

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

**“NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS:  
MECANISMOS DE ESTABILIDADE E INTERAÇÃO COM PECTINA  
EM BIONANOCOMPÓSITOS PARA APLICAÇÃO EM  
EMBALAGENS ATIVAS”**

**Marcos Vinicius Lorevice\***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: Físico Química

**Orientador(a): Luiz Henrique Capparelli Mattoso**

**\* CAPES**

**São Carlos – SP  
2019**

## Ficha catalográfica

Lorevice, Marcos Vinicius

NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS: MECANISMOS DE ESTABILIDADE E INTERAÇÃO COM PECTINA EM BIONANOCOMPÓSITOS PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS ATIVAS / Marcos Vinicius Lorevice. -- 2019.

152 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Marcos Vinicius Lorevice

Banca examinadora: Dra. Clélia Marques, Dra. Juliana Bernardes, Dra. Elaine Paris, Dr. Hermene Barud

Bibliografia

1. Nanoemulsões de óleos essenciais . 2. Biopolímeros na fabricação de embalagens ativas. 3. Mecanismos de interação polímero-surfactante. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

# Folha de aprovação



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 Tese de Doutorado do candidato Marcos Vinicius Lorevice, realizada em 22/03/2019.

---

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
EMBRAPA

---

Profa. Dra. Clelia Mara de Paula Marques  
UFSCar

---

Profa. Dra. Elaine Cristina Paris  
EMBRAPA

---

Profa. Dra. Juliana da Silva Bernardes  
CNPEM

---

Prof. Dr. Hernane da Silva Barud  
UNIARA

## Dedicatória

*“Dedico aos meu amados pais, Luis António e Maria Cristina. Deus sabe o quanto vocês abdicaram para me dar a oportunidade de chegar aonde cheguei. Aos meus irmãos também pela santa paciência e carinho durante todos esses anos. Pai, Mãe, Natália, Paulo, Otávio e Laura: essa é pra vocês!”*



## Dedicatória

*“Dedico à minha segunda família: os amigos, cuja paciência e amor me ajudaram a chegar até aqui”.*

## Agradecimentos

Peço a permissão de iniciar esses agradecimentos parafraseando um amigo: “Cara, você romantiza a vida científica!”. Eu, na verdade, complementaria que as vezes chego a romantizar a vida em si, e porque não? Expresso isso pois, a partir do momento que inicio os agradecimentos, me permito fechar os olhos e, assim, reviver cada um dos anos, dias, horas que percorri até chegar ao final deste que considero um grande feito. E ao reviver essas emoções, estas se diluem em palavras e ilustram o quanto sinto-me agradecido por cada momento que vivi. E isso não é romantizar? Acredito que sim, e diria mais, é na verdade a minha intenção aqui. E nesse caso, meu prezado leitor, que me dá a chance de mostrar o meu trabalho científico, eu agradeço a você, pouco de muitos que pulam os agradecimentos. A você meu muito obrigado.

Sendo assim, vamos direto ao ponto: esse trabalho não poderia ter sido realizado sem a ajuda indispensável de muitas pessoas, sejam estas do trabalho ou da vida pessoal. E aqui, peço desculpas por um dos meus defeitos: eu não consigo guardar o nome de todos! Por isso, se alguém por acaso aqui não aparecer, saiba que sou sim agradecido pela ajuda.

Agradeço primeiramente à Deus, por existir, por me propiciar condições para poder concluir essa etapa de minha vida. Por ainda, sem eu pedir ou ainda merecer me conceder o dom e gosto pelo conhecimento, pelo ensinar e pelo aprender.

Agradeço aos meus pais, Luís Antônio e Maria Cristina, por terem dado parte da vida deles para eu poder estar aqui escrevendo tais palavras. E claro, dos meus queridos irmãos, Natália, Paulo, Otavio e Laura, pelo carinho, preocupação e paciência.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e se sentiram orgulhosos pelas minhas conquistas. Um agradecimento especial à minha avó madrinha, Ana Maria, pelo carinho em toda essa jornada.

Meu professor e orientador, Luiz Henrique Capparelli Mattoso, obrigado pela orientação e paciência. Se esse trabalho existe, grande parte foi porque o senhor acreditou em mim. Muito obrigado!

Ao Dr. Caio Otoni, amigo, parceiro de pesquisa. Fica difícil listar toda a sua ajuda, meu caro. Contudo, que eu possa expressar o meu agradecimento à todas elas, dos conselhos às colaborações: muito obrigado!

Um agradecimento especial para Giuliana e a Graziela, pois sem vocês esse trabalho não estaria finalizado. Que um dia eu possa retribuir tamanha dedicação de vocês.

Aos siberianos Camila Florêncio, Thalita Bondancia e Angel Rubén da sala Sibéria (antiga sala 34).

À prof. Dra. Márcia e prof. Dr. Fauze, vocês sabem como sou grato pela porta que vocês abriram à 10 anos atrás para mim. Muito obrigado

As pessoas que estiveram comigo, meus amigos: Guilherme Martinez, Marcio Picinin, Thais Oliveira (Ruivette), Tatiane Desiderio, Vanessa Angelotti, Cícero Jeronymo, Tatiane Fachinetti, Felipe e Sara Tiberti, Anna Muno. Amigos em que sempre pedi socorro antes de me perder em meu mundo de ideias, de medos e de dúvidas.

À família TopFitness: Fábio, André (Véio), Tassi, Eder e muitos outros. Lá foi meu lugar de terapia, de risadas e de muito treino pesado! Muito obrigado.

E nessa lista não poderia faltar o clube dos exclusivos: Rodrigo Gaúcho, Rodrigo Garcia, Angel, Vitor, Murilo, e, claro, a turma do futebol. Obrigado a todos.

As novas amizades Cibeli, Max, Erika, Anielle, Carla e, os amigos de longa data da Rep: Fábio, Serjão e Luis. As novas amigas.

Aos amigos “embrapianos” que são tantos que não poderia escrever em apenas algumas linhas, afinal essa jornada que se finaliza aqui, iniciou-se dez anos atrás, então imagina quantos amigos estão, já sairão e ainda virão. Muito obrigado a todos!

A Embrapa Instrumentação pela estrutura para o trabalho, os funcionários em geral, foram dez anos desde a iniciação, conhecendo quase todos, um obrigado especial para vocês. Em especial aos técnicos que sempre me salvaram: Adriana, Alice, Joana, Matteo, Silvine, Viviane.

Um agradecimento especial à Lulliana. Nos conhecemos no início da minha jornada e boa parte dele estivemos juntos. Sou muito grato por tudo que você me ajudou. Quis a vida que não estivéssemos mais juntos, contudo não posso deixar de te agradecer. Muito obrigado!

Durante o doutoramento, tive a oportunidade de me aventurar em terras francesas. Nessa jornada ganhei uma nova família, os quais estão um pouco longe,

contudo sinto eles sempre próximos. Francisca, Felipe, Adriane e Mari meu muito obrigado por estarem comigo e por me ajudarem em tudo.

Gostaria de agradecer ao Dr. Jean-François Berret, junto ao Laboratório de Materiais e Sistema Complexos e a Universidade Paris Diderot, pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche no exterior.

Aproveito e agradeço também ao Dr. Victor Baldim, parceiro de laboratório na França, guia e com quem pude compartilhar boas cervejas e cafés filosóficos nos intervalos de trabalho e, a Dra. Leticia Vitorazi, cuja ajuda foi essencial para eu conseguir ser contemplado com a bolsa de doutorado sanduiche no exterior.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas, SP, pela disponibilização das instalações do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME), em especial ao Dr. Marcelo Alexandre de Farias, pelo suporte na execução da proposta TEM-23653.

Ao professor Prof. Watson Loh, do Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela viabilização dos estudos de estabilidade coloidal das nanoemulsões no equipamento LUMiSizer®.

Aos membros da banca examinadora: Dra. Clélia Marques, Dra. Juliana Bernardes, Dra. Elaine Paris, Dr. Hernane Barud, Dra. Rúbia Figueiredo e Dra. Lúcia Mascaro.

Ao Departamento de Química e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pelo espaço acadêmico. Ao programa de Pós-Graduação em Química, com uma agradecimento muito especial à Cristina, Ariane e Luciani, por toda atenção e ajuda que me deram nesses anos como aluno do departamento.

Ao programa de doutorado sanduiche no exterior/CAPES (processo 88881.135265/2016-01).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Código 33001014005D-6.

## Lista de Abreviaturas

- CMB – Concentração mínima bactericida
- CMI – Concentração mínima inibitória
- CTT – Reagente 2,3,5-trifeniltetrazólio
- DLS – da sigla em inglês “*Dynamic light scattering*” – espalhamento dinâmico da luz
- DPPH – Reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- EC50% - Sigla para representar atividade antioxidante necessária para reagir com 50% da quantidade do DPPH
- EOW – Envelhecimento de Ostwald
- ER – Elongação na ruptura
- FT-IR – da sigla em inglês “*Fourier Transformed Infrared*”
- HLB – da sigla em inglês “*hydrophilic-lipophilic balance*”
- ICF – Inversão catastrófica de fase
- II – Índice de instabilidade
- IP – Índice percentual
- M – micela
- ME – Módulo elástico
- MET-crio - Microscopia eletrônica de transmissão em ambiente criogênico
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MF – Microfluidização
- NE - Nanoemulsões
- OE – Óleo essencial
- PEC – Pectina
- RSO – Razão mássica surfactante/óleo essencial
- S – Surfactante
- SF – Solução filmogênica
- T80 – Tween 80
- TGA – Termogravimetria
- TM – Tensão máxima
- UFC – Unidades formadoras de colônia

## Lista de Tabelas

TABELA 4. 1: Porcentagens dos componentes das nanoemulsões de óleo essencial de alecrim ou de alho para a emulsificação por inversão catastrófica de fase ICF. Valores foram utilizados tanto para o OE de alecrim, quanto para o de alho. ....	24
TABELA 4. 2: Porcentagens dos componentes da nanoemulsões de óleo essencial de alecrim ou de alho obtidas por microfluidização (MF) em altas pressões. ....	25
TABELA 4. 3: CMI para os OE de alecrim e de alho para diferentes relações de quantidade de óleo e de solução. ....	28
TABELA 4. 4: Valores de concentração mínima inibitória (CMI) apresentada na literatura para as quatro culturas de bactérias: <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>S. aureus</i> contra óleos essenciais (OE) de alho e de alecrim. ....	30
TABELA 4. 5: Índice de instabilidade das nanoemulsões obtidas por inversão catastrófica de fase tipo 1(ICF1)* e tipo 2(ICF2)** , e microfluidização (MF) para diferentes valores de razão mássica surfactante/OE (RSO) ....	56
TABELA 5. 1: Composição e identificação dos filmes de pectina/T80. ....	72
TABELA 5. 2: composição dos filmes nanocompósitos de pectina/nanoemulsões obtidas por microfluidização:.....	72
TABELA 5.3: Espessura, propriedades mecânicas e molhabilidade de filmes de pectinas incorporados com diferentes concentrações do surfactante T80. ....	92
TABELA 5. 4: Espessura, propriedades mecânicas e molhabilidade a água de filmes nanocompósitos de pectina e NE/Alecrim. ....	94
TABELA 5. 5: Valores de inibição percentual (IP) e do EC 50% do OE de alecrim sem e acrescido de diferentes concentrações de T80, reagente padrão comparativo Trolox®; de filmes de pectina incorporados com NE de OE de alecrim obtidas por MF. ....	102

## Lista de Figuras

FIGURA 2.1: Método de emulsificação por inversão catastrófica de fase: O surfactante (a) foi solubilizado ou na fase aquosa (b) ou na fase lipofílica (c); a fase aquosa (b) foi adicionada à diferentes taxas (d) formando inicialmente uma emulsão de água em óleo (e) e com o aumento da fração de água ocorre a inversão de fase (f), obtendo-se nanoemulsões do tipo óleo em água (g). (Fonte do autor).....	11
FIGURA 2.2: Método de emulsificação por MF em altas pressões: uma emulsão grosseira (a) foi inserida à altas pressões (b) e capilares (80 $\mu\text{m}$ ), os quais colidem (c) promovendo a ruptura das gotas de óleo; resfriamento (d) para controle da temperatura; reservatório de retirada da amostra (e). Esquema da câmara de interação (c) adaptado de (MCCLEMENTS & RAO, 2011).....	12
FIGURA 2.3: Esquematisação dos mecanismos de instabilidade apresentados para nanoemulsões de óleo essencial: (a) separação gravitacional; (b) envelhecimento de Ostwald; (c) agregação. (Figura do autor).....	15
FIGURA 4.1: Resumo gráfico dos parâmetros utilizados para obtenção das nanoemulsões por dois diferentes processos de emulsificação: inversão catastrófica de fase (baixa energia) e microfluidização em altas pressões (alta energia); variando a composição a partir da variação da razão mássica (RSO) entre surfactante e óleo essencial.....	23
FIGURA 4.2: CMI dos OE de alecrim e de alho contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> . ....	29
FIGURA 4. 3: Nanoemulsões de OE de Alecrim obtidas por inversão catastrófica de fase 1 ( ICF1 - surfactante adicionado à fase hidrofílica) e 2 (ICF 2 - surfactante na fase lipofílica) para diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Fração volumétrica de água igual a 95.....	31
FIGURA 4. 4: Nanoemulsões de óleo essencial de Alho obtidas por inversão catastrófica de fase 1 (surfactante adicionado à fase hidrofílica) e 2 (surfactante na fase lipofílica) para diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Fração volumétrica de água igual a 95.....	32
FIGURA 4. 5: Diâmetro médio de nanoemulsões de óleo essencial de alecrim obtidas por inversão catastrófica de fase: surfactante solubilizado em água (ICF1, a e c) e solubilizado no óleo (ICF2 – b e d). Razões mássicas de surfactante/óleo (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Velocidade de adição de (●) de 1,0 mL·min <sup>-1</sup> e de 3,0 mL·min <sup>-1</sup> (■). Fração volumétrica de água igual a 95. ....	33
FIGURA 4. 6: Diâmetro médio de nanoemulsões de óleo essencial de alho obtidas por inversão catastrófica de fase: surfactante solubilizado em água (ICF1 – a e c) e solubilizado no óleo (ICF2 – b e d). Razões mássicas de surfactante/óleo (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Velocidade de adição de (●) de 1,0 mL·min <sup>-1</sup> e de 3,0 mL·min <sup>-1</sup> (■).Fração volumétrica de água igual a 95.....	34
FIGURA 4. 7: Distribuição do diâmetro em NE/alecrim para valores de razão mássica surfactante/OE: (a) RSO 05; (b) RSO 1,0; (c) RSO 1,5; (d) RSO 2,0. Surfactante solubilizado em água (ICF 1 – traço/ponto/vermelho); Surfactante adicionado ao óleo (ICF 2 – traço contínuo). A fase aquosa foi adicionada à fase lipofílica na razão de 1 e 3 mL·min <sup>-1</sup> . Fração volumétrica de água igual a 95.....	37
FIGURA 4. 8: Distribuição do diâmetro em NE/Alho para diferentes razões mássicas de surfactante/OE: (a) RSO 0,5; (b) RSO 1,0; (c) RSO 1,5; (d) RSO 2,0. Surfactante	

solubilizado em água (ICF 1 – traço/ponto); surfactante adicionado ao óleo (ICF 2 – traço contínuo). A fase aquosa foi adicionada à fase lipofílica na razão de 1 e 3 mL·min <sup>-1</sup> . Fração volumétrica de água igual a 95.....	39
FIGURA 4. 9: Nanoemulsões: OE de alecrim (a,b,c) e OE alho (d, e, f). NE obtidas por 0,3 e 10 ciclos de microfluidização em altas pressões e diferentes razões mássicas surfactante/OE (RSO): (a,d) 0,5; (b,e) 1,0; (c,f) 2,0. Fração volumétrica de água igual a 95 .....	41
FIGURA 4. 10: Diâmetro médio de nanoemulsões de óleo essencial de alecrim obtidas por microfluidização em altas pressões para diferentes ciclos (0,1, 2, 3, 5 e 10) e diferentes razões mássicas de surfactante e óleo essencial de alecrim (RSO): (■) RSO 0,5; (▲) 1,0; (●) 1,5 (◆).Fração volumétrica de água igual a 95.....	42
FIGURA 4. 11: Diâmetro médio de nanoemulsões de óleo essencial de alho obtidas por microfluidização em altas pressões para diferentes ciclos (0, 1, 2, 3, 5 e 10) e diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): (■) RSO 0,5; (▲) RSO 1,0; (●) RSO 1,5; (◆) RSO 2,0. Fração volumétrica de água igual a 95 .....	43
FIGURA 4.12: Distribuição do diâmetro em nanoemulsões de óleo essencial de alecrim para diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): (a) RSO 0,5; (b) RSO 1,0; (c) RSO 1,5; (d) RSO 2,0. Curvas deslocadas no eixo y indicam diferentes ciclos de microfluidização (MF): 1, 2, 3, 5, 10. Fração volumétrica de água igual a 95.....	46
FIGURA 4. 13: Distribuição do diâmetro em nanoemulsões de óleo essencial de alho para diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): (a) RSO 0,5; (b) RSO 1,0; (c) RSO 1,5; (d) RSO 2,0. Curvas deslocadas no eixo y indicam diferentes ciclos de microfluidização (MF): 1, 2, 3, 5, 10. Fração volumétrica de água igual a 95.....	47
FIGURA 4. 14: Potencial zeta de nanoemulsões de óleo essencial de alecrim obtidas por inversão catastrófica de fase: surfactante solubilizado em água (ICF1 – a e c) e solubilizado no óleo (ICF2 – b e d). Razões mássicas de surfactante/óleo (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Velocidade de adição de (●) de 1,0 mL·min <sup>-1</sup> e (■) de 3,0 mL·min <sup>-1</sup> .....	49
FIGURA 4. 15: Potencial zeta de nanoemulsões de óleo essencial de alho obtidas por inversão catastrófica de fase: surfactante solubilizado em água (ICF 1) e solubilizado no óleo (ICF 2). Razões mássicas de surfactante/óleo (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Velocidade de adição de (●) de 1,0 mL·min <sup>-1</sup> e de 3,0 mL·min <sup>-1</sup> (■). .....	51
FIGURA 4. 16: Potencial zeta de nanoemulsões de óleo essencial alecrim obtidas por microfluidização em altas pressões para diferentes ciclos (0, 1, 2, 3, 5 e 10) e diferentes razões mássicas surfactante/OE: (■) RSO 0,5; (▲) RSO 1,0; (●) RSO 1,5; (◆) RSO 2,0. ....	52
FIGURA 4. 17: potencial zeta de nanoemulsões de óleo essencial alho obtidas por microfluidização em altas pressões para diferentes ciclos (0, 1, 2, 3, 5 e 10) e diferentes razões mássicas surfactante/OE: (■) RSO 0,5; (▲) RSO 1,0; (●) RSO 1,5; (◆) RSO 2,0 .....	53
FIGURA 4. 18: Curvas de índice de instabilidade pelo tempo para NE/alecrim (a, b) e NE/alho (c, d). Comparativo entre instabilidade em relação ao tempo para dois protocolos de inversão catastrófica de fase: ICF 1 e ICF 2, variando os valores da razão mássica surfactante/OE (RSO). ....	57
FIGURA 4. 19: Curvas de índice de instabilidade pelo tempo para NE/alecrim (a, b, c) e NE/alho (d, e, f): comparativo entre instabilidade em relação ao tempo para 0, 3 e 10 ciclos de microfluidização e 0,5 (preto), 1 (vermelho) e 2 (verde) para valores de razão mássica surfactante/OE (RSO). ....	58



