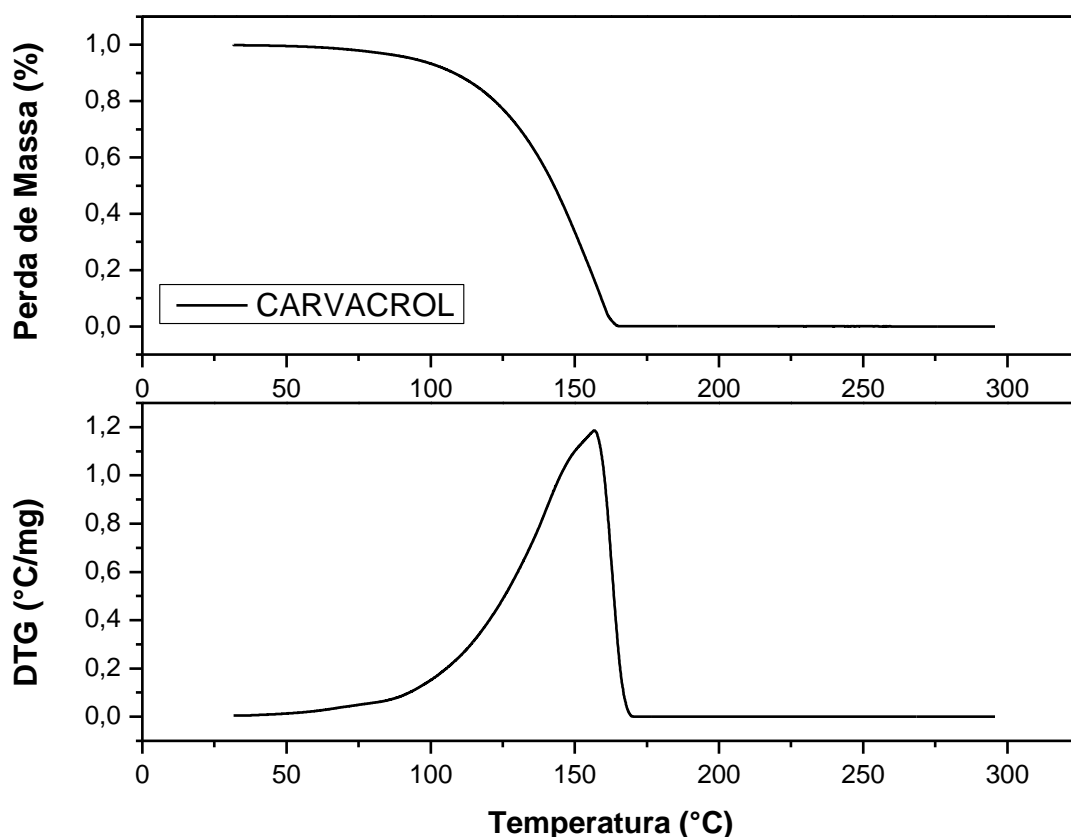


FIGURA 5.21: Curva termogravimétrica do carvacrol.

O carvacrol teve perda de massa entre a temperatura onset correspondente a 126 °C e T offset referente a 163 °C. A taxa máxima de perda

de massa foi observada em 157 °C (Figura 5.22). KREPKER et al. (2017) observaram as interações do carvacrol em alimentos para minimizar as alterações organolépticas e obtiveram a perda de massa do carvacrol na faixa entre 100 e 140 °C para T onset e o valor de 160 °C para T offset, que corroboram com os resultados encontrados neste trabalho.

Para os filmes de pectina pura e os nanocompósitos com e sem carvacrol, observaram-se dois estágios de perda de massa. A pectina tem sua degradação térmica começando em 222,6 °C. Esta degradação acontece até a temperatura de 260 °C com taxa máxima de perda de massa em 235 °C (FIGURA 5.23). Todas as curvas termogravimétricas possuem dois estágios de degradação definidos, o primeiro ocorre entre 220 e 250 °C e o segundo entre 410 e 490 °C.

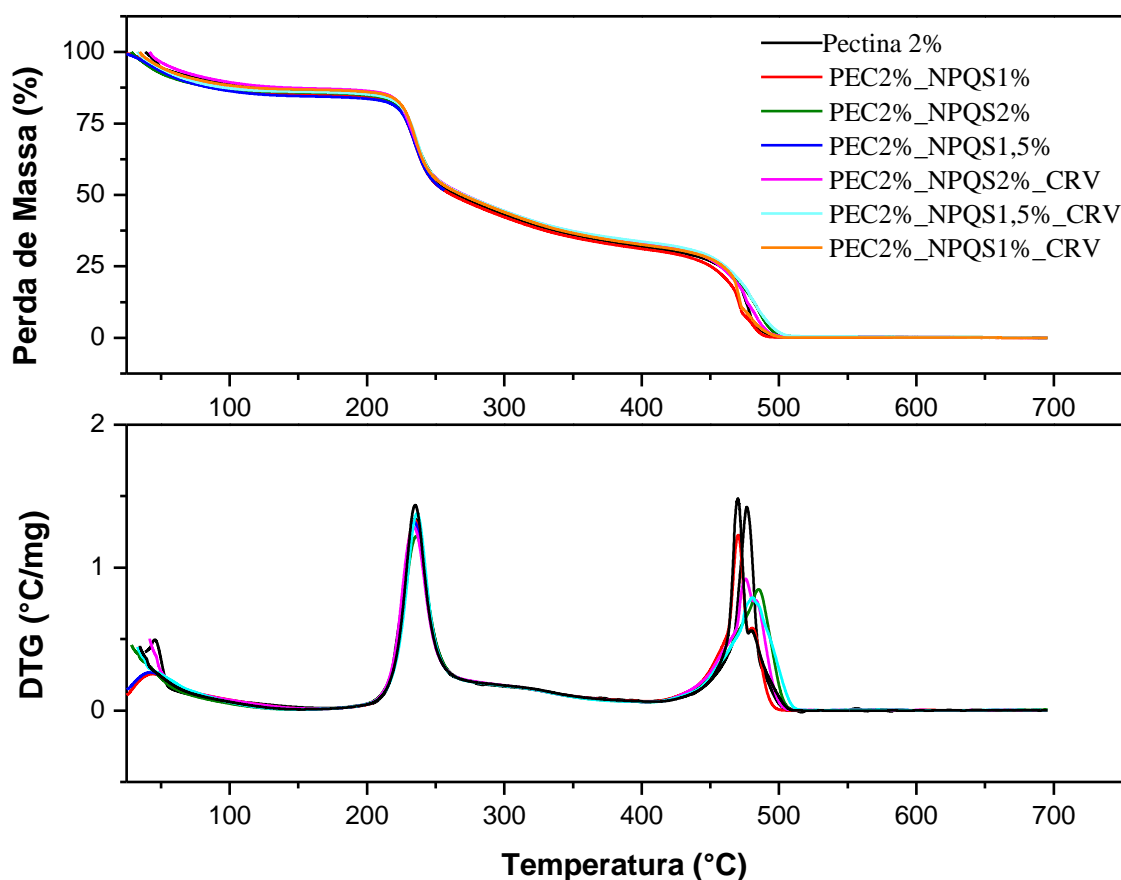


FIGURA 5.22: Curvas termogravimétricas dos filmes de pectina 2%, PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV.