- FIGURA 4. 20: Morfologia de NE/Alecrim ICF1 obtidas por MET-Crio. Setas e sigla OE indicam as nanogotas do óleo essencial. O símbolo  $\times$  apresenta a região que delimita a área onde a amostra é depositada, o gride de cobre recoberto com carbono. Letra M indica região com micelas do surfactante..... 65
- FIGURA 4. 21: Morfologia de NE/Alecrim ICF2 obtidas por MET-Crio para diferentes regiões: (a) grade de amostra apenas com água em estado sólido amorfo para efeito de comparação com grids que apresentaram amostras; (b, c, d, e, f, g, h, i) diferentes diâmetros observados para uma mesma NE. Setas e a sigla OE indicam as nano-gotas observada. O símbolo  $\times$  apresenta a região que delimita a área onde a amostra é depositada. Letra M indica as micelas de surfactante. .... 66
- FIGURA 4. 22: Microscopia eletrônica de transmissão criogênica. Morfologia das NE/alecrim produzidas por microfluidização (10 ciclos e RSO 2,0): (a, c, d, e) diferentes regiões do grid de transmissão; (b) região onde não há amostra para comparação. Setas e a sigla OE indicam as nano-gotas observada. O símbolo  $\times$  apresenta a região que delimita a área onde a amostra é depositada. Letra M indica as micelas de surfactante. .... 67
- FIGURA 5. 1: hipóteses de interação das nanoemulsões (amarelo, óleo; vermelho, surfactante) na matriz de pectina (linhas em preto). Fonte: próprio autor ..... 78
- FIGURA 5. 2: interações entre Pectina e T80 para diferentes misturas de volumes avaliadas por quantidade de luz espalhada (a): Quantidade de luz espalhada ( $\blacksquare$ ) e diâmetro médio ( $\blacklozenge$ ); (b) para espectroscopia na região do Ultravioleta. Modelo representativo das estruturas do surfactante (c) e da pectina (d). Interações sugeridas (e) para o sistema pectina/T80 em solução: (1) interação de Van der Waals entre regiões hidrofóbicas do surfactante e da cadeia polimérica; (2) interações de ligação de hidrogênio entre os grupos hidrofílicos do surfactante (OH) e carboxílicos da pectina; (3) saturação da cadeia polimérica com micelas de surfactante..... 80
- FIGURA 5. 3: aspectos reológicos (a) tensão ( $\sigma$ ) de cisalhamento e (b) viscosidade ( $\eta$ ) de soluções filmogênicas de pectina a 3% com diferentes concentrações de surfactante ( $m_{\text{surfactante}}/m_{\text{pectina}}$ ): (preto) pectina controle; (vermelho) 2,5%; (verde) 5%; (azul) 10%; (ciano) 23,4%; (rosa) 47,8%; (amarelo) 55%..... 81
- FIGURA 5.4: curvas de viscosidade para três diferentes taxas de cisalhamento ( $\blacksquare$  1,  $\bullet$  10,  $\blacktriangle$  100  $s^{-1}$ ) em função (a) de diferentes razões mássicas de surfactante e pectina e, (b) da quantidade de surfactante, esta variando de 0 a 60% em massa. .... 82
- FIGURA 5.5: aspectos reológicos (a) tensão de cisalhamento e (b) viscosidade de soluções filmogênicas de pectina a 3% com NE/alecrim e diferentes razões mássicas de surfactante (RSO). (c) valores de viscosidade para diferentes taxas de cisalhamento ( $\blacksquare$  1,  $\bullet$  1,  $\blacktriangle$  100  $s^{-1}$ )..... 84
- FIGURA 5. 6: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura criogênica da secção transversal e fotografias digitais de filmes de pectina com as seguintes quantidades de surfactante m/m: (a,b,c) controle; (d,e,f) 23,4% m/m; (g,h,i) com 37,1% m/m; (j,k,l) com 41% m/m; (l,m,n) com 55% m/m. Aumento de 3.000 x para a, d, g, j, m; aumento de 1500x para b, e, h, k, n. .... 86
- FIGURA 5. 7: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura criogênica da secção transversal e fotografias digitais de filmes de pectina com: (a,b,c) NE/alecrim RSO 0,5; (d,e,f) NE/alecrim RSO 1,0; (g,h,i) NE/alecrim RSO 1,5; (j,k,l) NE/alecrim RSO 2,0, Magnificação de 3,000 x para a, d, g, i; magnificação de 5000x para b, e, f, h,k. .... 88

- FIGURA 5. 8: Espectros de FT-IR: (a,h) T80; (b,i) filme pectina controle; (c) Pec/T80-4; (d) Pec/T80-5; (e) Pec/T80-6; (f) Pec/T80-8; (g) OE de alecrim; (h) PEC/NE/alecrim RSO0,5; (i) PEC/ NE/alecrim RSO1,0; (j) PEC/ NE/alecrim RSO1,5; (k) PEC/ NE/alecrim RSO2,0..... 91
- FIGURA 5. 9: (a) curvas termogravimétricas e (b) termogravimétrica derivada de filmes de pectina controle (vermelho), T80 bulk (preto) e filmes de pectina/T80 (m/m): (amarelo) 5%; (verde) 10%; (azul) 15%; (ciano) 20%; (magenta) 25%, (c) curva termogravimétrica derivada ampliada na região entre 425 e 575°C. .... 98
- FIGURA 5. 10: Esquerda: (a) curvas termogravimétricas e termogravimétrica derivada (c) de pectina (ciano), T80 (vermelha), OE de alecrim (verde). Direita: (b) curvas termogravimétricas e (d) termogravimétricas derivadas de filmes de pectina (PEC) com NE/Alecrim microfluidizadas (MF) com diferentes razões (RSO): 0,5; 1; 1,5; 2. .... 99
- FIGURA 5.11: Fotografias digitais dos filmes de pectina com T80 em diferentes concentrações quando submetidos ao teste antimicrobiano de halo de inibição por difusão em ágar. Coluna da esquerda indica culturas *E. coli* e coluna da esquerda indicam culturas da *S. aureus*. Círculo preto indica tamanho real do filme colocado no início do ensaio..... 104
- FIGURA 5.12: Fotografias digitais dos filmes de pectina com NE de alecrim em diferentes valores de RSO (razão mássica de surfactante/OE) quando submetidos ao teste antimicrobiano de halo de inibição por difusão em ágar. Coluna da esquerda indica culturas *E. coli* e coluna da esquerda indicam culturas da *S. aureus*. Círculo preto indica tamanho inicial do filme colocado no início do ensaio. .... 106

## Produções Científicas

### Publicações em periódicos científicos internacionais

LOREVICE, M. V.; DE MOURA, M. R. ; MATTOSO, L. H.C. & ZUCOLOTTI, V.”Highly Stable, Edible Cellulose Films Incorporating Chitosan Nanoparticles”. J. Food Sci. **76**: N25, 2011.

LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R. DE ; AOUADA, F. A. & MATTOSO, L. H. C. “Development of Novel Guava Puree Films Containing Chitosan Nanoparticles”. J. Nanosci Nanotech., **12**: 2711, 2012.

LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R. DE & MATTOSO, L. H. C.”Nanocomposite of papaya puree and chitosan nanoparticles for application in packaging”. Quím. Nova, **37**: 931, 2014

OTONI, C. G. ; MOURA, M. R. DE; AOUADA, F. A.; CAMILLOTO, G. P. ; CRUZ, R. S.; LOREVICE, M. V.; SOARES, N.F.F. & MATTOSO, L. H.C. “Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films” Food Hydrocol. **41**:188, 2014

LOREVICE, M. V.; OTONI, C. G.; MOURA, M. R. & MATTOSO, L. H. C. “Chitosan nanoparticles on the improvement of thermal, barrier, and mechanical properties of high- and low-methyl pectin films”. Food Hydroc., **52**: 732, 2016.

MANRICH, A.; MOREIRA, F. K.V.; OTONI, C. G.; LOREVICE, M. V.; MARTINS, M. A. & MATTOSO, L.H.C. “Hydrophobic edible films made up of tomato cutin and pectin”. Carbohy. Polym., **164**: 83, 2017.

OTONI, C. G.; 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. F., 16 (5), 1151, 2017.

OTONI, C. G.; LODI, B. D.; LOREVICE, M. V.; LEITÃO, R. C.; FERREIRA, M. D.; MOURA, M. & MATTOSO, L.H.C.”Optimized and scaled-up production of cellulose-reinforced biodegradable composite films made up of carrot processing waste. Ind. Crops Prod. **121**: 66, 2018.

OTONI, C. G.; LOREVICE, M. V.; MOURA, M.R. & MATTOSO, L. H.C. “On the effects of hydroxyl substitution degree and molecular weight on mechanical and water barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films” Carbohyd. Polym., **185**: 105, 2018.

OTONI, C. G.; CARVALHO, A.; CARDOSO, M.; BERNARDINELLI, O.; LOREVICE, M.; COLNAGO, L.; LOH, W. & MATTOSO, L. H. C. "High-pressure microfluidization as a green tool for optimizing the mechanical performance of all-cellulose composites". ACS Sustainable Chem. Eng., 6 (10):12727, 2018.

### **Trabalhos em processo de submissão:**

LOREVICE, MV; OTONI, CG; FRANCO, GV; SOLFERINI, G.B.; MOURA, MR; MATTOSO, LHC On the effects of processing and composition on the stability of rosemary and garlic essential oil nanoemulsion. *Journal of Colloids and Interfaces*.

LOREVICE, MV; OTONI, CG; FRANCO, GT; SOLFERINI, G.B.; MOURA, MR; MATTOSO, LHC Pectin films incorporated with rosemary essential oil nanoemulsion: antioxidant and antimicrobial properties as affected by surfactant concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

### **Publicações em Anais de Congressos**

LOREVICE, M. V., OTONI, C. G., DE MOURA, M. R., MATTOSO, L. H. C. "Bioplásticos comestíveis de pectina e nanopartículas de Quitosana". 13º Congresso Brasileiro de Polímeros". Natal – RN, 18 a 22 de outubro de 2015.

OTONI, C. G., LOREVICE, M. V., DE MOURA, CORREA, D. S.; M. R., MATTOSO, L. H. C. "Efeito Plastificante de Polpa de Pêssego em Bioplásticos Comestíveis". 13º Congresso Brasileiro de Polímeros, Natal – RN, 18 a 22 de outubro de 2015.

MATTOSO, L. H. C; MOREIRA, F. K.; LOREVICE, M. V.; OTONI, C. G.; DE MOURA, M. R.; AZEREDO, H. C. M. & MCHUGH, T. "Bioplastics made up of fruit purees". 13º Congresso Brasileiro de Polímeros, Natal – RN, 18 a 22 de outubro de 2015.

LOREVICE, M. V., OTONI, C. G., DE MOURA, M. R., MATTOSO, L. H. C. "Novel edible nanocomposite filme-based in pectin and poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles". XIV Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, Rio de Janeiro – RJ, 27-01 de outubro de 2015.

OTONI, C. G., LOREVICE, M. V., DE MOURA, CORREA, D. S.; M. R., MATTOSO, L. H. C. "High pressure microfluidization reduces hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) molecular weight but improves mechanical properties of microcrystalline cellulose (MCC)-reinforced HPMC films". XIV Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, Rio de Janeiro – RJ, 27-01 de outubro de 2015.

MATOSO, L. H. C; OTONI, C. G.; LOREVICE, M. V.; MOREIRA, F. K.; MARCONCINI, J. M. & OLIVEIRA, C. R. "Development of polymeric sustainable materials using nanotechnology". XIV Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, Rio de Janeiro – RJ, 27-01 de outubro de 2015.

LOREVICE, M. V; OTONI, C. G.; MOURA, M. R. de & MATTOSO, L. H. C. Propriedades Mecânicas e de barreira ao vapor de água de bionanocompósitos comestíveis produzidos com polpa de goiaba, hidroxipropil metilcelulose e nanopartículas de quitosana, 3º Encontro Nordeste de Ciência e Tecnologia de Polímeros, Fortaleza – CE, 28-30 de novembro, 2016.

MELO, P. T. S; SOUZA, J. R.; LOREVICE, M. V., AOUADA, F. A. & MOURA, M. R. de. Thermal properties of edible nanocomposite films based in cupuaçu puree, XV Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, Campinas-SP, 2016.

OTONI, C. G.; LOREVICE, M. V; MOURA, M. R.; FERREIRA, M. D. de & MATTOSO, L. H. C. Carrot Precessing Waste as Raw Material for Edible Film Production, XV Simposio Latinoamericano de Polímros, Cancún – Rivera Maya, Mexico, Outubro de 2016.

LOREVICE, M. V; FRANCO, G. T; OTONI, C. G.; MOURA, M. R. de & MATTOSO, L. H. C. Atributos Mecânicos de filmes de pectina: efeito da incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais. IV Encontro de Pesquisadores em Ciência e Engenharia de Materiais – EPCEM, Ilha Solteira – SP, Agosto de 2018.

LOREVICE, M. V; FRANCO, G. T; OTONI, C. G.; MOURA, M. R. de & MATTOSO, L. H. C. Rosemary essential oil nanoemulsion: emulsification process and influence of composition. São Paulo School of Advanced Science on Colloids, Campinas, Outubro de 2018.

## Resumo

**NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS: MECANISMOS DE ESTABILIDADE E INTERAÇÃO COM PECTINA EM BIONANOCOMPÓSITOS PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS ATIVAS:** Um dos desafios para preservação dos alimentos é a diminuição da proliferação de micro-organismos. Alternativas como a utilização de óleos essenciais, os quais apresentam propriedades antimicrobianas e antioxidantes, têm se mostrado interessante por diminuir a utilização de compostos sintéticos, muitas vezes nocivos ao consumo. O objetivo deste trabalho foi a produção de nanoemulsões de óleos essenciais de alecrim e de alho por emulsificação de alta (microfluidização) e de baixa energia (inversão catastrófica de fase), e da avaliação da estabilidade e posterior incorporação em filmes de pectina para estudo das interações e do efeito da quantidade de surfactante nas propriedades físico-químicas, antioxidantes e antimicrobianas dos nanocompósitos. As nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, estabilidade coloidal e morfologia. Os filmes foram avaliados quanto à morfologia, molhabilidade à água, propriedades mecânicas, antimicrobianas e antioxidantes. Nanoemulsões para os dois óleos essenciais foram obtidas por métodos de inversão catastrófica de fase e apresentaram diâmetros médios entre 100 e 500 nm e potencial de superfície entre -1 e -10 mV, sendo a concentração e localização do surfactante fatores predominantes para obter NE com baixa polidispersividade. A microfluidização mostrou-se a emulsificação mais eficaz, produzindo diâmetros médios entre 10 e 100 nm para ambos os óleos essenciais, sendo a maior quantidade de surfactante predominante para obtenção de nanoemulsões com baixa polidispersividade. As nanoemulsões obtidas por microfluidização apresentaram maior estabilidade. Imagens de MET-crio das nanoemulsões indicaram partículas *quasi*-esféricas, com diâmetros variados para as produzidas por inversão catastrófica de fase e, dispersão homogêneas para microfluidização. Análise de espalhamento dinâmico da luz não indicaram interações eletrostáticas entre pectina/surfactante, contudo o aumento na viscosidade para valores de surfactante entre 10 e 20% m/m indicou possíveis interações hidrofóbicas entre porções da pectina e do surfactante, as quais ainda resultaram em um incremento na hidrofobicidade do filme, bem como em estruturas internas esponjosas tanto para filmes pectina/surfactante quanto para pectina/nanoemulsões. A tensão máxima e módulo elástico sofreram quedas para os valores de surfactante acima de 20% m/m. O óleo essencial de alecrim exibiu propriedades antioxidantes, com 85% de captura do radical DPPH e EC50% de 50% da concentração inicial de óleo utilizada. Para os nanocompósitos, o EC50% decaiu, devido a evaporação do óleo durante a secagem, sem qualquer interferência do surfactante. As características antimicrobianas, por outro lado não foram verificadas, devido à pouca ou nenhuma difusão de óleo essencial para o meio de cultura, dificultado pela concentração de surfactante. O estudo demonstrou-se inovador por relacionar as propriedades dos nanocompósitos pectina/nanoemulsões de alecrim às características e quantidades do surfactante utilizado, permitindo um novo entendimento acerca da função de cada componente nas propriedades ativas quanto físico-químicas.

## Abstract

**ESSENTIAL OIL NANOEMULSIONS: MECHANISMS OF STABILITY AND INTERACTION WITH PECTIN FILMS IN BIONANOCOMPOSITE FOR ACTIVE PACKAGING APPLICATIONS:** Microbial growth is among the challenges impairing food preservation and shelf-life. Essential oils (EO) featuring antimicrobial and antioxidant activities denote an alternative for lessening the contents of synthetic additives that may be harmful to human health. The limitations due the low EO solubility in water and their poor stability in aqueous media have been suppressed by the use of nanoemulsions (NE), which feature kinetic stability, intensify the antimicrobial effect of EO, and allow their dispersions in aqueous systems such as those involving polysaccharides for applications as packaging materials. The objective of this study were i) the production of NE having rosemary or clove EO as dispersed phase through high-energy (microfluidization - MF) or low-energy (catastrophic phase inversion - CPI) emulsification methods; ii) the evaluation of the NE stability with regard to the surfactant content in relation to the dispersed phase; and iii) the NE incorporation into pectin films to investigate the interaction among the components and the effect of the surfactant content on the physicochemical and active properties of the nanocomposites. The NE were characterized as to their average droplet sizes, zeta potentials, colloidal stability, and morphology. The films were evaluated as to their film-forming viscosity, morphology, wettability by water as well as mechanical, antimicrobial, and antioxidant properties. Regardless of the EO, the CPI-produced NE presented average droplet sizes and zeta potentials ranging from 100 to 500 nm and from -10 to -1 mV, respectively, being surfactant concentration and location the major factors affecting polydispersity. The MF was more efficient than CPI because the former led to average diameters ranging from 10 to 100 nm, and surfactant content was the dominant factor. The rosemary NE obtained through MF were more stable against creaming than clove NE against sedimentation. Cryo-TEM images indicate quasi-spherical particles with polydisperse diameters for CPI and homogeneous pattern for MF. Dynamic light scattering experiments did not evidence electrostatic interactions among pectin and surfactant, but the increased viscosity for surfactant contents between 10 and 20 wt.% suggested possible hydrophobic interactions, which led to films with increased hydrophobicity as well as sponge-like internal for both pectin/surfactant and pectin/NE films. The tensile strength and elastic modulus were decreased for surfactant contents higher than 20 wt.%. Rosemary EO exhibited antioxidant activity by capturing 85% of DPPH radicals and presenting an EC50% value of 50% of the initial EO concentration. The EC50% was decreased in the nanocomposites because of EO loss through evaporation upon drying, without any effect of the surfactant. On the other hand, antimicrobial activity was not detected because of the EO diffusion towards the culture medium, which was limited by the surfactant quantity and low oil-soluble in aqueous culture medium. This reported study is innovative because it relates the properties of pectin/rosemary NE nanocomposites with the content and characteristics of the surfactant, paving the route for a novel understanding on the role played by each component on the active and physicochemical properties.

## Sumário

Capítulo 1 .....	1
1 – Introdução.....	1
Capítulo 2 .....	5
2 - Revisão com síntese da Literatura .....	5
2.1 - Problematização .....	5
2.1.1 - Óleos essenciais.....	6
2.1.2 - Nanoemulsões .....	8
2.1.2.1 – Inversão catastrófica de fase .....	9
2.1.2.2 – Microfluidização em altas pressões .....	12
2.1.2.3 - Mecanismos de estabilidade.....	13
2.1.3 – Embalagens ativas: propriedades antimicrobianas e antioxidantes .....	15
Capítulo 3 .....	19
3- Objetivos.....	19
3.1 – Objetivos específicos .....	19
Capítulo 4 .....	21
4- Nanoemulsões de óleos essenciais em água: influências do processo e da razão entre surfactante e fase dispersa. ....	21
4.1 - Material .....	21
4.2 – Metodologia experimental .....	21
4.2.1 - Caracterização da atividade antimicrobiana dos OE de alecrim e de alho: concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida ou bacteriostática .....	21
4.2.2 - Produção de nanoemulsões de óleos essenciais por emulsificação de baixa e de alta energia. ....	23
4.2.2.1 - Emulsificação de baixa energia: inversão catastrófica de fase .....	23
4.2.2.2 - Emulsificação de alta energia: Microfluidização em altas pressões.....	25
4.2.3 - Caracterização da distribuição de tamanho, tamanho médio e potencial zeta das nanoemulsões .....	26
4.2.4 - Estabilidade coloidal das nanoemulsões de óleo essencial de alecrim e de alho. ....	26
4.2.5 – Microscopia eletrônica de transmissão em modo criogênico (MET-crio) ..	26
4.3 - Resultados e Discussão.....	28
4.3.1 - Caracterização da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alho e de alecrim: concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida... ..	28
4.3.2 - Tamanho médio, distribuição de tamanho e potencial zeta .....	31
4.3.2.1 – Diâmetro médio e distribuição de tamanho das NE de OE obtidas por Inversão Catastrófica de fase.....	31
4.3.2.2 - Diâmetro médio e distribuição de tamanho das NE de OE obtidas por microfluidização .....	40
4.3.2.2 – Potencial zeta das NE obtidas por inversão catastrófica de fase e microfluidização .....	48
4.3.3 - Estabilidade das Nanoemulsões.....	54
4.3.4 - Morfologia das NE de Alecrim.....	63
4.4 - Conclusões Parciais .....	68
Capítulo 5 .....	71



5 – Filmes de pectina: efeito do surfactante e das nanoemulsões nas propriedades físico-químicas, antimicrobianas e antioxidantes.....	71
5.1 - Material .....	71
5.2 – Metodologia.....	71
5.2.1 - Composição e protocolo de preparo das soluções filmogênicas de pectina/surfactante.....	71
5.2.2 - Composição e protocolo de preparo das formulações filmogênicas de e pectina/nanoemulsões .....	72
5.2.3 – Interações entre componentes das soluções filmogênicas pectina/surfactante.....	73
5.2.4 – Reologia das soluções filmogênicas pectina/surfactante .....	74
5.2.5 – Aspectos Morfológicos e Estruturais .....	74
5.2.6 – Espessura e propriedades mecânicas .....	74
5.2.7 - Molhabilidade à água.....	75
5.2.8 - Termogravimetria.....	75
5.2.9 – Atividade Antimicrobiana.....	75
5.2.10 - Atividade Antioxidante - método de sequestro do radical DPPH .....	76
5.2.11 - Análise Estatística dos dados .....	77
5.3 - Resultados e Discussão.....	78
5.3.1 – Interações entre os componentes da solução filmogênica de pectina, surfactante e nanoemulsões .....	78
5.3.2 – Aspectos estruturais e morfológicos de filmes de pectina/surfactante e filmes nanocompósitos de pectina/nanoemulsões de alecrim.....	85
5.3.3 – Propriedades mecânicas.....	92
5.3.4 – Molhabilidade à água .....	96
5.3.4 – Propriedades Térmicas .....	98
5.3.5 – Propriedades Antioxidantes .....	101
5.3.7 – Propriedades Antimicrobianas .....	103
5.4 - Conclusões Parciais .....	108
Capítulo 6 .....	109
6- Considerações finais .....	109
6.1 – Conclusões .....	109
6.2 – Sugestões para trabalhos futuros .....	111
Capítulo 7 .....	113
7- Referências bibliográficas .....	113
APÊNDICE A.....	1
APÊNDICE B.....	5

# CAPÍTULO 1

## 1 – INTRODUÇÃO

Prolongar a vida útil de alimentos tem se mostrado uma das alternativas para suprir a alta demanda na produção e consumos industrial e doméstico. A vida útil é determinada, dentre outros fatores, pela segurança dos alimentos no que compete à não contaminação destes por micro-organismos (ESPITIA et al., 2019) e pela prevenção a processos oxidativos (GOMEZ-ESTACA et al., 2014). Dados do Ministério da Saúde de 2017 e 2018 indicam uma quantidade expressiva de casos de doenças transmitidas por ingestão de alimentos contaminados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Nesse sentido, a alternativa válida e utilizada é a adição de composto que retardem a oxidação e/ou previnam a proliferação de micro-organismos como bactérias.

No entanto, a preocupação pelo uso excessivo de conservantes, ou de compostos sintéticos encoraja a utilização de compostos naturais com propriedades comparáveis ou superiores aos compostos tradicionais, mas garantindo a saúde dos consumidores. Como opção, destacam-se os óleos essenciais (OE), compostos provenientes da extração de plantas e especiarias (BASSOLÉ & JULIANI, 2012), que apresentam tanto propriedades antioxidantes quanto antimicrobianas, estas inovadoras para embalagens de alimentos (AMORATI et al., 2013; ATTI-SANTOS et al. (2005); BURT, 2007) O óleo essencial de alecrim é obtido a partir da destilação a vapor de galhos e folhas de plantas do gênero *Rosemarinus*, incolor e com aroma refrescante, cuja composição tem o  $\alpha$ -pirene e o 1,8 cineol como componentes majoritários (ATTI-SANTOS et al., 2005) e a estes relacionadas propriedades antioxidantes (ERKAN et al., 2008) e antioxidantes (CELIK TAS et al., 2007). O óleo essencial de alho, proveniente da espécie vegetal *Allium sativum* comumente utilizado para propósitos culinários, cujo aroma característico é relacionado à existência de compostos sulfonados como a alicina, além das propriedades antimicrobianas, antioxidante, dentre outras (MARTINS et al., 2016).

Devido ao aroma e ao sabor característico, a adição e a quantidade dos OE mostram-se limitantes para a utilização desses para preservação de alimentos (CHIRALT

& ATAR, 2016). Como alternativas ao primeiro fator, estudos recentes sugerem novas embalagens baseadas em biopolímeros (polissacarídeos e polipeptídeos, por exemplo), aos quais os OE são incorporados e então aplicadas aos alimentos, sendo ou não consumidas. No entanto, devido à baixa solubilidade em água (principal solvente de biopolímeros utilizados para embalagens), a dispersão destes OE torna-se um desafio.

Uma das alternativas apresentadas é a utilização de nanoemulsões (NE), sistemas coloidais compostos por nanogotas de fases imiscíveis, tipo óleo-em-água ou água-em-óleo, com diâmetro médio de gotas que variam de 1 a 500 nm e estabilizadas por emulsificantes. Este último pode ser definido como uma molécula anfifílica, cuja a função é diminuir a energia interfacial e, assim, aumentar a estabilidade do sistema. Isso se faz necessário, uma vez que NE são sistemas que não apresentam estabilidade termodinâmica, ou seja, em longos intervalos de tempo são suscetíveis à separação de fase proveniente da imiscibilidade dos componentes da fase dispersa e da fase contínua (DONSÌ & FERRARI, 2016). As quantidades das fases dispersa (óleo, no caso deste estudo) e contínua (água), bem do surfactante interferem na obtenção e estabilidade das NE (MCCLEMENTS, 2016). Em complemento à isso, NE podem ser obtidas por diferentes métodos de emulsificação, cuja energia aplicada na obtenção pode diferenciar entre dois grupos: alta e baixa energia.

Nesse sentido, na última década, diversos trabalhos vêm apresentando nanocompósitos com OE incorporados na forma de NE, como novas embalagens com comprovadas propriedades ativas, ou seja, atuam no alimento, de forma a protegê-lo de agentes contaminantes externos e a deterioração (PRAKASH et al., 2018). Todavia, tendo considerado o emulsificante como componente que recobre as gotas das NE, mediando a interface óleo/água e, conseqüentemente, incorporado às matrizes polimérica, verifica-se que não há um entendimento acerca do efeito do surfactante nas propriedades físico-químicas de filmes aplicáveis a embalagens, bem como nas suas propriedades ativas.

A tese foi estruturada em sete partes, que estão elencadas abaixo:

Capítulo 1: apresenta uma introdução ao trabalho realizado;

Capítulo 2: oferece uma revisão bibliográfica com síntese da literatura e conceitos teóricos;

Capítulo 3: elucida os objetivos, bem como as hipóteses mediante ao que apresenta a literatura, bem como as metas desenhadas a serem cumpridas;

Capítulo 4: compõe-se de toda a produção das NE de dois diferentes OE avaliando a influência de dois métodos de emulsificação (alta e baixa energia) e a razão de surfactante/fase dispersa no diâmetro médio das NE, bem como da estabilidade coloidal destas.

Capítulo 5: está estruturado na compreensão, do ponto de vista das propriedades físico-químicas e ativas (antioxidante e antimicrobiana), do papel do surfactante nos sistemas formados pela matriz de pectina e o surfactante e a matriz de pectina e as NE/alecrim;

Capítulo 6: apresenta as conclusões gerais do trabalho desenvolvido, bem como novas perspectivas de trabalho a partir dos estudos concluídos aqui;

Capítulo 7: elenca os trabalhos utilizados para embasar, elucidar e corroborar as discussões apresentadas;

Com isso, o presente trabalho objetivou um estudo da produção de nanoemulsões óleo-em-água, tendo óleo essencial de alecrim ou alho como fases dispersas, sendo suas propriedades sensoriais (aroma e cor) distintas de modo a partimir a variedade de aplicação. Para tanto, foram estudados métodos de emulsificação de alta e de baixa energia e razão surfactante/fase dispersa e seus efeitos no diâmetro médio e estabilidade coloidal. Além disso, objetivou-se compreender as interações entre o surfactante e matriz pectica nas propriedades físico-químicas, antimicrobiana e antioxidantes para a produção de bionanocompósitos para aplicação em embalagens.



## CAPÍTULO 2

### 2 - REVISÃO COM SÍNTESE DA LITERATURA

#### 2.1 - Problematização

A função de embalagens de alimentos é manter a qualidade e segurança dos produtos durante o transporte e estocagem, além de estender a vida útil, ou de prateleira, contra possíveis fatores indesejáveis como contaminantes: micro-organismos, produtos químicos, oxigênio, umidade, luz (RHIM et al., 2013). Destes fatores depreciativos ocorrente nos alimentos, a proliferação de micro-organismos e a oxidação são efeitos, que nos últimos anos tem-se mostrado de grande importância para o desenvolvimento de novas embalagens (QUINTAVALLA & VICINI, 2002).

A proliferação de micro-organismos em alimentos tem se mostrado preocupante, tanto para o consumidor final, quanto de saúde pública. Dados recentes, dos últimos 17 anos (2000-2017), do Ministério da Saúde, indica as doenças transmitidas por alimentos contaminados, os quais mostram-se alarmantes no que compete os organismos reportados como agentes patógenos em alimentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Ainda segundo este relatório, o perfil epidemiológico demonstra dois fatos a serem enaltecidos: (1) a maior contaminação se dá nas residências dos consumidores, seguido de restaurantes e outros estabelecimentos alimentícios; (2) dentre os mais de 7000 casos reportados à vigilância sanitária, as bactérias apresentaram cerca de 96% dos casos de agentes etiológicos, sendo seguidos por vírus, agentes químicos e protozoários. Dentre esses, cepas de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, juntamente com o gênero da *Salmonella*. mostram-se os maiores agentes patógenos causadores de doenças relacionadas à alimentos contaminados. Tal preocupação é apresentada por ESPITIA et al. (2019), com dados referentes ao Centro de Controle de Doenças e Prevenção dos Estados Unidos no ano de 2016: cerca de 48 milhões de pessoas adquirem algum tipo de doença relacionada ao consumo de alimentos contaminados.

Uma das novas formas apresentadas que possam diminuir esses riscos é a utilização de embalagens com propriedades antimicrobianas, proveniente de compostos

naturais, como os óleos essenciais, a fim de diminuir quaisquer riscos à saúde humana (KUORWEL et al., 2011b; RIBEIRO-SANTOS, Regiane. et al., 2017; RIBEIRO-SANTOS, Regiane et al., 2017; SUNG et al., 2013; VALDES et al., 2015). Agregado à atividade antimicrobiana desses compostos, à atividade antioxidante vem sendo reportada como uma alternativa à outro efeito depreciativo em alimentos, que diminuem sua vida de prateleira (EÇA et al., 2014; GOMEZ-ESTACA et al., 2014; RIBEIRO-SANTOS, Regiane. et al., 2017; SITONIA et al., 2014) .

### **2.1.1 - Óleos essenciais**

Óleos essenciais (OE) são compostos líquidos, aromáticos e voláteis, extraídos de flores, raízes, cascas, folhas, sementes, frutas e madeiras (SEOW et al., 2014). Seus métodos de obtenção são variados de fermentação à destilação a vapor, método esse mais comumente aplicado na forma manufaturada desses compostos (BURT, 2004). Esses compostos tem sido reportados como carreadores de diversas propriedades: antibacteriana, antifúngica, antiviral, inseticida e antioxidante (BASSOLÉ & JULIANI, 2012; EÇA et al., 2014). De acordo com BASSOLÉ & JULIANI (2012), tais propriedades estão ligadas à própria defesa das plantas contra predadores, e micro-organismos patógenos.

As diferenças regionais e sazonais também interferem nas propriedades dos OE, como para o caso bordado por CELIKTAS et al. (2007), onde verificou-se esse efeito para OE de alecrim extraído de diferentes regiões e épocas do ano. Suas propriedades são relacionadas tanto ao OE em si, ou quanto a composição e presença de determinados compostos (MAISANABA et al., 2017). Ou ainda, efeitos sinérgicos podem ser utilizados para potencializar o espectro de atuação de um OE para determinada propriedade esperada, como antioxidante ou antimicrobiana (BASSOLÉ & JULIANI, 2012) . OE possuem e sua composição dois grandes grupos de compostos: terpenos (mono e sesquiterpenos), terpenóides (linalol, citronela, timol, carvacrol, carvone brenol) e fenilpropanóides (cinamaldeído, eugenol, vanilina e safrole) (HYLDGAARD et al., 2012). Em complemento à composição dos OE, diferentes mecanismos são citados de modo à esclarecer o papel desses compostos naturais em suas respectivas propriedades. Tendo em vista que o estudo aqui apresentado abordará

apenas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, as discussões a seguir irão abordar apenas essas duas características.