Na Figura 5.23 podemos identificar um primeiro evento térmico que ocorre até 100 °C referente à perda de massa de até 12%, que foi relacionado à evaporação da água residual do processo. Os filmes de pectina possuem moléculas de água de hidratação, que estão alocadas entre a matriz polimérica do polissacarídeo, estas são liberadas com o aquecimento, diminuindo assim, a massa inicial do filme. A estabilidade térmica dos materiais analisados foi mantida até temperaturas superiores a 200 °C. Segundo MARTELLI et al. (2013), há dois estágios de degradação da pectina, que estão relacionados ao processo de degradação do polissacarídeo, o primeiro estágio de degradação aproximadamente em 230 °C é referente a pirólise dos sacarídeos, amidos e proteínas presentes na molécula de pectina, que são termicamente degradados na atmosfera oxidativa, já o segundo estágio de degradação ocorre em aproximadamente 467 °C relativo a carbonização da amostra produzindo CO₂ e H₂O. Pode-se observar (Tabela 5.10) que a relação NPQS e carvacrol/PEC teve pouca influência sobre os valores de T onset dos filmes. Abaixo a Tabela 5.10 com as temperaturas de degradação.

TABELA 5-10: Valores das temperaturas de degradação (TD) dos filmes de pectina 2% e dos nanocompósitos com e sem carvacrol.

Temperatura de Degradação (°C)		
Filmes	TD 1	TD 2
Pectina 2%	235	468
PEC2%_NPQS 1%	237	467
PEC2%_NPQS 1,5%	235	470
PEC2%_NPQS 2%	236	470
PEC2%_NPQS 1%_CRV	235	470
PEC2%_NPQS1,5%_CRV	235	474
PEC2%_NPQS 2%_CRV	234	476

Como mostrado na Tabela 5-10 não houve diferença da primeira TD com adição das NPQS e carvacrol, o que pode ser explicado devido a não interação dos compostos adicionados com a pectina. Na segunda TD houve um aumento de 468 °C da pectina pura para 476 °C dos nanocompósitos PEC 2%_NPQS 2%_CRV, o que indica que pode existir uma ligação de hidrogênio entre a quitosana e a pectina reduzindo a decomposição térmica em comparação com os filmes apenas com pectina. BIGUCCI et al. (2008) atribui este incremento há formação de ligações iônicas entre quitosana e pectina e pode estar correlacionada com a perda de organização quando os filmes são expostos a degradação térmica.

5.2.5.2 – Calorimetria Exploratória Diferencial

As análises de DSC foram feitas com a finalidade de tentar investigar a Tg dos componentes puros e também possíveis interações entre a matriz, NPQS e carvacrol. As curvas obtidas para os filmes de pectina 2%, PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV estão mostradas nas Figuras 5.24 e 25.

A pectina em pó apresentou um evento endotérmico que ocorreu em uma temperatura máxima de aproximadamente 121 °C, caracterizada pela perda de massa da amostra, pelo processo de evaporação das moléculas de água presentes na pectina, devido ao seu caráter hidrofílico. A estrutura química da pectina apresenta grupos polares, com capacidade de absorver grande quantidade de água (Figura 2.2).

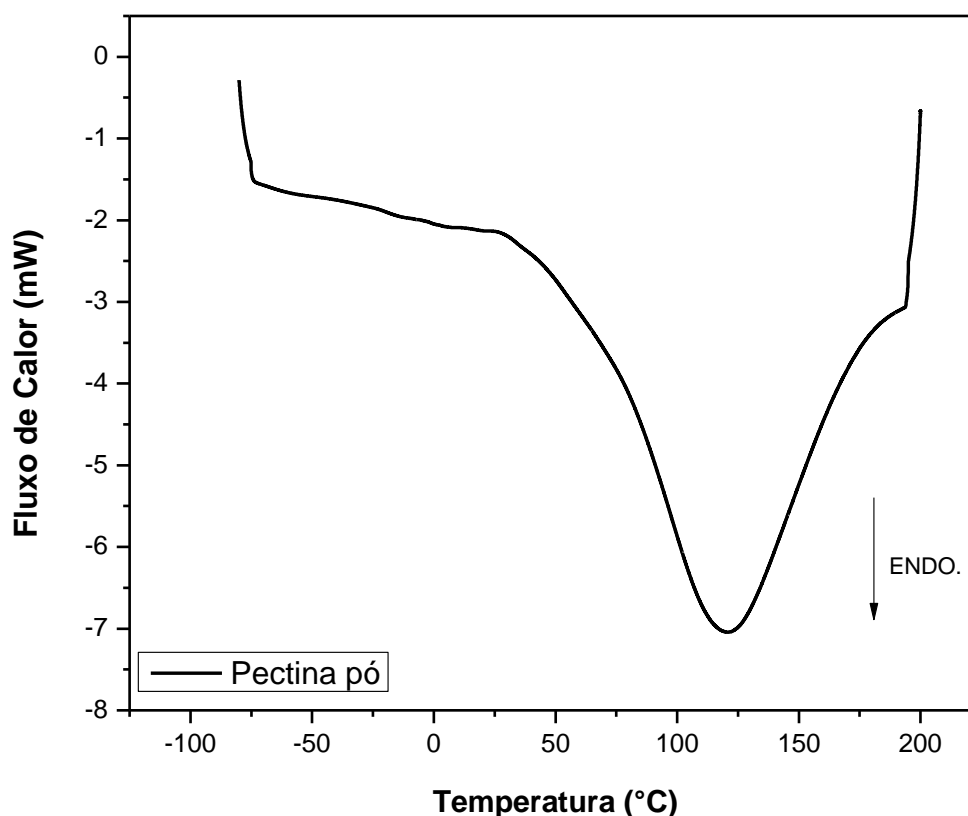


FIGURA 5.23: Curva de calorimetria exploratória diferencial da pectina.

A Figura 5.25 apresenta as curvas de DSC dos filmes de pectina 2%, PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV. A curva da pectina apresenta uma faixa de temperatura do pico endotérmico (TPE) a 111 °C e 135 °C (Tabela 5.11), que estão relacionados com a evaporação de água associada aos grupos hidrofílicos do polímero (FORD, 1999), seguido por um fenômeno exotérmico em torno de 240 °C, relacionado à decomposição das cadeias poliméricas (SARMENTO et al., 2006).