Por definição, compostos antioxidantes são aqueles responsáveis por diminuir ou suprimir a oxidação de um material (AMORATI et al., 2013). Segundo os autores, a atividade antioxidante está ligada à presença e, grande quantidade, de compostos fenólicos capazes de cessar a oxidação aeróbica, contudo compostos como a alicina, não fenólico, pode apresentar propriedades antioxidantes também. Ainda estes agentes antioxidantes podem ser classificados em dois grandes grupos: agentes inibidores e antioxidantes de quebra de cadeia. Diversos são os mecanismos do efeito antioxidantes são apresentados (MAISANABA et al., 2017), sendo que para OE, o mecanismo de captura de radical livre (ATARES & CHIRALT, 2016), criando uma barreira à radicais como o oxigênio.

As atividades antimicrobianas estão relacionadas ao transporte de substâncias da região externa para a interna da parede celular, resultando assim em diferentes mecanismos (ATARES & CHIRALT, 2016; MAISANABA et al., 2017), desde do rompimento da membrana citoplasmática, à quebra as enzimas ou dano ao material genético, mudanças nas propriedades das membranas ou inibição à divisão célula. Cabe ressaltar, que a atividade antimicrobiana é afetada por as diferenças entre as membranas celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A segunda apresenta uma camada externa à parede celular composta por polipeptídioglicanos, que criam uma barreira conta compostos hidrofóbicos, tornando-as mais resistentes à ação de OE com compostos com certa hidrofiliidade (HYLDGAARD et al., 2012).

Dentre os OE, destacam-se dois OE. O primeiro é o OE de alecrim (*Rosemarinus officinalis*), que segundo DA SILVA BOMFIM et al. (2015) e FLAMINI et al. (2002), largamente utilizado na indústria devido às suas características aromáticas, antioxidantes e antimicrobianas (BARBOSA et al., 2016; HONÓRIO et al., 2015), as quais estão relacionadas à presença de compostos diterpênicos (ATTI-SANTOS et al., 2005). O segundo é o OE de alho (*Allium sativum*), segundo BENKEBLIA (2004), possui atividades antioxidantes, antimicrobianas (PÉREZ-CÓRDOBA et al., 2018) e anti-inflamatórias relacionadas aos seus componentes sulfonados e terpênicos (ANKRI & MIRELMAN, 1999; BAKRI & DOUGLAS, 2005; HARRIS et al., 2001; MARTINS et al., 2016).



### 2.1.2 - Nanoemulsões

Emulsões tanto do tipo óleo/água quanto água/óleo, cujo tamanho de gota da fase dispersa esteja compreendido, usualmente, entre 10 e 1000 nm, apresente estabilidade cinética, seja termodinamicamente instável pode ser classificado segundo MCCLEMENTS (2012) como nanoemulsões. São sistemas que dependentes das características intrínsecas do sistema (tipo de óleo, quantidade da fase contínua ou tipo de surfactante).

A formação dessas nanogotículas (NG) não é um processo termodinamicamente espontâneo(MAALI & MOSAVIAN, 2013). A energia livre de um sistema composto por água, um emulsificante e óleo é dada por:

$$\Delta G = \gamma\Delta A - T\Delta S \quad (1)$$

Sendo  $\Delta G$  a energia livre total,  $\gamma$  tensão interfacial,  $\Delta A$  a área associada à gota e  $\Delta A\gamma$  a energia associada ao aumento da área superficial com a diminuição do tamanho de gota, e  $\Delta S$  a entropia associada à dispersão a uma temperatura absoluta T. No processo de produção de NE, o aumento da energia relacionada à área superficial, sempre positivo, não é compensado pelo aumento da entropia, de modo que o valor total da energia do sistema é maior que zero, tornando o processo termodinamicamente desfavorável. Dessa forma, a formação das NE, a distribuição dos tamanhos das NG e suas estabilidades dependem de fatores que possam diminuir essa diferença e favorecer a formação das NE. Dentre esses, energia aplicada à produção da emulsão, característica e concentração do óleo, características e concentração dos surfactantes (valores do balanço hidrofílico-lipofílico) (RAO & MCCLEMENTS, 2011) mostram-se fatores a ser considerados.

No âmbito da energia aplicada na formação de NE, pode-se dividir as emulsificações em dois grandes grupos: alta e baixa energia. Os processos de alta energia, já são aplicados à fabricação de NE (BONILLA et al., 2014; GALOYAK & DABIR, 2015; MAYER et al., 2013; QING et al., 2013; SALVIA-TRUJILLO et al., 2015; ULUATA et al., 2016). Nestes, uma quantidade de energia, superior às fases separadas, é aplicada ao sistema de modo a diminuir a diferença entre os valores de  $\Delta A$  e  $T\Delta S$  (ESPITIA et al., 2019). Contudo métodos de emulsificação de baixa energia são reportados, por não demandarem de um gasto energético excessivo para obtenção de nanoemulsões (BILBAO-SÁINZ et al., 2010; CHIN et al., 2010; FERNANDEZ et al., 2004;

HUA et al., 2019; JAHANZAD et al., 2010; KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2015; LI et al., 2013; LV et al., 2014; MAYER et al., 2013; OSTERTAG et al., 2012; PANAGOPOULOU et al., 2015; PERAZZO et al., 2015; SAJJADI, 2006) Emulsificações de baixa energia são aquelas que não demandam energia aplicada ao sistema através de homogeneizadores (como por exemplo, misturadores de alta rotação, ultrassom ou pressurizados à altas pressões (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2016). Das emulsificações por alta energia, destacam-se a microfluidização e ultrassonificação (SALVIA-TRUJILLO et al., 2017). As de baixa energia, destaca-se na literatura: (1) a “inversão catastrófica de fase – ICF” (BILBAO-SÁINZ et al., 2010).

Ambos processos de emulsificação demandam a adição de emulsificantes diminuir a energia interfacial (equação 1) gerada pelo aumento na área superficial de contato entre duas fases imiscíveis, prevenindo o processo de agregação e coalescência (SALVIA-TRUJILLO et al., 2017).

Emulsificantes são moléculas anfifílicas, ou seja possuem porções hidrofílicas e hidrofóbicas de sua molécula, permitindo assim interagir com ambas fases, evitando o processo de separação de fase (MCCLEMENTS et al., 2017). Emulsificantes podem ser classificados segundo sua carga da região hidrofílica em iônicos (catiônicos e aniônicos), não-iônicos e anfóteros. Estes ainda podem ser classificados segundo seu balanço hidrofílico-lipofílico (HLB – *Hydrophilic-lipophilic balance*) dos surfactantes é enaltecido como relevante para a formação e estabilidade das NE. Valores de HLB maiores que 7 favorecem a formação de emulsões óleo/água, enquanto  $HLB < 7$  favorecem a formação de emulsões água/óleo (MAALI & MOSAVIAN, 2013).

### **2.1.2.1 – Inversão catastrófica de fase**

As nanoemulsões, sistemas coloidais formados por duas fases imiscíveis estabilizadas por um emulsificante, podem ser obtidas por diferentes métodos, nos quais parâmetros como energia aplicada e composição interferem nas propriedades dessas suspensões (MCCLEMENTS, 2007). A emulsificação por baixa energia pode ocorrer tanto de espontânea ou por inversão de fase, desde que a composição (quantidade das fases dispersa e contínua, bem como a característica do surfactante) ou o meio (temperatura, por exemplo) sejam alterados (JAHANZAD et al., 2010; SAJJADI, 2006).

Nos processos de emulsificação espontânea, de modo geral, fases imiscíveis são colocadas em contato (de forma controlada ou não) e um dos compostos presentes (emulsificante) é miscível em ambas as fases, movendo-se de uma para outra, gerando assim um aumento na razão óleo/água na interface e posterior desprendimento em gotas da fase dispersa, recobertas pelo emulsificante, suspensas na fase contínua. (MCCLEMENTS & RAO, 2011). O fator HLB e a localização do surfactante mostram-se importantes fatores para obtenção de NE mais estáveis e com menores tamanhos. No tocante do tipo de surfactante, o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB – *Hydrophilic-lipophilic balance*) dos surfactantes é enaltecido como relevante para a formação e estabilidade das NE. Valores de HLB maiores que 7 favorecem a formação de emulsões óleo/água, enquanto  $HLB < 7$  favorecem a formação de emulsões água/óleo (MAALI e MOSAVIAN, 2013). Neste caso, para uma NE do tipo óleo-em-água, surfactantes com caráter hidrofílico (com HLB maior que 7), quando solubilizados na fase dispersa (óleo) tendem a difundir para a fase contínua e esse processo favorece a formação de estruturas com diâmetros menores.

Os métodos de inversão de fase se dividem nos que ocorrem à composição constante (mantendo a fração de água e de óleo constante), variando nesse caso a temperatura (LIEW et al., 2010) e, os que ocorrem à temperatura constante (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2014), em que a composição da emulsão (fração de água, ou fração de óleo) varia. Dentre esses, destaca-se a inversão catastrófica de fase, que consiste na obtenção de nanoemulsões pela adição controlada da fase aquosa na fase de óleo ou vice-versa.

A FIGURA 2.1 ilustra o método de emulsificação por inversão catastrófica de fase. Nesta as NE são obtidas por um processo que consiste na adição da fase contínua (água) na fase do óleo, esta contendo (FIGURA 2.1b) ou não (FIGURA 2.1c) o surfactante. Para o caso que a fase do óleo não continha o surfactante, este foi adicionado à fase contínua (água), denominado “inversão catastrófica de fase 1”. Para o caso do surfactante adicionado à fase do óleo, esta foi denominada “inversão catastrófica de fase 2”. A adição foi feita de forma controlada, de forma que a razão entre as fases contínua e dispersa variou de 0 à 95, em relação a quantidade de água.

Para ambos os tipos de ICF, ao se adicionar a fase contínua (água) tem-se, inicialmente, uma emulsão do tipo água-em-óleo (FIGURA 2.1e). Com o aumento da

fração volumétrica da fase contínua (fração de água na FIGURA 2.1) uma maior quantidade de gotas de água são formadas, e estas tendem-se a se chocar e coalescer. Em uma determinada quantidade de adição da fase contínua ocorre a inversão catastrófica de fase, em que a emulsão transforma-se em emulsão óleo-em-água.

De acordo com KOMAIKO & MCCLEMENTS (2014) e OSTERTAG et al. (2012), emulsões mas finas, ou seja, com diâmetros menores de gotas são obtidas quando o surfactante é adicionado à fase dispersa, pois facilita a formação das emulsões múltiplas (gotículas da fase contínua que possuem gotículas da fase dispersa estabilizadas pelo surfactante) precursoras das NE. BILBAO-SÁINZ et al. (2010) verificaram ainda que a velocidade de adição de uma fase na outra resulta em NE com dispersão homogêneas de diâmetro. No que compete o estudo da obtenção de NE por esse processo, porém com o surfactante solubilizado na fase contínua (FIGURA 2.1b), há poucos trabalhos compreendendo o mecanismos relacionado à esse método e se este é o caso de uma inversão catastrófica de fase.

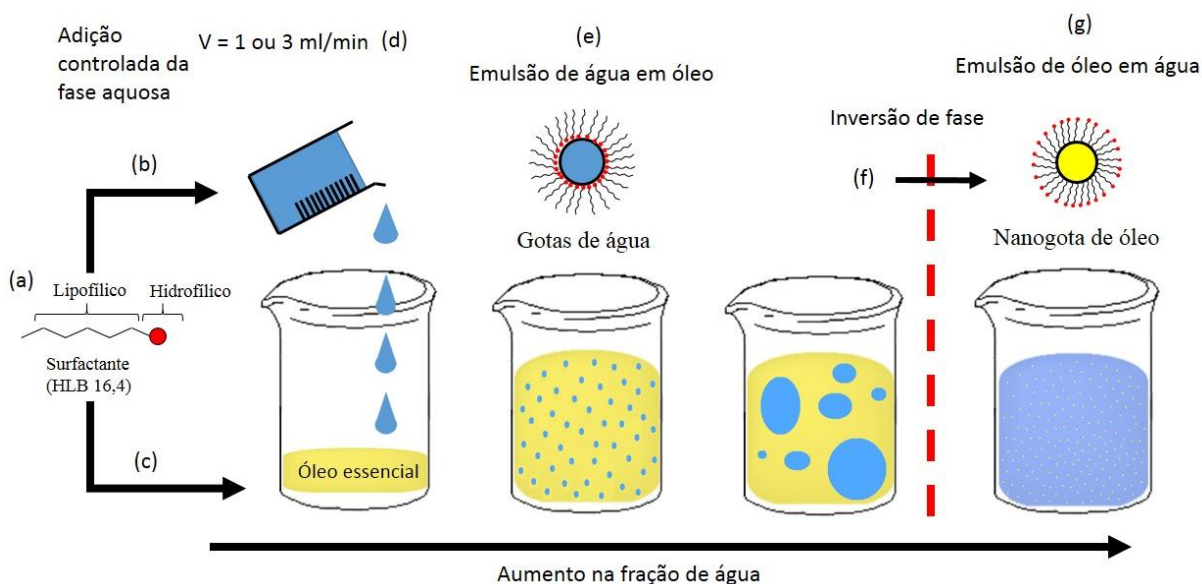


FIGURA 2.1: Método de emulsificação por inversão catastrófica de fase: O surfactante (a) foi solubilizado ou na fase aquosa (b) ou na fase lipofílica (c); a fase aquosa (b) foi adicionada à diferentes taxas (d) formando inicialmente uma emulsão de água em óleo (e) e com o aumento da fração de água ocorre a inversão de fase (f), obtendo-se nanoemulsões do tipo óleo em água (g). (Fonte do autor)

### **2.1.2.2 – Microfluidização em altas pressões**

Diferentemente do método de baixa energia, em que as características intrínsecas dos componentes, bem como as quantidade de cada um são relevantes para diminuir a diferença entre a energia interfacial (equação 1) de modo a facilitar a formação das NE, as emulsificações de alta energia produzem NE como resultado de forças de ruptura, as quais diminuem o tamanho das gotas, em gotas menores (MCCLEMENTS & RAO, 2011). A energia de ruptura pode ser provenientes de altas pressões (microfluidizador, por exemplo), homogeneizadores ou de ultrassons. Dentre esses processos, destaca-se a microfluidização (MF) em altas pressões, a qual é apresentada, de forma esquemática, na FIGURA 2.2.

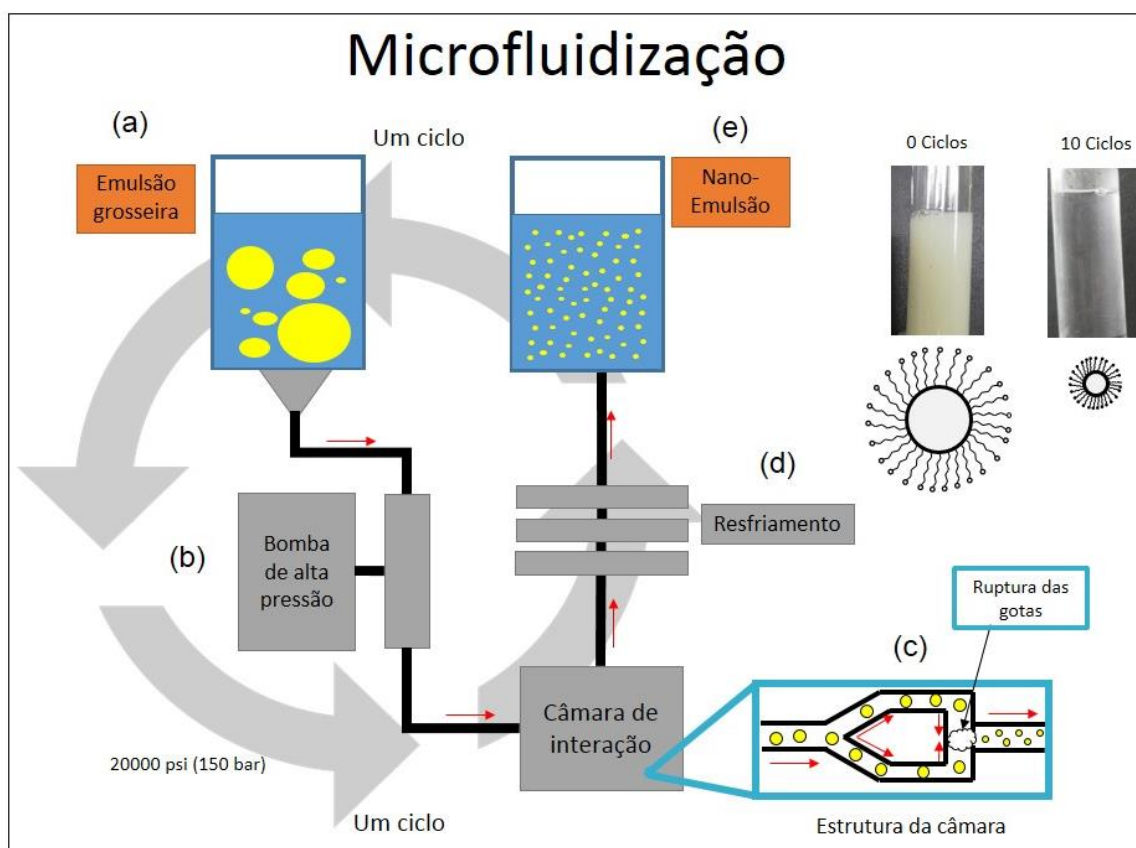


FIGURA 2.2: Método de emulsificação por MF em altas pressões: uma emulsão grosseira (a) foi inserida à altas pressões (b) e capilares ( $80\ \mu\text{m}$ ), os quais colidem (c) promovendo a ruptura das gotas de óleo; resfriamento (d) para controle da temperatura; reservatório de retirada da amostra (e). Esquema da câmara de interação (c) adaptado de (MCCLEMENTS & RAO, 2011)

Em tal processo, emulsões grosseiras com dispersões de diâmetro de gota entre 0,1 e 1000  $\mu\text{m}$  são inseridas (FIGURA 2.2a), em altas pressões (FIGURA 2.2b) na câmara de interação (FIGURA 2.2c), composta por canais de fluxo que se chocam à altas velocidades produzindo altas taxas de cisalhamento e número de choques de modo a promover a quebra de gotas em gotículas cada vez menores em diâmetro (LEE, L. et al., 2014). Um aumento de temperatura durante o processo ocorre, e para os casos em que evita-se a influência da variação de temperatura, um sistema de resfriamento é utilizado (FIGURA 2.2d). A emulsificação pode ser repetida, no que na literatura se remete “ciclos de microfluidização” (indicados como setas circulares cinzas na FIGURA 2.2.). Repetidos ciclos de passagem pelo sistema tem se mostrado eficientes na produção de NE com diâmetros entre 1 e 50 nm (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013b; SALVIA-TRUJILLO et al., 2014; ULUATA et al., 2016; YUAN et al., 2008).

Em todos os casos, a adição de emulsificantes mostra-se necessário. Estes atuam diminuindo a energia interfacial e, como consequência, facilitando o processo de ruptura das gotículas de óleo, bem como recobrem estas, evitando assim a coalescência ou agregação (MAALI & MOSAVIAN, 2013). Uma vez que é aplicada uma energia ao sistema de modo a facilitar a formação de NE, algo que não é termodinamicamente espontâneo, a quantidade de surfactante requerida ao sistema tem se mostrado menor do que a utilizada para NE obtidas por emulsificações de baixa energia para produção de NE com baixa polidispersividade. (MAYER et al., 2013). A busca nos últimos anos se volta para a utilização de biopolímeros como emulsificantes (BAI & MCCLEMENTS, 2016; MCCLEMENTS et al., 2017), ou a combinação de surfactantes como o polisorbato 20 e alginato de sódio (ARTIGA-ARTIGAS et al., 2017).

### **2.1.2.3 - Mecanismos de estabilidade**

Como citado anteriormente, NE são sistemas metaestáveis, os quais tendem com o tempo a sofrerem o processo de desestabilização ou de “quebra”, separando-se em fases imiscíveis. MCCLEMENTS (2007) apresenta mecanismos de instabilidade para as NE. Três diferentes mecanismos de instabilidade (FIGURA 2.3) podem atuar nas NE: (1) separação gravitacional (sedimentação e cremação) (FIGURA 2.3a); (2) agregação (floculação e coalescência) (FIGURA 2.3b); (3) envelhecimento de

Ostwald (EOW) (FIGURA 2.3c): moléculas do óleo migram de partículas maiores para menores, por diferença no gradiente de solubilidade.

A separação gravitacional (FIGURA 2.3a) é um dos mecanismos de instabilidade, em que as características das fases como diferença de densidade são determinantes. A lei de Stokes (Equação 2) descreve a taxa de separação gravitacional:

$$V_{Stokes} = \frac{2gr^2(\rho_{contínua} - \rho_{dispersa})}{9\eta} \quad (2)$$

em que  $g$  é a aceleração da gravidade,  $r$  é o diâmetro das nanogotas,  $\rho$  é a densidade das fases e  $\eta$  a viscosidade da fase contínua. Dessa forma, tanto o diâmetro das NE, quanto as densidades são fatores influenciadores na estabilidade das NE. Para valores de densidade da fase dispersa menor que da fase contínua, o sistema pode sofrer cremeação (FIGURA 2.3a). Para densidade da fase dispersa maior, a fase tende a sedimentar (FIGURA 2.3a). De acordo com a equação 2, menores tamanhos tendem a apresentar maior estabilidade contra a separação de fase. Os movimentos Brownianos, segundo KOMAIKO & MCCLEMENTS (2016), podem se opor ao movimento de separação, permitindo assim uma estabilidade maior às NE.

O envelhecimento de Ostwald (FIGURA 2.3b) é outro mecanismo apresentado na literatura (DONSÌ et al., 2011) e reportado, principalmente para NE, cuja composição da fase lipofílica apresenta certa solubilidade em água, como para alguns OE. Este ocorre pelo crescimento de partículas maiores (FIGURA 2.3b) a partir de partículas menores, devido ao gradiente de concentração do OE ser diferente entre essas partículas, fruto da maior solubilidade deste OE nos arredores das partículas menores (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2014). Tal evento ocorre inevitavelmente, e pode ser retardado com a adição de inibidores ou pela adição de compostos insolúveis à composição da fase lipofílica (RAO & MCCLEMENTS, 2012b).

A agregação de partículas podem ocorrer em sistemas compostos por NE, as quais são reportadas por dois processos (FIGURA 2.3c): floculação e coalescência. Estes se distinguem, basicamente, após a aproximação de duas partículas. O primeiro se dá quando partículas se aproximam uma das outras e mantendo-se seu diâmetro. No segundo, as partículas se aproximam, gerando uma única maior (MCCLEMENTS, 2007). A floculação ocorre quando forças atrativas (de natureza hidrofóbica ou de van der Waal) são maiores que as forças repulsivas (eletrostáticas ou estéricas) entre duas partículas

de modo a formar partículas agregados, sem que se percam a integridade das partículas menores (GREGORY, 2013). Enquanto na coalescência, além do balanço de forças atrativo-repulsivas, características das moléculas que circundam a partícula, com emulsificante e água devem ser consideradas. Em vias de regras, partículas coalescem pelo choque entre duas, em que a força de repulsão (eletrostática ou estérica) não é suficiente (KABALNOV, 1998).

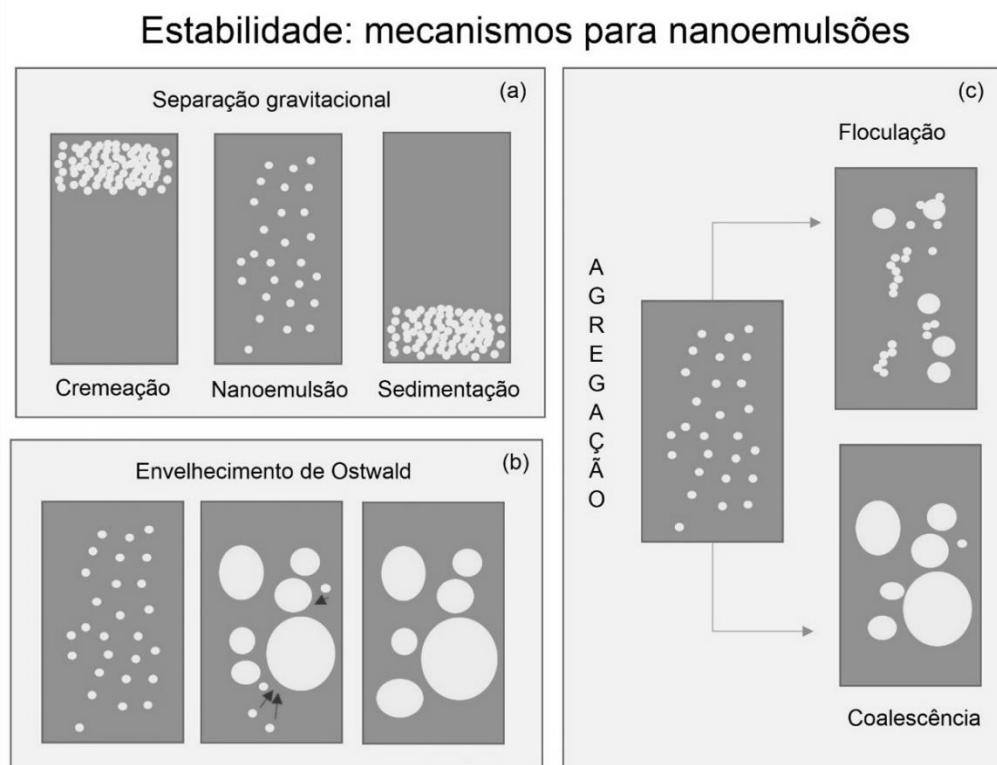


FIGURA 2.3: Esquematização dos mecanismos de instabilidade apresentados para nanoemulsões de óleo essencial: (a) separação gravitacional; (b) envelhecimento de Ostwald; (c) agregação. (Figura do autor).

### 2.1.3 – Embalagens ativas: propriedades antimicrobianas e antioxidantes

Embalagens para alimentos atuam como barreiras passivas, protegendo-os do meio externo (micro-organismos, umidade, gases, poeira e odores) (AZEREDO, 2009), mantendo a qualidade e a segurança dos alimentos, e devem apresentar algumas características como serem inertes, não tóxicas, e prolonguem a vida de prateleira dos alimentos (SUNG et al., 2013). Dentro dessas características, derivados de petróleo



mostram-se como fonte de matéria-prima para a produção de embalagens com propriedades de barreira e mecânicas satisfatórias e, ainda, baixo custo (LAGARON, 2011). Contudo, os polímeros derivados do petróleo não são, via de regra, biodegradáveis, além de não serem renováveis e de seus descartes ou queimas produzirem sérios problemas ambientais e ecológicos (SONG et al., 2011).

A utilização dos biopolímeros (proteínas, lipídeos e polissacarídeos) na produção de novas embalagens vem sendo objeto de estudo nas últimas décadas (FALGUERA et al., 2011), por serem biodegradáveis, provenientes de fontes renováveis – animais e vegetais (ARORA & PADUA, 2010) – e desvencilharem dos recursos petrolíferos (SONG et al., 2011).

Dentre esses biopolímeros, a pectina (PEC) é um polissacarídeo naturalmente encontrado na parede celular de vegetais (ESPITIA et al., 2014), composto basicamente pelo  $\alpha$ 1-4-ácido galacturônico (LOREVICE et al., 2016; MANRICH et al., 2017), e que vem sendo reportado como matéria-prima para a fabricação de filmes comestíveis (OTONI et al., 2017), por formar filmes coesos e transparentes (ESPITIA et al., 2014) e ser reconhecida como segura para o consumo humano (GRAS – generally recognized as safe) pela FDA (Food and Drug Administration – USA) (FDA, 2012). Segundo MOREIRA et al. (2013), a PEC possui diferenças relacionadas ao grau de metil-esterificação (GE), classificando-a em PEC de alto (PA) e de baixo (PB) grau de metil-esterificação.

O desenvolvimento de novas embalagens, como filmes e revestimentos, a partir de biopolímeros (COFFIN & FISHMAN, 1994; DE MOURA et al., 2012; FAKHREDDIN HOSSEINI et al., 2013; FARIAS et al., 2012; GALUS & KADZIŃSKA, 2015; KROCHTA & DEMULDERJOHNSTON, 1997; LOREVICE et al., 2012; LOREVICE et al., 2014; LOREVICE et al., 2016; MANRICH et al., 2017; OTONI et al.; PAVLATH & ORTS, 2009; SHIN et al., 2014; SHIT & SHAH, 2014; WANG et al., 2011) vem amenizando o efeito do descarte das embalagens plásticas no ambiente. Entretanto, filmes produzidos a partir de polipeptídios e polissacarídeos apresentam, em geral, propriedades físico-químicas inferiores se comparadas às dos polímeros sintéticos (AZEREDO, 2009) . Uma alternativa reportada nas últimas revisões é a adição de agentes de reforço (fibras vegetais, nanopartículas e até nanoemulsões) às matrizes dos

filmes, o que resultou na melhoria das propriedades mecânicas, térmicas e de barreira (ARORA & PADUA, 2010; HAN, 2014; RHIM et al., 2013).

Devido às atividades antimicrobianas e antioxidantes dos OE, estes vêm sendo adicionados às matrizes de filmes poliméricos sintéticos (KUORWEL et al., 2011b), e matrizes biopoliméricas (KUORWEL et al., 2011a), adicionando, assim, propriedades ativas às propriedades convencionais de proteção e prolongamento da qualidade e vida de prateleira dos alimentos (SUNG et al., 2013).

A atividade antimicrobiana do OE de alho contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes* foi observada em filmes de proteína do soro do leite (SEYDIM & SARIKUS, 2006). Resultado similar foi reportado por GÓMEZ-ESTACA et al. (2010) para filmes de gelatina bovina adicionados de OE de alecrim para os micro-organismos *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

A utilização de nanoestruturas como alternativa para o incremento das propriedades antimicrobianas (BILBAO-SÁINZ et al., 2010; DE MOURA et al., 2014; DONSI et al., 2011; OTONI et al., 2014; PÉREZ-CÓRDOBA et al., 2018; PRAKASH et al., 2018; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013a; SEVERINO et al., 2015) vem sendo apresentado de forma diminuir a quantidade de OE adicionada (pelo seu sabor e aroma característicos) (ATARES & CHIRALT, 2016), e aumentar a aplicabilidade dos filmes.

Na revisão bibliográfica apresentada, constata-se uma busca pela utilização de novos compostos, provenientes de fontes naturais, para diminuição dos efeitos de proliferação de micro-organismos e de oxidação em alimentos, principais agentes de decréscimo do tempo de prateleira. Dentre os compostos, destacam-se os óleos essenciais, por apresentarem reconhecida atividade antioxidante e antimicrobiana.

A produção de nanoemulsões desses compostos tem se mostrado extremamente conveniente pela ampla forma de obtenção, seja por alta ou baixa energia, ou pela adição de quaisquer surfactantes, ou uso irrestrito a quase todos os OE, sem que se perca ou diminua-se as propriedades à eles relacionadas, como antioxidantes e antimicrobianas.

Somado à isso, nanoemulsões do tipo óleo-em-água, diminuem o efeito da hidrofobicidade dos OE, por estes estarem suspensos em meio aquoso devido à função estabilizante dos surfactantes. Isso permite sua incorporação em matrizes de biopolímeros, com mínimos efeitos de separação de fase, possibilitando assim uma

dispersão mais homogênea na matriz polimérica e, conseqüentemente, em materiais mais homogêneos.

Esses materiais tem apresentado considerável atividades ativas (antioxidantes e antimicrobianas), relacionadas na grande maioria à diminuição nos diâmetros médios das dispersões, bem como o incremento na superfície de contato.

Entretanto, constata-se pouca compreensão acerca do papel do surfactante na matriz polimérica, principalmente no que refere-se a sua quantidade e suas interações com a matriz, haja vista que este é o agente “interlocutor” entre duas fases imiscíveis, a fase lipofílica (OE) e hidrofílica (suspensão polimérica). Isso encoraja novos trabalhos de modo a compreender o surfactante como componente importante do ponto de vista de quantidade e papel no sistema.

Por todo o exposto, este trabalho apresenta um estudo que compete a compreensão da obtenção de NE por métodos de emulsificação por alta e baixa energia e diferentes razões de surfactante/OE e qual a influência desses componentes na estabilidade coloidal deste sistema. Em complemento, estudou-se o sistema polímero/surfactante e polímero/NE, abordando os mecanismos de interação dos componentes dos sistemas com propriedades físico-químicas, antioxidantes e antimicrobianas dos bionanocompósitos obtidos.

## CAPÍTULO 3

### 3- Objetivos

O objetivo deste trabalho foi o estudo da produção de nanoemulsões de óleos essenciais e a avaliação da estabilidade e, posterior incorporação em filmes de pectina para compreensão de suas interações e do efeito da quantidade de surfactante nas propriedades físico-químicas, antioxidantes e antimicrobianas dos bionanocompósitos.

#### 3.1 – Objetivos específicos

Esse trabalho teve como objetivos específicos:

- Estudar a obtenção de nanoemulsões de óleos essenciais, de alecrim e de alho, por emulsificação de alta (microfluidização) e de baixa energia (inversão catastrófica de fase), variando os parâmetros de emulsificação (alta ou baixa energia) e as quantidades de surfactante em relação à fase dispersa, visando obter menores diâmetros de partículas, distribuições de diâmetros mais homogêneos e maior estabilidade;
- Elucidar o mecanismos de interação entre o surfactante e a matriz péctica e das nanoemulsões com a matriz péctica; usando técnicas de espalhamento dinâmico da luz, espectroscopia na região do Ultravioleta e reometria;
- Investigar o efeito da quantidade de surfactante nas propriedades físico-químicas (mecânicas, térmicas e de molhabilidade à água), antimicrobianas, antioxidantes e na morfologia, dos filmes de pectina/surfactante e pectina/nanoemulsões produzidos por *casting*.



## CAPÍTULO 4

### 4- NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM ÁGUA: INFLUÊNCIAS DO PROCESSO E DA RAZÃO ENTRE SURFACTANTE E FASE DISPERSA.

#### 4.1 - Material

Os OE de alecrim (*Rosemarinus officinalis*; densidade: 0,925 g·mL<sup>-1</sup>; índice de refração: 1,467) e de alho (*Allium sativum*; densidade: 1,0175 g·mL<sup>-1</sup>; índice de refração: 1,569) foram gentilmente doados pela empresa Lapiendrius Flavours (Itaquaquecetuba, SP). O polisorbato 80 (T80), de massa molar de 1610 g·mol<sup>-1</sup> e densidade de 1,065 g·mL<sup>-1</sup>, foi obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP). Os reagentes Müller Hinton, dimetilsulfóxido (DMSO), 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) e ágar Müller Hinton foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP).

#### 4.2 – Metodologia experimental

Os protocolos experimentais reportados neste capítulo foram divididos em três etapas: (1) determinação das concentrações mínimas inibitória (CMI) e bactericida (CMB) dos OE de alecrim e de alho; (2) produção das nanoemulsões por métodos de emulsificação envolvendo alto ou baixo fornecimentos de energia; e (3) avaliação da estabilidade coloidal das nanoemulsões.