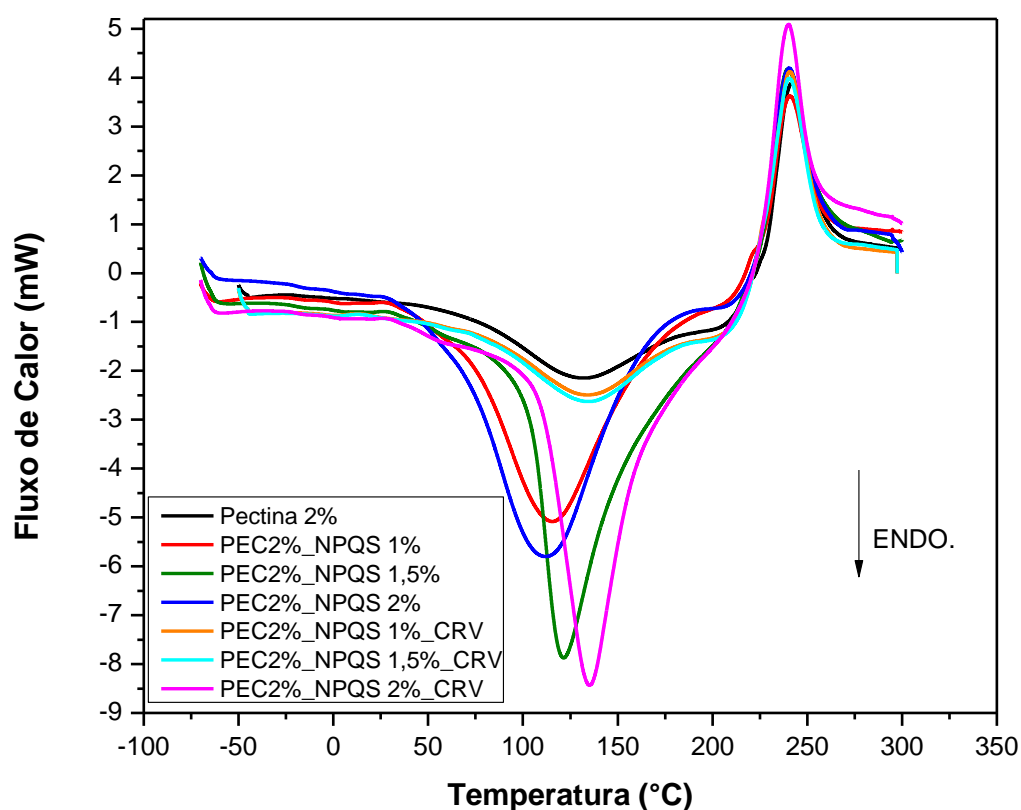


FIGURA 5.24: Curva de calorimetria exploratória diferencial dos filmes de pectina 2%, PEC_NPQS e PEC_NPQS_CRV.

Uma transição vítrea (T_g) foi observada para todas as formulações dos filmes de pectina 2% em uma faixa de temperatura de - 50 a - 30 °C, que está de acordo com MARTELLI et al. (2013). A Figura 5.26 apresenta uma aproximação da imagem 5.25 para o filme de pectina 2%.

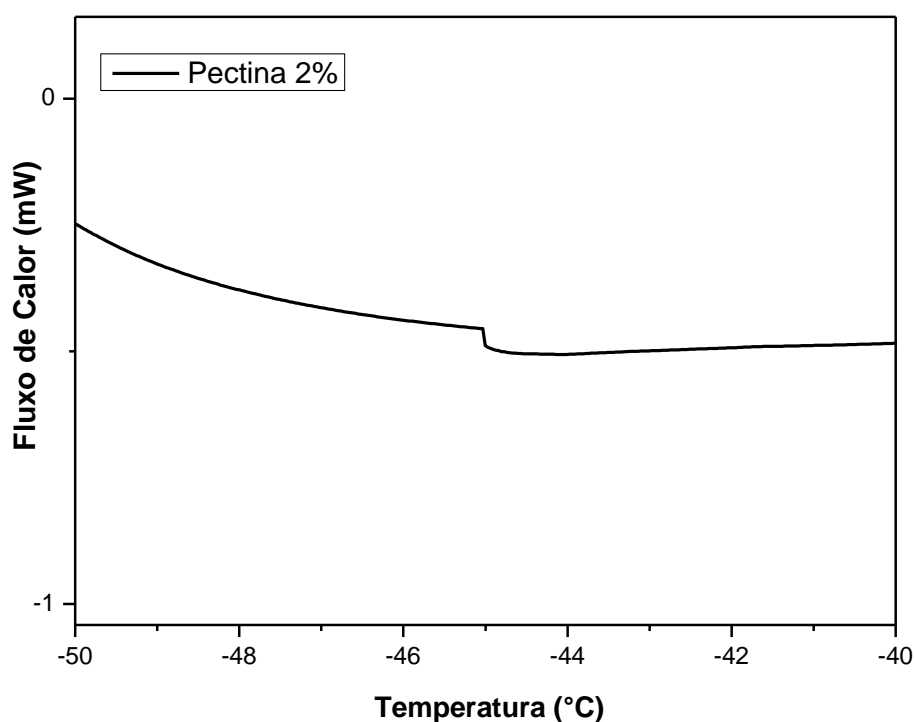


FIGURA 25.6: Região aproximada de - 50 a - 40 °C do filme pectina 2%.

Ao comparar as Figuras 5.24 e 5.25 observa-se que o pico de absorção de calor dos filmes de pectina foi menor do que a pectina em pó. As temperaturas dos picos endotérmicos (TPE) reduziram quando os filmes de pectina 2% foram produzidos, contudo, aumentaram com a adição de NPQS. O aumento da TPE e no calor absorvido nos nanocompósitos PEC_NPQS e PEC_NPQS_CRV pode ser atribuído às fortes interações entre a PEC e as NPQS (EL-HEFIAN et al., 2010), necessitando de mais calor para liberar as moléculas de água alocadas na matriz polimérica, o que resultou em uma melhora nas propriedades térmicas com adição de NPQS, como discutido no item 5.3.5.1. Esta observação é baseada no aumento da área do pico de evaporação com a adição de NPQS. NEUFELD e BIANCO-PELED (2017) relataram uma faixa endotérmica da pectina entre 130 °C a 160 °C e relacionaram com a perda de água associada com os grupos hidrofílicos do polímero. De acordo com RAMPINO et al. (2016) após o evento endotérmico de desidratação dos filmes de pectina e NPQS ocorre um evento exotérmico a partir

de 240 °C sugerindo uma estabilização térmica devido à interação de quitosana com pectina e não apenas com o TPP.

Os filmes que obtiveram carvacrol em sua formulação deslocaram os picos endotérmicos devido à ebulição do carvacrol estar próxima a 150 °C. As transições de primeira ordem apresentam variação de entalpia, como mostrado na Tabela 5.11, os filmes nanocompósitos PEC2%_NPQS 2% (385,2 J/g) e PEC2%_NPQS 1,5%_CRV (389,0 J/g) apresentaram maior teor de umidade que os demais, sendo atribuído ao maior caráter hidrofílico destes materiais.

TABELA 5-11: Valores das temperaturas do pico endotérmico (TPE) e da variação de entalpia (ΔH) da pectina e filmes de pectina 2%.

Filme	TPE (°C)	ΔH (J/g)
Pectina pó	159,2	91,0
Pectina 2%	130	74,5
PEC2%_NPQS	113,5	353,0
1%		
PEC2%_NPQS	121,1	279,1
1,5%		
PEC2%_NPQS	111,5	385,2
2%		
PEC2%_NPQS	126,3	267,0
1%_CRV		
PEC2%_NPQS	122,5	389,0
1,5%_CRV		
PEC2%_NPQS	135,4	281,6
2%_CRV		

5.2.6 - Análise de halo de inibição para determinação da atividade antimicrobiana

As amostras de filmes de pectina 2% foram colocadas no ágar inoculado com 100 μ L de suspensão de bactérias que foram espalhadas uniformemente. Devido à hidrofiliçidade dos filmes, estes incharam em contato total com o ágar inoculado, ocorrendo assim um aumento do diâmetro inicial. Os filmes foram testados contra microorganismos gram positivos e negativos para determinar a atividade antimicrobiana. Os filmes de PEC serviram como controle e os nanocompósitos PEC2%_NPQS e PEC2%_NPQS_CRV, foram analisados para determinar potenciais efeitos antimicrobianos dos filmes.

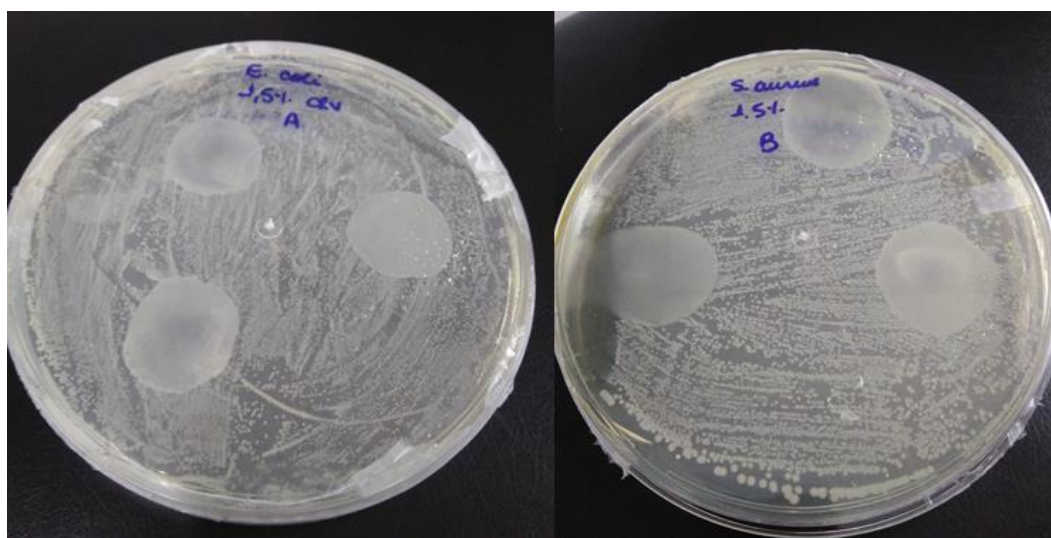


FIGURA 5.27: Apresentam os filmes de PEC 2%_NPQS 1,5%. Em a) com CRV e b) sem CRV para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

O ensaio avaliado pelo método disco de difusão não mostraram nenhum efeito antimicrobiano para os patógenos *S. aureus* e *E. coli* testados.

Ao analisar a atividade antimicrobiana da quitosana em filmes de pectina, esta não inibiu o crescimento dos patógenos (Figura 5.26 b), o que pode ser devido aos grupos NH_3^+ da quitosana estarem interagindo com os íons

carboxilatos (COO^-) da pectina. Em vários estudos encontrados na literatura a quitosana demonstrou atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (DEVLIÉGHÈRE et al., 2004; OUATTARA et al., 2000). Testes feitos para encontrar a CIM mostrou que apenas a fração protonada da quitosana é capaz de atuar como bactericida (FERNANDEZ-SAIZ et al., 2009), pois às moléculas da quitosana estão carregadas positivamente podendo interagir com as membranas carregadas negativamente das bactérias, resultando assim na ruptura das membranas e a morte celular. MARTELLI et al. (2013) relataram que a incorporação de NPQS com 0,2% (m/m) em filmes de pectina com polpa de banana não causou inibição do crescimento bacteriano quando comparado ao filme controle. GOY et al. (2009) afirmaram que deve ser eficaz o contato físico entre as bactérias e as cadeias da quitosana para estabelecer uma interação iônica entre as espécies, efetuando assim a atividade antimicrobiana.

Segundo ZIVANOVIC et al. (2005), uma das possíveis explicações para estes resultados pode ser atribuída a alta concentração do inóculo 10^6 UFC por placa de Petri, o que pode exceder a atividade de inibição tanto da quitosana quanto do carvacrol. A adição de carvacrol nos filmes pectina também não formou halo de inibição, enquanto que o carvacrol puro mostrou atividade antimicrobiana. O possível motivo para a não atividade do carvacrol incorporado nos filmes PEC_NPQS, pode ser devido à perda parcial de compostos de alta volatilidade durante a preparação do filme.

6 - CONCLUSÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que as NPQS preparadas na proporção de 2: 1 (QS:TPP), obtidas pelo método de gelatinização ionotrópica, resultaram em formulações de nanopartículas satisfatórias com uma média de diâmetro de 106 nm. As suspensões coloidais obtidas apresentaram uma boa estabilidade conforme demonstra os dados de potencial Zeta que foram superiores a + 30 mV. Segundo os resultados estatísticos sobre a dispersão das nanopartículas, foi capaz de apresentar reprodutibilidade entre as sínteses para posterior aplicação em nanocompósitos. A carga resultante do sistema formado por quitosana e pectina, onde ocorre a máxima formação do complexo do polieletrólito foi em pH próximo de 4,0. O potencial Zeta para a solução de pectina e NPQS apresentou valor de - 21 mV, resultando em um sistema com excesso de cargas negativas proveniente da quantidade de pectina não associada com as NPQS, devido a maior quantidade de pectina na solução filmogênica.

As formulações de filmes PEC2%_NPQS 1% produzidos por *casting* batelada obtiveram propriedades mecânicas satisfatórias (48 MPa) sendo superiores aos filmes apenas com o polissacarídeo, comportando-se como agente de reforço para os filmes. As imagens de fratura criogênica obtidas por MEV/FEG indicaram uma boa interação entre a matriz e as nanopartículas de quitosana.

Todas as formulações de filmes apresentaram características visuais satisfatórias para aplicação como embalagens, homogêneas, contínua e manuseável. A adição tanto de nanopartículas de quitosana quanto o carvacrol, não apresentaram mudanças nas características visuais.

A propriedade de barreira manteve-se inalterada com a adição de NPQS e carvacrol podendo haver competição entre ambos os efeitos de reforço

produzidos pelas NPQS e do plastificante carvacrol. À presença de NPQS e carvacrol apresentaram efeitos positivos sobre as características térmicas dos filmes, aumentando a estabilidade térmica dos nanocompósitos. Na segunda TD houve um aumento de 468 °C do filme de pectina puro para 476 °C dos nanocompósitos PEC2%_NPQS2%_CRV, o que indica que pode existir uma interação de hidrogênio entre a quitosana e a pectina reduzindo a decomposição térmica em comparação com os filmes apenas com pectina.