##### 4.2.1 - Caracterização da atividade antimicrobiana dos OE de alecrim e de alho: concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida ou bacteriostática

A CMI e a CMB foram determinadas para quatro diferentes culturas de bactérias, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433); sendo as duas primeiras Gram negativas e as últimas Gam positivas. O ensaio foi realizado segundo o método de microdiluição em caldo (M7) como descrito na literatura (GAO et al., 2011; INSTITUTE, 2012; MA et al., 2015). Primeiramente, 5,0 µL de cultura de cada bactéria, cerca de 1x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) foram inoculadas em 100,0 µL de caldo Müller Hinton para cada um dos 96 fossos (cada cultura de bactéria possui uma placa com 96 fossos de 200 µL). Em seguida, as amostras de cada OE

(concentração inicial de  $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , ou 10% m/v) foram adicionadas em uma série de diluições, sempre metade da anterior, até a concentração de  $0,0244 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os OE foram diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO) e T80 (razão 1:1, óleo/surfactante). Fossos contendo apenas DMSO e DMSO+T80 foram preparados e utilizados como controle. Todas as composições foram preparadas da seguinte forma:  $2,001 \pm 0,001 \text{ mL}$  de DMSO com  $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (ou 10% m/v) de OE e  $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de T80; para as soluções controle de DMSO e T80, a quantidade de OE foi substituída por água destilada; para a amostra apenas com DMSO, as quantidades de OE e T80 foram substituídas por água destilada. Todas as placas de microdiluição foram condicionadas em estufa à  $35^\circ\text{C}$  por 24 horas. Em seguida, em cada um dos 96 fossos foram adicionados  $50 \mu\text{L}$  de corante CTT, cuja coloração vermelha identifica culturas de bactérias. A partir dessa observação, avaliou-se quais seriam os fossos que apresentavam crescimento ou inibição das cepas bacterianas.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de CMI, avaliou-se a concentração mínima bacteriostática ou bactericida: o fosso, cuja coloração não variou, ou seja, no qual não ocorreu crescimento de bactérias indicou a CMI. A partir deste foram escolhidos um ponto mais diluído e dois anteriores menos diluídos que os valores de CMI e todos foram espalhados em meio de cultura sólido Müller Hinton. Todas as placas de Petri foram incubadas em estufa, a  $35^\circ\text{C}$  durante 24 h. Após esse período, avaliou-se em qual das placas ocorreu ou não o crescimento das culturas de bactéria. Ocorrendo o crescimento, o valor de CMI foi classificado como concentração mínima inibitória (passível de impedir o crescimento, mas sem a eliminação da cepa do micro-organismo). De modo a avaliar o valor de CMB, a partir do o fosso cuja CMI foi determinada, retirou-se o antecessor e o posterior, os quais foram transferidos para o ágar. A concentração correspondente às placas que não apresentaram crescimento de nenhuma colônia foram denominadas como CMB, pois além de inibir o crescimento da cultura, resultaram no perecimento das colônias.

#### 4.2.2 - Produção de nanoemulsões de óleos essenciais por emulsificação de baixa e de alta energia.

Dois diferentes processos de emulsificação foram utilizados: a inversão catastrófica de fase (uma emulsificação de baixa energia) e a microfluidização a altas pressões (emulsificação de alta energia). Para a composição das NE, avaliaram-se as quantidade de surfactante T80 e, conseqüentemente, a razão mássica entre o surfactante e óleo essencial (RSO). Valores de RSO iguais a 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 foram testados. A FIGURA 4.1 apresenta um resumo gráfico das variáveis estudadas no processo de obtenção de NE

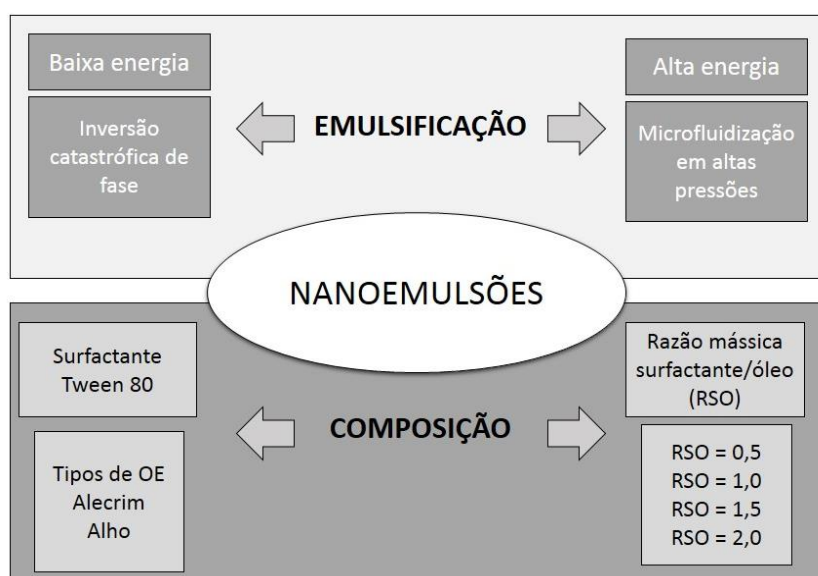


FIGURA 4.1: Resumo gráfico dos parâmetros utilizados para obtenção das nanoemulsões por dois diferentes processos de emulsificação: inversão catastrófica de fase (baixa energia) e microfluidização em altas pressões (alta energia); variando a composição a partir da variação da razão mássica (RSO) entre surfactante e óleo essencial.

##### 4.2.2.1 - Emulsificação de baixa energia: inversão catastrófica de fase

Para o caso das NE obtidas neste trabalho, utilizou-se a adição da fase contínua (aquosa) (FIGURA 2.1) na fase dispersa (OE), como descrita por (OSTERTAG et al., 2012). A FIGURA 2.1 demonstra o procedimento experimental para obter nanoemulsões por esse método.



As características do OE utilizado (como a densidade) podem influenciar nas propriedades das NE (OSTERTAG et al., 2012). Sendo assim, utilizaram-se dois OE: alecrim e alho. A característica do surfactante (solubilidade em água ou óleo) e a localização deste (solubilizado na fase contínua ou na fase dispersa) interferem na distribuição do diâmetro médio, e na estabilidade das NE. Diante disso, optou-se por solubilizar o surfactante T80 (hidrofílico com HLB igual à 16,4) na fase aquosa (FIGURA 2.1b) ou na fase dispersa (FIGURA 2.1c).

A produção das NE se deu em dois diferentes protocolos: (1) Inversão catastrófica de fase em que o surfactante foi solubilizado na fase aquosa, identificado pela sigla ICF 1; (2) Inversão catastrófica de fase em que o surfactante foi adicionado no OE, fase lipofílica, identificado pela sigla ICF 2. Para todas as NE, a fração volumétrica entre água e óleo foi de 95.

TABELA 4. 1: Porcentagens dos componentes das nanoemulsões de óleo essencial de alecrim ou de alho para a emulsificação por inversão catastrófica de fase ICF. Valores foram utilizados tanto para o OE de alecrim, quanto para o de alho.

<b>Emulsificação</b>	<b>RSO<sup>a</sup></b>	<b>[Óleo essencial] (% v/v)</b>	<b>[surfactante] (%m/v)</b>	<b>Velocidade de adição (ml·min<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b>
ICF1 <sup>c</sup>	0,5	5	2,26	1
ICF1	1,0	5	4,43	1
ICF1	1,5	5	6,51	1
ICF1	2,0	5	8,51	1
ICF2 <sup>d</sup>	0,5	5	2,26	1
ICF2	1,0	5	4,43	1
ICF2	1,5	5	6,51	1
ICF2	2,0	5	8,51	1
ICF1	0,5	5	2,26	3
ICF1	1,0	5	4,43	3
ICF1	1,5	5	6,51	3
ICF1	2,0	5	8,51	3
ICF2	0,5	5	2,26	3
ICF2	1,0	5	4,43	3
ICF2	1,5	5	6,51	3
ICF2	2,0	5	8,51	3

<sup>a</sup>Razão mássica entre surfactante e óleo essencial; <sup>b</sup>Velocidade de adição da fase aquosa (H<sub>2</sub>O);

<sup>c</sup>Inversão catastrófica de fase tipo 1 (surfactante solubilizado na fase aquosa); <sup>d</sup>Inversão catastrófica de fase tipo 2 (surfactante solubilizado na fase oleosa).

No caso do protocolo ICF 1, diferentes concentrações de surfactante (TABELA 4.1) foram solubilizadas em  $9,5 \pm 0,5$  mL de água deionizada, com agitação de 1000 rpm em agitador magnético por 30 min. Posteriormente a fase contínua foi adicionada de forma controlada à fase lipofílica ( $0,500 \pm 0,005$  mL) sob agitação de 1500 rpm. A adição da fase contínua foi feita em duas taxas: 1,0 e 3,0 mL·min<sup>-1</sup>. Após a adição a NE foi deixada sob agitação por cerca de 30 min.

No caso da ICF 2, o surfactante foi adicionado à fase lipofílica (0,5 mL) sob agitação de 1000 rpm por 30min. Posteriormente adicionaram-se  $9,5 \pm 0,5$  mL da fase aquosa na fase lipofílica sob as mesmas taxas: 1,0 e 3,0 mL·min<sup>-1</sup>. Ao término, essas suspensões foram deixadas sob agitação de 1500rpm por cerca de 30min. Todas as NE foram produzidas em duplicata.

#### 4.2.2.2 - Emulsificação de alta energia: Microfluidização em altas pressões

Emulsões grosseiras foram preparadas solubilizando diferentes concentrações de T80 (TABELA 4.2) em  $47,5 \pm 0,5$  mL de água deionizada sob agitação de 1500 rpm. Após a completa solubilização do surfactante, esta fase foi adicionada a  $2,5 \pm 0,5$  mL (5% v/v) do OE (alecrim ou alho) sob agitação por 10 min. Posteriormente, estas emulsões foram submetidas a 0, 1, 2, 3, 5 ou 10 ciclos de homogeneização a 138 MPa (20.000 psi) em microfluidizador (modelo M-110P, Microfluidics Corp., EUA). Todas as NE foram feitas em replicata.

TABELA 4. 2: Porcentagens dos componentes da nanoemulsões de óleo essencial de alecrim ou de alho obtidas por microfluidização (MF) em altas pressões.

RSO <sup>a</sup>	[OE] (% v/v)	[surfactante] (%m/v)	Ciclos de MF
0,5	5	2,26	0
1,0	5	4,43	0
1,5	5	6,51	0
2,0	5	8,51	0
0,5	5	2,26	1
1,0	5	4,43	1
1,5	5	6,51	1
2,0	5	8,51	1
0,5	5	2,26	2
1,0	5	4,43	2
1,5	5	6,51	2
2,0	5	8,51	2
0,5	5	2,26	3
1,0	5	4,43	3
1,5	5	6,51	3
2,0	5	8,51	3
0,5	5	2,26	5
1,0	5	4,43	5
1,5	5	6,51	5
2,0	5	8,51	5
0,5	5	2,26	10
1,0	5	4,43	10
1,5	5	6,51	10
2,0	5	8,51	10

<sup>a</sup>Razão mássica entre surfactante e óleo essencial;

### **4.2.3 - Caracterização da distribuição de tamanho, tamanho médio e potencial zeta das nanoemulsões**

Os valores de tamanho médio e distribuição dos diâmetros médios das NE produzidas nos itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2 foram analisados por espalhamento dinâmico da luz em um Malvern Zetasizer Nano ZS (Worestershire, Reino Unido) com feixe de luz com comprimento de onda 635 nm e usando o ângulo do detector de 173°. Para todas as amostras analisadas, diluíram-se 500 µL de amostra em 1500 µL de água deionizada. Partículas com diâmetro superior a 3000 nm foram desconsideradas por estarem acima do limite de detecção do equipamento, como reportado por MAYER et al. (2013). Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e logo após a produção das NE.

### **4.2.4 - Estabilidade coloidal das nanoemulsões de óleo essencial de alecrim e de alho.**

As estabilidades coloidais das NE obtidas nos itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2. foram analisadas no equipamento LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha). Cerca de 200 µL da amostra foram transferidos para cubetas de poliamidas com caminho óptico de 1 mm e posicionadas horizontalmente no equipamento, sendo posteriormente submetidas à incidência de um feixe de luz na região do infravermelho próximo ( $\lambda = 865\text{nm}$ ) em um campo centrífugo imposto pela rotação a 4000 rpm por 24 h. As estabilidades destas emulsões foram avaliadas a partir da correlação transmitância/posição/tempo. A partir desta, obtiveram-se os valores de índice de instabilidade (II), valor adimensional entre 0 e 1, sendo tão mais instável quanto mais próximo da unidade.

### **4.2.5 – Microscopia eletrônica de transmissão em modo criogênico (MET-crio)**

NE foram caracterizadas quanto às suas morfologias estruturais MET-crio em um microscópio JEOL-1400 PLUS. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica, pertencente ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas, SP. Amostras de NE/alecrim ICF 1 (RSO 1,0), ICF 2 (RSO 2,0) e MF (RSO

2,0) foram depositadas em grades de TEM de cobre recobertas com filme lacey de carbono (200–300 mesh, Ted Pella, Ltd., Redding, EUA) e instantaneamente inseridas em etano líquido (-170 °C) em um sistema de vitrificação com controle do ambiente (da sigla em inglês CEVS – “*controlled environment vitrification system*”) modelo Vitrobot. Posteriormente as amostras foram mantidas em nitrogênio líquido (-196 °C) durante toda a análise.

### 4.3 - Resultados e Discussão

#### 4.3.1 - Caracterização da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alho e de alecrim: concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida

A TABELA 4.3 apresenta os resultados de CMI das quatro diferentes culturas de bactérias e os resultados de atividade antimicrobiana dos OE de alecrim e de alho em quatro culturas de bactérias (TABELA 4.1). A partir desta, obteve-se um gráfico (FIGURA 4.2) de barras da CMI.

TABELA 4. 3: CMI para os OE de alecrim e de alho para diferentes relações de quantidade de óleo e de solução.

Bactérias	CMI (OE alho)			CMI (OE alecrim)			Gram
	mg/mL	m/m (%)	v/v (%)	mg/mL	m/m (%)	v/v (%)	
<i>E. coli</i>	3,125	0,312	0,291	3,125	0,312	0,338	Negativa
<i>S. typhimurium</i>	6,250	0,625	0,581	6,25	0,625	0,676	Negativa
<i>E. faecalis</i>	0,195	0,020	0,018	3,125	0,312	0,338	Positiva
<i>S. aureus</i>	0,390	0,039	0,036	6,25	0,625	0,676	Positiva

A partir da FIGURA 4.2, observa-se que os OE de alecrim e de alho apresentaram diferença significativa para a característica Gram das bactérias, o que se deu em função de uma parede celular mais complexa: bactérias classificadas como Gram-negativas apresentam uma camada externa à parede celular composta por lipopolissacarídeos e polipeptídeosglicanos que competem uma barreira à macromoléculas e compostos hidrofóbicos, como os presentes em OE (MAISANABA et al., 2017). Dessa forma, o inibitório foi mais efetivo para bactérias Gram positivas (FIGURA 4.2), que demandaram uma quantidade menor de OE para que houvesse a inibição do crescimento (maior CMI). Com relação aos diferentes OE, o alho foi mais efetivo que o OE de alecrim para Gram-positivas.

A atividade antimicrobiana de OE está relacionada aos seus componentes majoritários. Muitos trabalhos têm discutido a composição e o efeito antibacteriano dos OE de alho e de alecrim (ATTI-SANTOS et al., 2005; BARBOSA et al., 2016; BENKEBLIA, 2004; FU et al., 2007; GENENA et al., 2008; HARRIS et al., 2001; HONÓRIO et al., 2015; MARTINS et al., 2016; SANTOYO et al., 2005). No caso do OE de alho, seu composto majoritário é a alicina (dialil tiosulfanato) que representa, segundo BAKRI & DOUGLAS (2005), cerca de 70% dos tiosulfanatos presentes no extrato do alho.

Para o OE de alecrim, o composto majoritário é o eucaliptol (1,8 cineol), um terpeno que pode, segundo CELIKTAS et al. (2007), apresentar de 20 a 60% da massa total do extrato de alecrim, dependendo das questões regionais e sazonais.

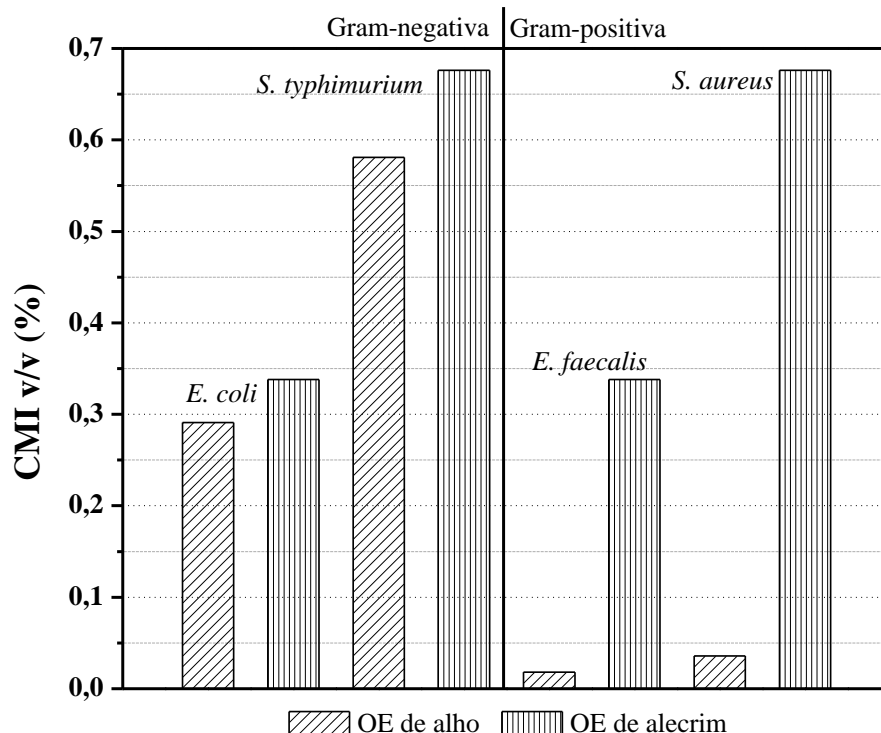


FIGURA 4.2: CMI dos OE de alecrim e de alho contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Considerando o composto majoritário como sendo o principal composto responsável pelo efeito antimicrobiano dos OE de alecrim e de alho e que cada OE depende da fonte e do método de extração, é de se esperar que os resultados de CMI possam divergir dos resultados apresentados na literatura. CELIKTAS et al. (2007) estudaram a composição do extrato da *Rosemary officinalis* obtido em três diferentes épocas do ano, e em três diferentes regiões do planeta, e encontraram teores de eucaliptol variando: de 20 a 60%. Dessa forma, a TABELA 4.4 compara os valores de CMI dos OE de alecrim e de alho encontrados no presente trabalho com aqueles reportados na literatura.