Para produzir filmes com capacidade inibitória é necessário fazer mais estudos para aperfeiçoar a concentração de agentes antimicrobianos adicionados na matriz polimérica para assim obter materiais com atividade antimicrobiana apropriada e desempenho físico-mecânico desejado.

Os métodos de obtenção de filmes, *casting* contínuo e descontínuo, obtiveram resultados similares para os filmes de pectina 5%. Os filmes de pectina 2% foram escolhidos neste trabalho para os testes posteriores devido a melhor facilidade de remoção de bolhas presentes na solução de pectina. Estes filmes possuíam propriedades satisfatórias em comparação com os filmes de pectina 5%.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. “Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources”. *Bioresour. Technol.*, 99 (5): 1359, 2008.

ABIPLAST – Associação Brasileira da Indústria do Plástico, Perfil 2015, disponível em: http://file.abiplast.org.br/download/2016/perfil_2015.pdf, acesso em 01/08/2017.

AIDER, M. “Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review”. *LWT - Food Sci. Technol.*, 43(6): 837, 2010.

ALMEIDA, T. L. Desenvolvimento de membrana de quitosana composta de PVAI e quitosana compatível com sistema dermoepidérmico. São Paulo, Programa de Pós Graduação em Ciências em Tecnologia Nuclear - USP, 2009. Dissertação de Mestrado.

ALMEIDA, D. M.; WOICIECHOWSKI, A. L.; WOSIACKI, G.; PRESTES R. A.; PINHEIRO, L. A. “Propriedades físicas, químicas e de barreira em filme formados por blenda de celulose bacteriana e fécula de batata”. *Polímeros*, 23 (4): 538, 2013.

AMARAL, D. S.; CARDELLE-COBAS, A.; do NASCIMENTO, B. M.; Monteiro, M. J.; Madruga, M. S. & Pintado, M. M. “Development of a low fat fresh pork sausage based on chitosan with health claims: impact on the quality, functionality and shelf-life”. *Food Funct*, 6(8): 2768, 2015.

ANITHA, A.; SOWMYA, S.; SUDHEESH KUMAR, P.T.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K.P.; EHRlich, H.; TSURKAN, M.; JAYAKUMAR, R. “Chitin and chitosan in selected biomedical applications”. *Progr. Polym., Sci.*, 39 (9): 1644, 2014.

ANTONIOU, J.; LIU, F.; MAJEED, H.; ZHONG, F. “Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticle: a comparative study”. *Food Hydrocol.*, 44 : 309, 2015.

APPENDINI, P. e HOTCHKISS, J. H. “Review of antimicrobial food packaging”. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 3 : 113, 2012.

ASTM - Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standards Designation: E96-80. In Annual book of American Standard Testing Methods. Philadelphia, PA.

ASTM - Standard Test Method for Surface Wettability and Absorbency of Sheeted Materials Using an Automated Contact Angle Tester (2008). Standards Designation: D5725-99. In Annual book of ASTM International, West Conshohocken, PA.

AZEREDO, H. M. C.; MATTOSO, L.H.C.; WOOD, D.; WILLIAMS, T.G.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; MCHUGH, T.H. "Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers". *J. Food Sci.*, 74 (5): 31, 2009.

BADAWY, M. E. I. & RABEA, E. I. "A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection". *Int. J. Carbohydr. Chem.*, **2011** : 1, 2011.

BALAGUER, M. P.; GOMEZ-ESTACAGAVARA, J. R.; HERNANDEZ-MUNOZ, P. "Functional properties of bioplastics made from wheat gliadins modified with cinnamaldehyde", *J. Agri. Food Chem.*, **59** : 6689, 2011.

BAO, H.; LI, L.; ZHANG, H. "Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan-TPP nanoparticles in aqueous solutions". *J. Colloid. Interface Sci.*, **328** : 270, 2008.

BASIAK, E.; DEBEAUFORT, F.; LENART, A. "Effect of oil lamination between plasticized starch layers on film properties". *Food Chem.*, **195** : 56, 2015.

BAWA, P.; CHOONARA, Y. E.; DU, L. C. T.; KUMAR, P., NDESENDO, V. M.; MEYER, L. C.; PILLAY, V. "A novel stimuli-synchronized alloy-treated matrix for spacedefined gastrointestinal delivery of mesalamine in the Large White pig model". *J. Control. Release.* 166 (3): 234, 2013.

BIGUCCI, F.; LUPPI, B.; CERCHIARA, T.; SORRENTI, M.; BETTINETTI, G.; RODRIGUEZ, L.; ZECCHI, V. "Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin". *Eur. J. Pharm. Sci.*, 35 (5): 435, 2008.

BIGUCCI, F.; LUPPI, B.; MONACO, L.; CERCHIARA, T.; ZECCHI, V. "Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin". *J. Pharm. Pharmacol.* **61** : 41, 2009.

BILIA, A., GUCCIONE, C., ISACCHI, B., RIGHESCHI, C., FIRENZUOLI, F., & BERGONZI, M. "Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach". *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2014** : 1, 2014.

BOANINI, E.; RUBINI, K.; PANZAVOLTA, S.; BIGI, A. "Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate", *Acta Biomater.*, **6** (2): 383, 2010.

BONILLA, J.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. "Edible Coating for Shelf-Life Extension of Fresh Banana Fruit Based on Gamma Irradiated Plasticized Poly(vinyl alcohol)/Carboxymethyl Cellulose/Tannin Composites". *J. Food Eng.*, **110** : 208, 2012.

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

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. & ALONSO, M. "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers". *J. Appl. Polym. Sci.*, **63** : 125, 1997.

CAMPOS-REQUENA, V. H.; RIVAS, B. L.; PÉREZ, M. A.; GARRIDO-MIRANDA, K. A.; PEREIRA, E. D. "Polymer/clay nanocomposite films as active packaging material: modeling of antimicrobial release". *Eur. Polym. J.*, **71** : 461, 2015.

CARVALHO, R. A. & GROSSO, C. R. F. "Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde". *Food Hydrocol.*, **18** : 717, 2004.

CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. "Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films: a comparative study". *Food Hydrocol.*, **27** : 175, 2012.

CHAICHI, M.; HASHEMI, M.; BADI, F. & MOHAMMADI, A. "Preparation and characterization of a novel bionanocomposite edible film based on pectin and crystalline nanocellulose". *Carbohydr. Polym.*, **157** : 167, 2016.

CHANG, P. R.; JIAN, R.; YU, J.; MA, X. "Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticised –starch composites". *Food Chem.*, **120** : 736, 2010.

COIMBRA, P.; FERREIRA, P.; SOUSA, H. C.; BATISTA, P.; RODRIGUES, M. A.; CORREIA, I. J.; GIL, M. H. "Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications". *Int. J. Biol. Macromol.*, **48** : 112, 2011.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; DE FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P. & TEIXEIRA, E., "Chitosan: an amino polysaccharide with functional characteristics". *Alim. Nutr.*, 16 (2): 195-205, 2005.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A. & VOILLEY, A. "Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review". *Crit. Rev. Food Scien.*, **38** : 299, 1998.

BERNHARDT, D. C.; CAROLINA, D. P.; FISSORE, E. N.; NOBILI, M. D. DE & ROJAS, A. M. "Pectin-based composite film: effect of corn husk fiber concentration on their properties". *Carbohydr. Polym.*, **164** : 13, 2017.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. "Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables". *Food Microbiol.*, **21** : 703, 2004.

DMOUR, I. & TAHA, M. O. "Novel Nanoparticles Based on Chitosan-Dicarboxylate Conjugates via Tandem Ionotropic/Covalent Crosslinking with Tripolyphosphate and Subsequent Evaluation as Drug Delivery Vehicles". *Int. J. Pharm.*, **529** : 15, 2017.

DU, W. X.; OLSEN, C. W.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. "Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities". *J. Food Sci.*, **74** : 372, 2009.

DU, W. X.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; WOODS, R.; BREKSA, A. P.; MCHUGH, T. H.; FRIEDMAN, M.; Levin, C. E.; Mandrell, R. "Sensory evaluation of baked chicken wrapped with antimicrobial apple and tomato edible films formulated with cinnamaldehyde and carvacrol". *J. Agric. Food Chem.*, 60 (32): 7799, 2012.

DUDHANI, A. R. & KOSARAJU, S. L. "Bioadhesive chitosan nanoparticles: preparation and characterization". *Carbohydr. Polym.* **81** : 243, 2010.

EL-HEFIAN, E. A.; NASEF, M. M.; YAHAYA, A. H.; KHAN, R. A. "Preparation and characterization of chitosan/agar blends: rheological and thermal studies". *J Chil. Chem. Soc.*, **55** : 130, 2010.

ESPITIA, P. J. P.; DU, W. X.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; SOARES, N. F. F. & MCHUGH, T. H. "Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties—a review". *Food Hydrocol.*, **35** : 287, 2014.

FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. "Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures". *J. Food Eng.*, **85** : 393, 2008.

FDA (2013) Part 184 - Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. Subpart B - Listing of specific substances affirmed as GRAS, 184.1588-pectins.

FELDMAN, D. "Polymer Barrier Film". *J. Polym. Env.*, **9** : 49, 2001.

FENG, Y. & XIA, W. "Preparation, characterization and antibacterial activity of watersoluble O-fumaryl-chitosan". *Carbohydr. Polym.* **83** : 1169, 2011.

FERNANDEZ-SAIZ, P.; LAGARON, J. M. & OCIO, M. J. "Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area". *Food Hydrocol.*, **23** : 913, 2009.

FORD, J. L. "Thermal analysis of hydroxypropylmethylcellulose and methylcellulose: powders, gels and matrix tablets". *Int. J. Pharm.*, **179** : 2927, 1999.

FRAEYE, I.; DUVETTER, T.; DOUNGLA, E.; VAN LOEY, A. & HENDRICKX, M. "Fine-tuning the properties of pectinecalcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions". *Trends Food Sci. Technol.*, 21(5): 219, 2010.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L. & KROCHTA, J. M. "Edible coatings and films based on proteins. In Edible coatings and films to improve food quality. Krochta JM, Baldwin EA, Nisperos-Carriedo M, Editors. Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster USA., 1994.

GIANCONE, T.; TORRIERI, E.; MASI, P.; MICHON, C. "Protein-polysaccharide interactions: Phase behaviour of pectin-soy flour mixture". *Food Hydrocol.*, **23** : 1263, 2009.

GOMATHI, T.; PRASAD, P. S.; SUDHA, P. N.; ANIL, S. "Size optimization and *in vitro* biocompatibility studies of chitosan nanoparticles". *Int. J. Biol. Macromol.*, **104** : 1794, 2017.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LACEY, A. L. DE.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. "Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation". *Food Microbiol.*, 27 (7): 889, 2010.

GONZÁLEZ-MIRA, E.; NIKOLIĆ, S.; GARCÍA, M. L.; EGEA, M. A.; SOUTO, E. B.; CALPENA, A. C. "Potential Use of Nanostructured Lipid Carriers for Topical Delivery of Flurbiprofen". *J. Pharm. Sci.*, **100** : 242, 2010.

GOY, R. C.; BRITTO D. & ASSIS, O. B. G. "A review of the antimicrobial activity of chitosan". *Polym. Sci.. Technol.*, **19** : 241, 2009

GOYCOOLEA, F. M.; VALLE-GALLEGO, A.; STEFANI, R.; MENCHICCHI, B.; DAVID, L.; ROCHAS, C.; SANTANDER-ORTEGA, M. J.; ALONSO, M. J. "Chitosan-based nanocapsules: physical characterization, stability in biological media and capsaicin encapsulation". *Colloid Polym. SCI.*, **290** : 1423, 2012.

GUARDA, A., RUBILAR, J.F., MILTZ, J., GALOTTO, M.J. "The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol". *INT. J. Food Microbiol*, 146 (2): 144, 2011.

HOSSEINI, S.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; & FARAHMANDGHAVI, F. "Two-step method for encapsulation of oregano oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study". *Carbohydr. Polym.*, **95** : 50, 2013.

HU, J., Wang, X., Xiao, Z., & Bi, W. "Effect of chitosan nanoparticles loaded with cinnamon essential oil on the quality of chilled pork". *Food Sci. Technol.*, **63** : 519, 2015.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T. & MEYER, R.L. “Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components”. *Front. Microbiol.*, **3** : 12, 2012.

IL'INA, A.V. & VARLAMOV, V.P. “Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes: A Review”. *A. Biochem. Microbiol.*, 41 (1): 5, 2005.

IPEA - Instituto de pesquisa econômica aplicada, “Diagnóstico dos Resíduos Sólidos Urbanos – 2012”, disponível em <http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/121009_relatorio_residuos_solidos_urbanos.pdf>, acesso em 02/08/2017.

JIA, D.; FANG, Y.; YAO, K. “Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan-chitosan-soy protein isolate edible films”. *Food Bioprod. Process.*, 87 (1): 7, 2009.

KEAWCHAOON, L., & YOKSAN, R. “Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles”. *Colloids Surf. B*, **84** : 163, 2011.

KIM, J.; MARSHALL, M. R. & WEI, C. “Antimicrobial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens”. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (11): 2839, 1995.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K. & PARK, H. J. “Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review”. *Int. J. Food Microbiol.*, 144 (1): 51, 2010.

KREPKER, M.; SHEMESH, R.; POLEG, Y. D.; KASHI, Y.; VAXMAN, A. & SEGAL, E. “Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity”. *Food Control*, **76** : 117, 2017.

KEAWCHAOON, L. & YOKSAN, R. “Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles”. *Colloids Surf., B.*, **84** : 163, 2011.