TABELA 4. 4: Valores de concentração mínima inibitória (CMI) apresentada na literatura para as quatro culturas de bactérias: *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* e *S. aureus* contra óleos essenciais (OE) de alho e de alecrim.

Gram	Bactérias	CMI (% v/v) <sup>a,c</sup>	CMI (% v/v) <sup>b,c</sup>	Referências
		OE de alho	OE de alecrim	
Negativa	<i>E. coli</i>	0,291	0,338	<b>Presente trabalho</b>
		-	0,500	BARBOSA et al. (2016)
		-	1,800 – 2,160	CELIKTAS et al. (2007)
		-	0,250	FU et al. (2007)
		-	0,400	GAMAGE et al. (2009)
		-	0,108	GENENA et al. (2008)
		0,001	-	GULL et al. (2012)
		10,000	-	KIM (2003)
		-	3,550	RASHID (2010)
		0,581	0,676	<b>Presente trabalho</b>
	<i>S. typhimurium</i>	5,000	-	BENKEBLIA (2004)
		-	0,400	GAMAGE et al. (2009)
		0,018	-	GULL et al. (2012)
		0,018	0,338	<b>Presente trabalho</b>
Positiva	<i>E. faecalis</i>	6,640	-	BAKRI & DOUGLAS (2005)
		-	0,900 – 2,160	CELIKTAS et al. 2007
		0,036	0,676	<b>Presente trabalho</b>
	<i>S. aureus</i>	6,640	-	BARKI et al (2005)
		5,00	-	BENKEBLIA (2004)
		-	1,800 – 2,160	CELIKTAS et al. (2007)
		-	0,125	FU et al. (2007)
		-	0,027 – 0,055	GENENA et al. (2008)
		0,0180	-	GULL et al. (2012)
		7,440	-	JOHNSON et al. (2016)
10,000	-	KIM (2003)		

<sup>a</sup> densidade do OE de alho: 1,075g·mL<sup>-1</sup> disponibilizada pelo fabricante; <sup>b</sup> densidade do OE de alecrim: 0,924g·mL<sup>-1</sup> disponibilizada pelo fabricante; <sup>c</sup> para o cálculo de %v/v: [(g)/(g/mL)]x(100%).

A partir dos dados da FIGURA 4.2 é possível observar que para todas as cepas e os dois tipos de OEs, os valores das CMI ficaram abaixo de 0,7% v/v, quantidade

essa interessante pequena. Sendo assim, a concentração de óleo escolhida foi de 5% m/v, cerca de dez vezes superior às CMI obtidas para os dois tipos de OE, de modo a garantir que durante a produção das NE e posterior adição na matriz polissacarídicas haja OE para inibir o crescimento bacteriano. Tal concentração de OE está entre os valores utilizados para obtenção de NE (PERAZZO et al., 2015) por emulsificações por baixa (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2016) e alta energia (ESPITIA et al., 2019).

#### 4.3.2 - Tamanho médio, distribuição de tamanho e potencial zeta

##### 4.3.2.1 – Diâmetro médio e distribuição de tamanho das NE de OE obtidas por Inversão Catastrófica de fase

NE de OE de alecrim (fotografias digitais apresentadas na FIGURA 4.3) ou de alho (FIGURA 4.4) foram obtidas por método de emulsificação de baixa energia: a inversão catastrófica de fase do tipo 1 (ICF 1 - surfactante adicionado à fase aquosa) e do tipo 2 (ICF 2 - surfactante adicionado ao óleo essencial). A FIGURA 4.5, FIGURA 4.6 apresentam, respectivamente, o diâmetro médio para as NE/Alecrim e NE/Alho.

A FIGURA 2.3 e FIGURA 4.4 representam a característica visual das NE obtidas pelos métodos ICF 1 e ICF 2. Emulsões com diâmetros maiores, tendem a ser translúcida, característica essa verificada mais intensamente para as emulsões obtidas por ICF2, o que pode ser um indicio de suspensões com diâmetros maiores.

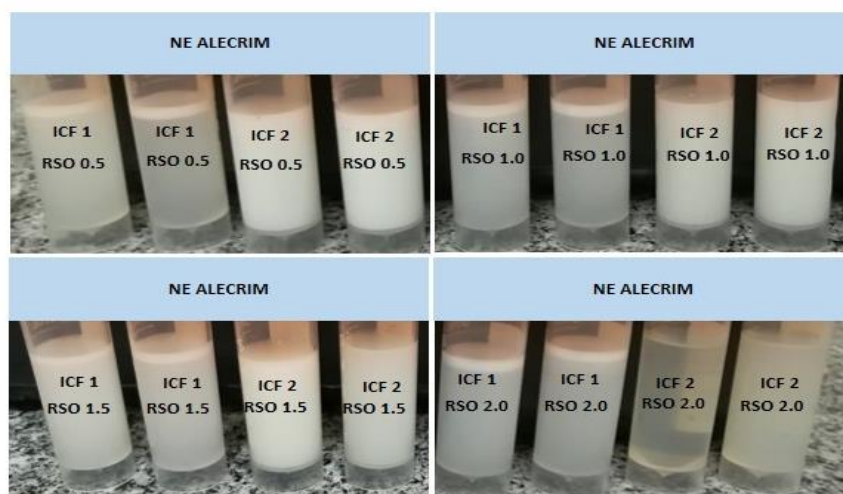


FIGURA 4. 3: Nanoemulsões de OE de Alecrim obtidas por inversão catastrófica de fase 1 ( ICF1 - surfactante adicionado à fase hidrofílica) e 2 (ICF 2 - surfactante na fase lipofílica) para diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Fração volumétrica de água igual a 95.



O surfactante atua, quando presente em uma mistura de dois líquidos imiscíveis, de forma a estabilizá-los, diminuindo a energia interfacial entre (PERAZZO et al., 2015). No caso de uma NE do tipo óleo-em-água, o surfactante tende a recobrir a fase dispersa (OE), diminuindo a tensão interfacial do sistema e evitando que ocorra agregação e coalescência das gotas. Dessa forma, três diferentes variáveis foram consideradas para a obtenção de NE por ICF: (1) a localização do surfactante (fase aquosa – ICF 1 ou lipofílica- ICF 2); (2) a velocidade de adição da fase aquosa na fase lipofílica (1 e 3 ml·min<sup>-1</sup>); (3) quantidade de surfactante (T80) pela variação razão mássica surfactante/OE (RSO) de quantidades inferiores à quantidade de OE utilizada (RSO 0,5) à quantidade superiores à de OE utilizada (RSO 2,0).

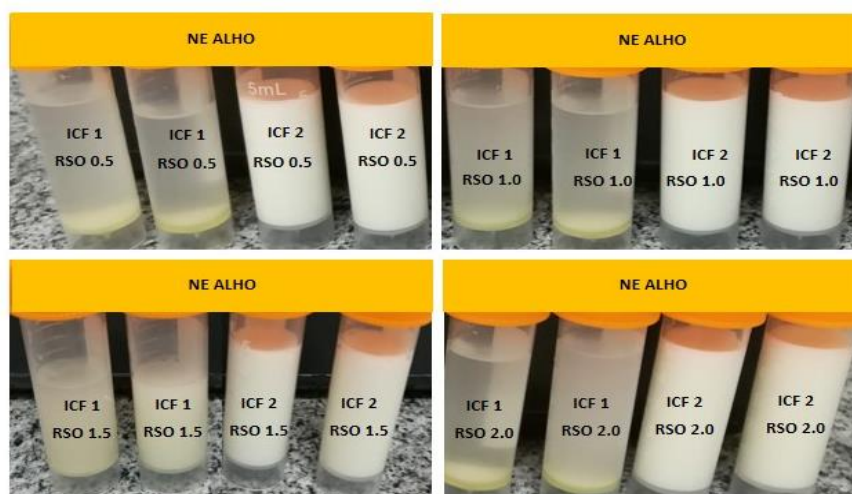


FIGURA 4. 4: Nanoemulsões de óleo essencial de Alho obtidas por inversão catastrófica de fase 1 (surfactante adicionado à fase hidrofílica) e 2 (surfactante na fase lipofílica) para diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Fração volumétrica de água igual a 95

De acordo com a FIGURA 4.5, as NE/alecrim obtidas que apresentaram os menores diâmetros médios (próximos à 100 nm) foram: RSO 1,0/1ml·min<sup>-1</sup> (FIGURA 4.5a); RSO 1,0/3mL·min<sup>-1</sup> (FIGURA 4.5c); RSO 1,5/3mL·min<sup>-1</sup>(FIGURA 4.5c). Tais valores foram obtidos para o caso da emulsificação ICF 1, onde o surfactante está localizado na fase aquosa. Quando o surfactante foi adicionado à fase lipofílica (ICF 2), os menores valores foram: RSO 1,5/1mL·min<sup>-1</sup> (FIGURA 4.5b); RSO 1,5/3mL·min<sup>-1</sup> (FIGURA 4.5d).

As NE/alho produzidas apresentaram valores de diâmetro médio na região entre 100 e 500nm para as seguintes composições para ICF1: RSO 1,0/ 1mL·min<sup>-1</sup>

(FIGURA 4.6a); RSO 2,0/1 mL·min<sup>-1</sup> (FIGURA 4.6a); RSO 1,0/3 mL·min<sup>-1</sup> (FIGURA 4.6c). Quando o surfactante foi, inicialmente solubilizado na fase lipofílica, ou seja, NE obtidas por ICF2, a formação de NE com diâmetros entre 100 e 500 nm foi obtida apenas para quantidades de surfactante inferior a de OE (RSO 0,5).

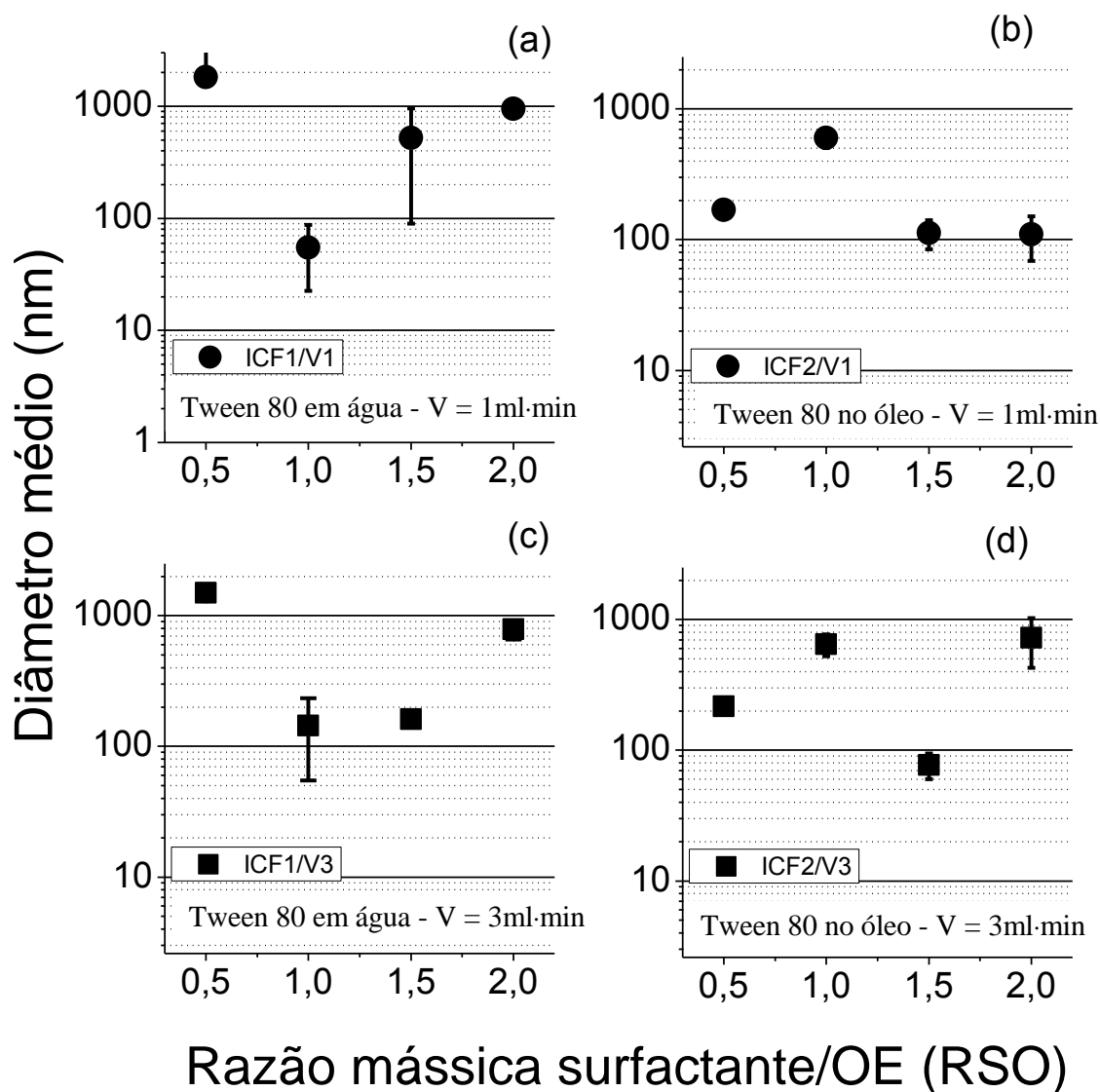
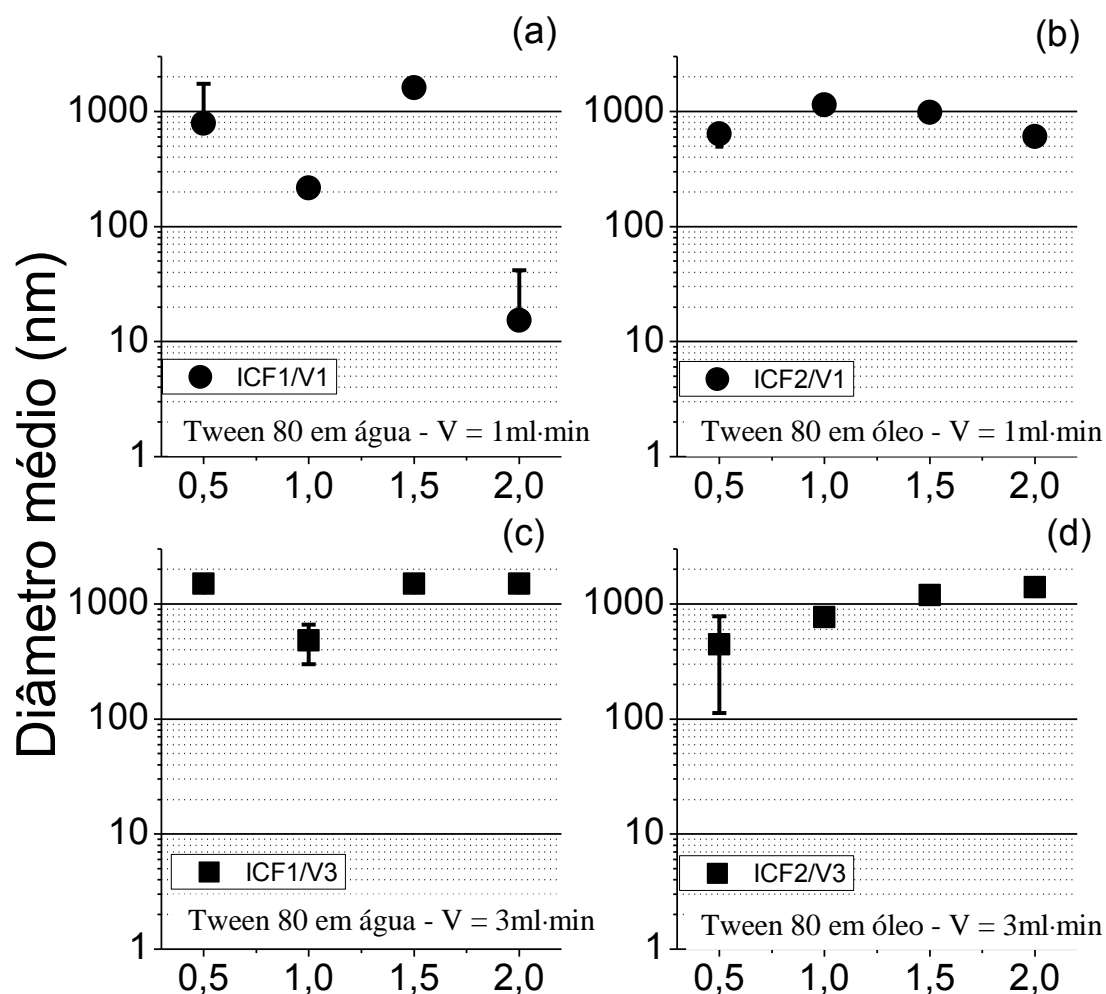


FIGURA 4. 5: Diâmetro médio de nanoemulsões de óleo essencial de alecrim obtidas por inversão catastrófica de fase: surfactante solubilizado em água (ICF1, a e c) e solubilizado no óleo (ICF2 – b e d). Razões mássicas de surfactante/óleo (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Velocidade de adição de (●) de 1,0 mL·min<sup>-1</sup> e de 3,0 mL·min<sup>-1</sup> (■). Fração volumétrica de água igual a 95.

Observa-se para as NE/alecrim (FIGURA 4.5), que tanto o método ICF1, quanto o ICF 2 resultaram em NE com diâmetros médios de gotas próximos à 100 nm,

sendo o protocolo ICF 2 o que necessitou de uma maior quantidade de surfactante para obter menores diâmetros médios. No caso das NE/alho (FIGURA 4.6), o método mais efetivo para obtenção de NE foi o ICF 1. A localização do surfactante não mostrou-se interferente para as NE/alecrim. Contudo, foi determinante para a obtenção de partículas sub-micrométricas para o OE de alho.