LAMBERT, R. J.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. & NYCHAS, G. J. “A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol”. *J. Appl. Microbiol.*, 91 (3): 453, 2001.

LAUS, R.; COSTA, T. G.; SZPOGANICZ, B. & FÁVERE, V. T. “Adsorption and desorption of Cu (II) and Pb (II) ions using chitosan crosslinked with

epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent”. *J. Hazardous Mater.*, **183** : 233, 2010.

LEGER, L. & JOANNY, J. F. “Liquid Spreading”. *Rep. Prog. Phys.* 55 (4): 431, 1992.

LEKJING, S. “A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage”. *Meat Sci*, **111** : 192, 2016.

LIM, L. Y. & WAN, L. S. C. “Heat treatment of chitosan films”. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 21 (7): 839, 1995.

LIMA, L. A. Nanopartículas de quitosana/Tripolifosfato de sódio obtidas via gelatinização iônica para nanoencapsulação de quercetina. Brasília, Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais – UnB, 2013. Dissertação de mestrado.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; PICHARDO, S.; MAISANABA, S.; PUERTO, M.; PRIETO, A. I. GUTIERREZ-PRAENA, D.; JOS, A.; CAMEAN, A. M. “In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: a review”. *Food Chem. Toxicol.*, **81**: 9, 2015.

LOREVICE, M. V. Desenvolvimento de filmes nanocompósitos para aplicação como embalagem comestível. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2015. Dissertação de mestrado.

LUO, Y. & WANG, Q. “Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery”. *Int. J. Biol. Macromol.*, **64** : 353, 2014.

LUQUE-ALCARAZ, A. G.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; VELAZQUEZ-CONTRERAS, C. A.; ACOSTA-SILVA, A. L.; SANTACRUZ-ORTEGA, H. DEL C.; BURGOS-HERNANDEZ, A.; ARGÜELLES-MONAL, W. M. & PLASCENCIA-JATOMEA, M. “Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle*) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores”, *J. Nanomater.*, **2016** : 1, 2016.

MA, W.; TANG, C.; YIN, S.; YANG, X.; WANG, Q.; LIU, F. & WEI, Z. “Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil”. *Food Res. Int.*, **49** : 572, 2012.

MACIEL, V. B. V. Complexos dos polieletrólitos quitosana e pectina para obtenção de sistemas carreadores de compostos bioativos. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – Unicamp, 2015a. Tese de doutorado.

MACIEL, V. B. V.; YOSHIDA, C. M. P. & FRANCO, T.T. “Chitosan/Pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator”. *Carbohydr. Polym.*, **132** : 537, 2015b.

MANSO, S.; PEZO, D.; GOMEZ-LUS, R. & NERIN, C. “Diminution of a flatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil”. *Food Control*, **45** : 101, 2014.

MARTELLI, M. R.; BARROS, T. T.; MOURA, M. R. DE; MATTOSO, L. C. H. & ASSIS, O. B. G. “Effect of chitosan nanoparticles and pectin content on mechanical properties and water permeability of banana puree films”. *J. Food Sci.*, **78** : 98, 2013.

MATSAKIDOU, A.; BILIADERIS, C.G. & KIOSSEOGLOU, V. “Preparation and characterization of composite sodium caseinate edible films incorporating naturally emulsified oil bodies”. *Food hydrocol.*, **30** : 232, 2013.

MENZEL, C.; OLSSON, E.; PLIVELIC, T. S.; Andersson, R.; Johansson, C.; Kuktaite, R.; Järnström, L. & Koch, K. “Molecular structure of citric acid cross-linked starch films”. *Carbohydr. Polym.*, **96** : 270, 2013.

MISHRA, R. K.; BANTHIA, A. K.; & MAJEED, A. B. A. “Pectin based formulations for biomedical applications: a review”. *Asian J. Pharm. Clinical*, 5(4): 1, 2012.

MOGOŞANU, G. D. & GRUMEZESCU, A. M. “Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing”. *Int. J. Pharm.*, 463 (2): 127, 2014.

MORRIS, G.A., Castile, J., Smith, A., Adams, G.G. & Harding, S.E. “The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP)–chitosan nanoparticles”. *Carbohydr. Polym.* **84** : 1430, 2011.

MOURA, M. R. DE; AOUADA, F. A. & MATTOSO, L. H. C. “Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid”. *J. Colloid Interf. Sci.*, **321**:477, 2008.

MOURA, M. R. DE; AOUADA, F. A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. & MATTOSO, L. H. C. "Improved barrier and mechanical properties of hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles". *J. Food Eng.*, **92** : 448, 2009a.

MOURA, M. R. DE. Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2009b. Tese de doutorado

MOURA, M. R. DE; LOREVICE, M. V.; MATTOSO, L. H. C. & ZUCOLOTTI, V. "Highly stable, edible cellulose films incorporating chitosan nanoparticles". *J. Food Sci.*, 76 (2): 25, 2011a.

MOURA, M. R. DE; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; WOOD, D. F.; OTONI, C. G. & MATTOSO, L. H. C. "Miniaturization of cellulose fibers and effect of addition on the mechanical and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films". *J. Food Eng.*, **104** : 154, 2011b.

MOURA, M. R. DE; AOUADA, F. A.; SOUZA, J. R. & MATTOSO, L. H. C. "Preparation of new active edible nanobiocomposite containing cinnamon nanoemulsion and pectin". *Polímeros*, 24(2): 1, 2014.

MURA, C.; NÁCHER, A.; MERINO, V.; MERINO-SANJUAN, M.; CARDA, C.; RUIZ, A.; MANCONI, M.; LOY, G.; FADDA, A. M. & DIEZ-SALES, O. "N-Succinyl-chitosan systems for 5-aminosalicylic acid colon delivery: in vivo study with TNBS-induced colitis model in rats". *Int. J. Pharm.*, **416** : 145, 2011.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NDOTI-NEMBE, A.; VU, K. D.; DOUCET, N. & LACROIX, M. "Effect of combination of essential oils and bacteriocins on the efficacy of gamma radiation against *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*". *Int. J. Radiat. Biol.*, 89 (10): 794, 2013.

NEUFELD, L. & BIANCO-PELED, H. "Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles". *Int. J. Biol. Macromol.*, **101**: 852, 2017.

NUSSINOVITCH, A. "Biopolymer films and Composite Coating". Kasapis, Norton, and Ubbink: Modern Biopolymer Science, ISRAEL, 2009. Elsevier Inc.

OTONI, C. O.; SOARES, N. DE F. F.; SILVA, W. A.; MEDEIROS, E. A. A. & JUNIOR, J. C. B. "Use of Allyl Isothiocyanate-containing Sachets to Reduce *Aspergillus flavus* Sporulation in Peanuts". *Packag. Technol. Sci.*, **27** : 549, 2014.

OTONI, C. O.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; AZEREDO, H. M. C.; LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C. & MCHUGH, T. H. Recent advances on edible films based on fruits and vegetables—A Review". *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*,1, 2017 (In Press).

OUATTARA, B; SIMARD, R. E.; PIETTE, G.; BEGIN, A. & ROLLE, R. A. "Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan". *Int. J. Food Microbiol.*, **62** : 139, 2000.

PERALTA-VIDEA, J. R.; ZHAO, L.; LOPEZ-MORENO, M. L.; ROSA, G. DE LA; HONG, J. & GARDEA-TORRESDEY, J. L. "Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010". *J. Hazardous Mater.*, **186** : 1, 2011.

PEREDA, M.; AMICA, G. & MARCOVICH, N. E. "Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films". *Carbohyd. Polym.*, **87** : 1318, 2012.

POLLETO, F. S. BECY, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. Polymeric nanocapsules: concepts and applications. In: Beck, R., Guterres, S., Pohlmann A.(Eds), *Nanocosmectis and Nanomedicines*. Springer, Berlin, 2011, 49 - 68.

PRASHANTH, K. V. H.; KITTUR, F. S. & THARANATHAN, R. N.. "Solid state structure of chitosan prepared under different N-decetylating conditions". *Carbohydr. Polym.*, **50** : 27, 2002.

RAMPINO, A.; BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; BLASI, P.; VIRGILIO, F. & CESÁRO, A. "Chitosan-pectin hybrid nanoparticles prepared by coating and blending techniques", *Eur. J. Pharm. Sci.*, **84** : 37, 2016.

REJINOLD, N. S.; MUTHUNARAYANAN, M.; MUTHUCHELIAN, K.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR. S. V. & JAYAKUMAR, R. "Saponin-loaded chitosan nanoparticles and their cytotoxicity to cancer cell lines *in vitro*". *Carbohyd. Polym.*, **84** : 407, 2011.

RIBEIRO, W. L. C.; MACEDO, I. T. F.; SANTOS, J. M. L; OLIVEIRA, E. F.; FERNANDES CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BESERRA DE

PAULA, H. C. B. & BEVILAQUA, C. M. L. “Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*”. *Exp. Parasitol.*, **135** (1): 24, 2013.

ROLIN, C. In: SEYMOUR, C.; KNOX, P. (Eds.). *Pectins and their Manipulation*, Boca Raton: Blackwell Publishing, 2002, 222-241.

SANCHEZ-GARCIA, M. D.; LOPEZ-RUBIO, A. & LAGARON, J. M. “Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food packaging applications”. *Trends Food Sci. Tech.*, **21** : 528, 2010.

SANDFORD, P.A. IN G. SKJAK-BRAEK, T. ANTHONSEN, & P. A. SANDFORD (Eds.). *Chitin/chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties, and applications*. Amsterdam: Elsevier, 1990.

SARMENTO, B.; MARTINS, S.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; NEUFELD, R. & FERREIRA, D. “Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carriers”. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **12** : 131, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L. L. & POHLMANN, A. R. “Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos”. *Quim. Nova*, **26** : 726, 2006.

SCHREIBER, S. B.; BOZELL, J. J.; HAYES, D. G. & ZIVANOVIC, S. “Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material”. *Food Hydrocol.*, **33** : 207, 2013.

SEOW, Y. X.; YEO, C. R.; CHUNG, H. L. & YUK, H. G. “Plant essential oils as active antimicrobial agents”. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **54** : 625, 2014.

SEVERINO, R.; VU, K. D.; DONSI, F.; SALMIERI, S.; FERRARI, G. & LACROIX, M. “Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against *Listeria monocytogenes* in broccoli florets”. *J. Food Eng.*, **124**: 1, 2014.

SHOJAEI-ALIABADI, S.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MOHAMMADI, A.; GHASEMLOU, M.; OJAGH, S. M.; HOSSEINI, S. M. & KHAKSAR, R. “Characterization of antioxidant-antimicrobial κ -carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil”. *Int. J. Biol. Macromol.*, **52** : 116, 2013.

SILVERSTEIN, R. M. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 3ª Edição, Editora John Wiley and Sons, New York, 1974.

STUART, B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 2004.

SU, J. F.; HUANG, Z.; YUAN, X. Y.; WANG, X. Y. & LI, M. “Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions”. Carbohydr. Polym., **79** : 145, 2010.

SUNG, S.Y., SIN, L.T., TEE, T.T., BEE, S.T., RAHMAT, A.R., RAHMAN, W.A.W.A.; TAN, A. C. & Vikhrman, A. “Antimicrobial agents for food packaging applications”. Trends Food Sci. Tech., **33** : 110, 2013.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J. & ALIPOUR, M.” The bioactivity and toxicological actions of carvacrol”. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 55 (3): 304, 2013.

SYNYTSYA, A.; COPÍCOVÁ, J.; MATEJKA, P. & MACHOVIC, V. “Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins”. Carbohydr. Polym., **54** : 97, 2003.

VAARUM, K. M. & SMIDSROD, O. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, 2ª Edição, New York: Marcel Dekker Inc., 2005, 625.

VALENZUELA, C.; ABUGOCH, L. & TAPIA, C. “Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: mechanical, barrier and structural properties”. LWT – Food Sci. Tech., **50** : 531, 2013.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, R.; VAN BEEST, M.; DE KRUIJF, N. & DEBEVERE, J. “ Developments in the active packaging of foods”. Trends Food Sci. Technol., **10** : 77, 1999.

VIMAL, S.; TAJU, G.; NAMBI, K. N. S.; ABDUL MAJEED, S.; SARATHBABU, V.; RAVI, M. & SAHUL HAMEED, A. “Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish”. Aquac., **14** : 358, 2012.

VIMAL, S.; Abdul MAJEED, S.; TAJU, G.; NAMBI, K. S. N.; SUNDAR RAJ, N.; MADAN, N.; FAROOK, M. A.; RAJKUMAR, T.; GOPINATH, D. & SAHUL HAMEED, A. “Chitosan tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles: preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp”. Acta Tropica., **128** : 486 2013.

VOGLER, E. A. "Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces". *Adv. Colloid Interface Sci.*, **74** : 69, 1998.

WANG, L.; LIU, F.; JIANG, Y.; CHAI, Z.; LI, P.; CHENG, Y.; JING, H. & LENG, X. "Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films". *J. Agric. Food Chem.*, **59** : 12411, 2011.

WORANUCH, S. & YOKSAN, R. "Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation". *Carbohydr. Polym.*, **96** : 578, 2013.

XU, Y. M., DU, Y. M. "Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles". *Int. J. Pharm.*, **250** : 215, 2003.

YINA, Y.; DANGA, Q.; LIUA, C.; YANB, J.; CHAC D.; YUA, Z.; CAO A, Y.; WANGA, Y. & FAND, B. "Itaconic acid grafted carboxymethyl chitosan and its nanoparticles: Preparation, characterization and evaluation". *Int. J. Biol. Macromol.*, **102** : 10, 2017.

ZHAO, M.; BISWAS A.; HU, B.; JOO, K.; WANG P.; GU Z.; TANG, Y. "Redox-responsive nanocapsules for intracellular protein delivery". *Biomaterials*, **32** : 5223, 2011.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. "Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils". *J. Food Sci.*, **70** : 45-51, 2005.