## Razão mássica surfactante/OE (RSO)

FIGURA 4. 6: Diâmetro médio de nanoemulsões de óleo essencial de alho obtidas por inversão catastrófica de fase: surfactante solubilizado em água (ICF1 – a e c) e solubilizado no óleo (ICF2 – b e d). Razões mássicas de surfactante/óleo (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Velocidade de adição de (●) de 1,0 mL·min<sup>-1</sup> e de 3,0 mL·min<sup>-1</sup> (■). Fração volumétrica de água igual a 95.

A localização do surfactante tem se mostrado interferente para obtenção dos menores diâmetros para NE (JAHANZAD et al., 2009; KOMAIKO & MCCLEMENTS,

2016; OSTERTAG et al., 2012). Primeiramente, a formação de nanogotas por inversão catastrófica de fase, segundo SAJJADI (2006), ocorre devido a taxa de coalescência das gotas da fase aquosa (formada pela adição da mesma na fase oleosa) tornar-se superior a taxa de formação das gotas de óleo. Isso resulta em um aumento da fase aquosa da emulsão água/óleo, o que promove o transporte de moléculas do surfactante presentes nas imediações da interface OE/água, promovendo assim, a formação das nanogotas. Somado a isso, a adição da fase aquosa na mistura de surfactante/OE resulta na formação de uma fase intermediária de emulsão múltipla (água/óleo/água), a qual é precursora das NE a serem obtidas.

OSTERTAG et al. (2012) variaram a localização do surfactante (de 100% em água até 100% em óleo) e obtiveram os menores diâmetros para NE em que o surfactante foi adicionado na fase oleosa. Como mecanismo da formação das NE, surfactantes hidrossolúveis, como é o caso do T80, quando localizados na fase oleosa permitem a formação de microemulsões bicontínuas e emulsões múltiplas, as quais, com o aumento da fase aquosa, tendem a quebrar em nanogotas consideravelmente menores. Dessa forma, os autores sugerem que o método ICF 2 seja mais efetivo para obtenção de NE. KOMAIKO & MCCLEMENTS (2014) estudaram diversos protocolos de preparação de NE por emulsificação de baixa energia, e apenas os protocolos em que o surfactante foi adicionado à fase do óleo resultaram em diâmetros sub-micrométricos.

Essa compreensão pode ser utilizadas para o entendimento da obtenção de NE/alho, contudo para NE/alecrim, cuja diferença da localização do surfactante não interferiu no diâmetro médio, não se aplica.

Neste caso, outros mecanismos suportam os resultados aqui obtidos para obtenção de NE por ICF 1 que foi efetiva para NE/alecrim. BOUCHAMA et al. (2003) obtiveram NE de óleo de parafina e surfactante não-iônico (Triton X-100 - éter 4-terc-octilfenílico de polietilenoglicol) por dois métodos diferentes de ICF: (1) mistura direta das fases oleosa/aquosa e (2) adição controlada da fase aquosa na fase oleosa. Para todos os casos, o surfactante foi adicionado na fase aquosa. O segundo método assemelha-se ao método ICF1 proposto aqui, corroborando os resultados obtidos para NE/alecrim e NE/alho. O mecanismo nesse caso de formação das NE por ICF se assemelha ao de emulsificação espontânea, a adição do óleo na fase aquosa (água/surfactante) produz camadas bicontínuas na fronteira entre as duas fases imiscíveis. Com o aumento da fase

aquosa, há um desprendimento dessa camada bicontínua de OE/surfactante para a fase aquosa, e posterior formação das nanogotas. Pelo exposto, sugere-se que o método ICF1 tenha se comportado, não como uma inversão catastrófica de fase, mas sim como uma emulsificação espontânea, devido à localização do surfactante não permitir a formação das emulsões múltiplas, precursoras das NE.

O tamanho médio das NE (FIGURA 4.5 e FIGURA 4.6) não permite uma compreensão específica dos diâmetros das NE, pois o valor pode indicar partículas com diâmetro médio de 100 nm, mas não identifica a existência de diferentes populações de partículas com 10 e 90 nm, ou partículas com 60 e 40 nm, por exemplo. Para isso, a distribuição dos diâmetros, a partir de sua intensidade de luz espalhada, foi organizada de forma a compreender a homogeneidade das NE, segundo cada método utilizado. As distribuições de diâmetro médio para as NE/alecrim e NE/alho estão dispostas, respectivamente, nas FIGURA 4.9 e FIGURA 4.10. Todas as distribuições de diâmetro médio por intensidade de espalhamento de luz foram normalizadas quanto ao seu valor máximo de intensidade espalhada de forma a permitir a comparação entre a distribuição de seus diâmetros, tendo em vista que partículas maiores e menores espalham luz de maneira diferente.

Distribuições de diâmetro (NE/alecrim – FIGURA 4.7) demonstram que, em todos os casos, obtiveram-se diâmetros na região de 100 nm ou menores, sendo que em alguns a dispersão foi polimodal, ou seja, distribuição heterogênea de diâmetros de nanogotas. Dispersões monomodais foram obtidas apenas para valores de RSO 0,5 e RSO 1,0 (FIGURA 4.7a), ambos obtidas por ICF 2 (surfactante adicionado ao OE). O aumento da quantidade de surfactante (aumento dos valores de RSO) resulta no surgimento de picos na região de 10nm, o qual relaciona-se ao excedente de surfactante que se auto-organiza em micelas cujo diâmetro é próximo de 10nm (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015).

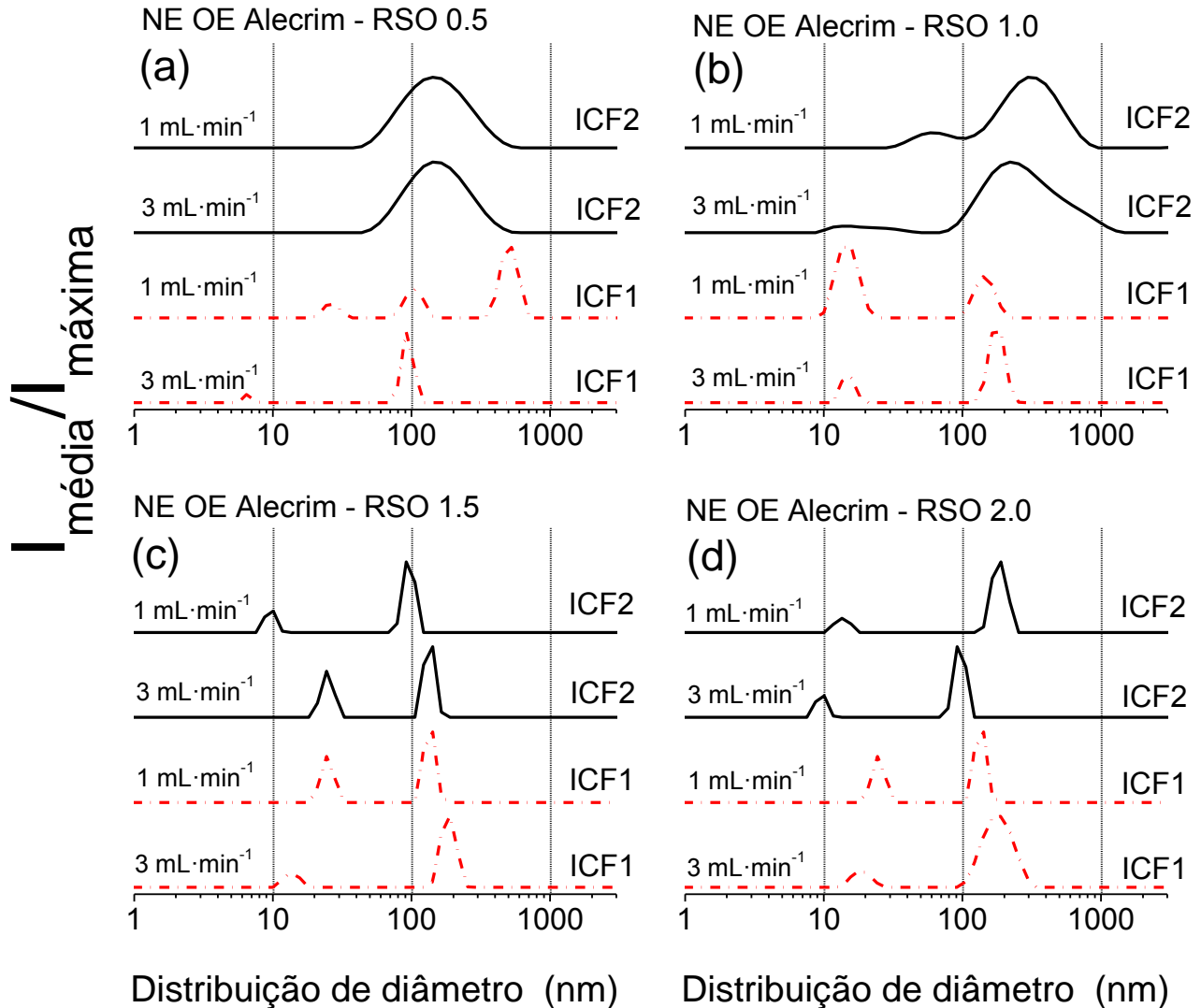


FIGURA 4. 7: Distribuição do diâmetro em NE/alecrim para valores de razão mássica surfactante/OE: (a) RSO 0,5; (b) RSO 1,0; (c) RSO 1,5; (d) RSO 2,0. Surfactante solubilizado em água (ICF 1 – traço/ponto/vermelho); Surfactante adicionado ao óleo (ICF 2 – traço contínuo). A fase aquosa foi adicionada à fase lipofílica na razão de 1 e 3 mL·min<sup>-1</sup>. Fração volumétrica de água igual a 95.

Contrastando com as NE/alecrim, as NE/alho apresentaram distribuição de diâmetros polidispersas, e com diâmetros entre 100 e 1000 nm, exceto para RSO 2,0 e velocidade de adição de 1,0 mL·min<sup>-1</sup> (Figura 4.8d). Diferentemente das NE/alecrim, as NE/alho não apresentam picos na região de 10 nm quando a quantidade de surfactante aumenta, principalmente para o método de ICF 2, o que sugere que de alguma forma toda a quantidade de surfactante foi utilizada na emulsificação. A maior distribuição de

diâmetros para as NE/alho, mesmo para altas concentrações de surfactante (RSO 2,0) podem indicar que para o sistema água/ T80/OE alho a quantidade de surfactante não foi suficiente para evitar a coalescência de gotas de óleo formadas durante a emulsificação (visível pela formação de sedimentos – FIGURA 4.4). A diminuição do diâmetro das gotas aumenta a área superficial destas, demandando uma quantidade maior de surfactante, o que para esse caso não foi suficiente. Além disso, apenas para razões específicas de água/óleo/surfactante a emulsificação espontânea (ou formação das emulsões múltiplas, precursoras das nanogotas) torna-se possível (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2015). No caso da NE/alho, estudos posteriores com concentrações de surfactante maiores podem ser feitos no intuito de identificar otimizar a obtenção de NE por ICF.

A concentração de surfactante interferiu no diâmetro médio das NE/alecrim apenas para as obtidas pela inversão catastrófica de fase em que o surfactante esteve inicialmente dissolvido na fase lipofílica (ICF 2). LI et al. (2013) obtiveram resultados similares para NE de diferentes óleos (D-limoneno, oliva, milho, girassol e soja) e T80. Dos três valores de RSO estudados (1:2, 1:1 e 3:2) a maior quantidade de surfactante (RSO 3:2) diminuiu de forma considerável o diâmetro médio das NE, produzindo distribuições de diâmetros estreitas, o que indica maior homogeneidade. Aqui, o aumento nos valores de RSO, primeiramente para ICF 2, resultou em um deslocamento dos picos, e encurtamento, da região entre 100 e 1000 nm (FIGURA 4.7a – RSO 0,5) para a região entre 10 e 100nm, demonstrando que o aumento da quantidade de surfactante pode promover a formação de diâmetros menores e homogêneos para as NE/alecrim. Resultados similares foram obtidos por FERNANDEZ et al. (2004) e MAYER et al. (2013). Nesse último, NE foram obtidas por ICF 2 e com diferentes valores de RSO (de 0,5 até 2,0). Quantidades maiores de surfactantes reduziram o tamanho médio das NE. Os autores relacionam isso à necessidade de ter-se surfactante suficiente para recobrir todas as nano-gotas formadas, evitando a coalescência destas, e ainda à necessidade de haver uma quantidade suficiente de surfactante para que haja a formação de emulsões múltiplas, precursoras das nano-gotas formadas (OSTERTAG et al., 2012).

A velocidade de adição da fase aquosa no OE apresentou diferenças na distribuição dos diâmetros das NE/alecrim e NE/alho. NE/alecrim com menores concentrações de surfactante (RSO 0,5 e 1,0) mostraram diferenças quando a taxa de

adição aumentou de 1,0 para 3,0 mL·min<sup>-1</sup>. Diferença essa, não foi observada para maiores valores de RSO. Com RSO igual a 0,5, o aumento da velocidade permitiu a obtenção de NE com dispersão monomodal. Com o aumento do valor de RSO para 1,0, os menores diâmetros foram obtidos para velocidade de 1,0 mL·min<sup>-1</sup>. Isso sugere que para concentrações baixas de surfactante, a taxa em que a fase aquosa mistura-se com do óleo pode interferir na obtenção de NE mais homogêneas.

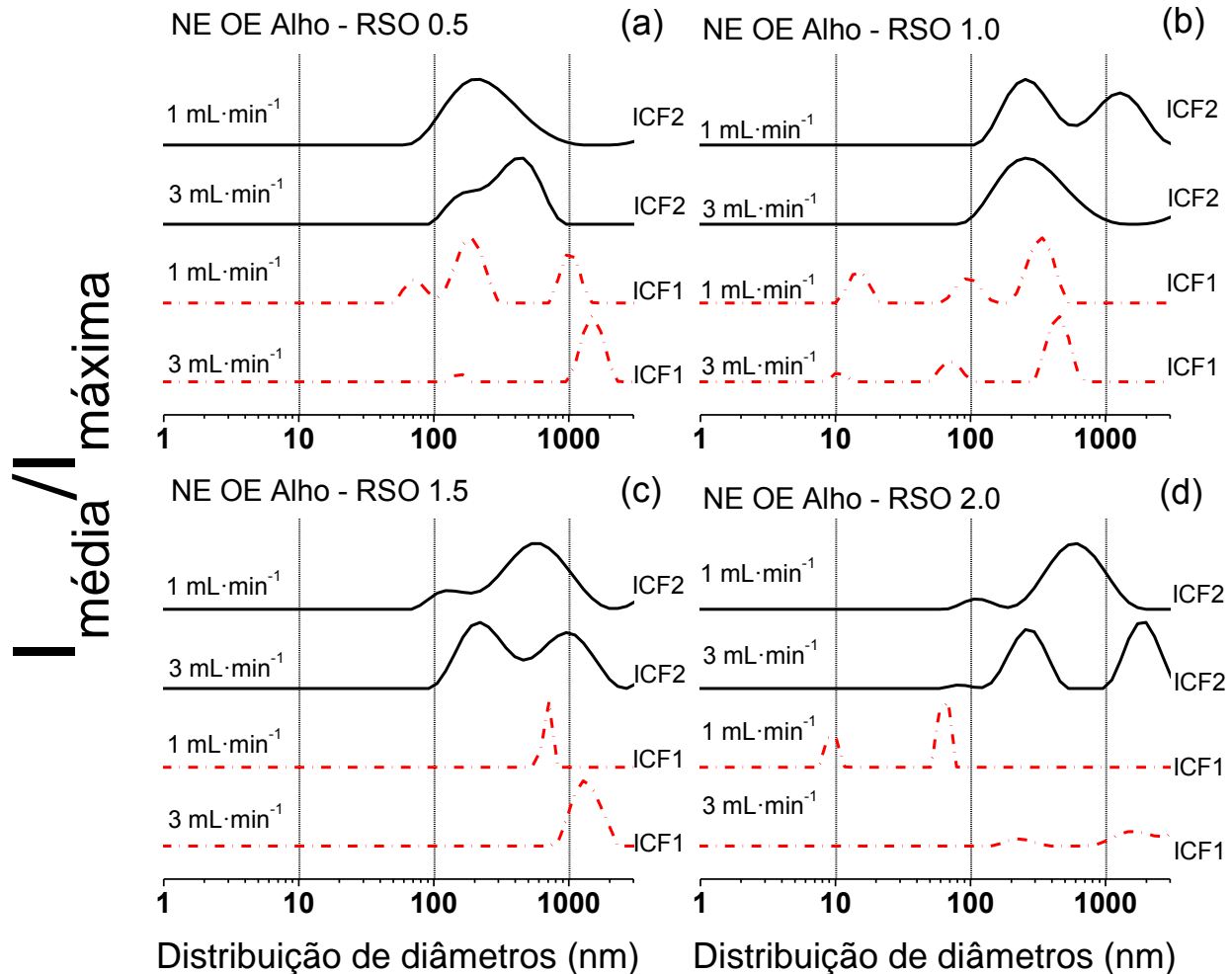


FIGURA 4. 8: Distribuição do diâmetro em NE/Alho para diferentes razões mássicas de surfactante/OE: (a) RSO 0,5; (b) RSO 1,0; (c) RSO 1,5; (d) RSO 2,0. Surfactante solubilizado em água (ICF 1 – traço/ponto); surfactante adicionado ao óleo (ICF 2 – traço contínuo). A fase aquosa foi adicionada à fase lipofílica na razão de 1 e 3 mL·min<sup>-1</sup>. Fração volumétrica de água igual a 95



Quando comparados os dois protocolos de ICF, o segundo método, cujo surfactante inicia-se na fase oleosa não foram observadas diferenças para menores valores de RSO nas NE/alho. Para NE/alecrim e RSO 1,0, 1,5 e 2,0 um deslocamento das dispersões para tamanhos menores quando a velocidade de adição diminui, bem como um aumento na intensidade de partículas com diâmetros menores. No caso das NE/Alho, apenas com RSO 2,0 e ICF 1 nota-se diferença na distribuição dos tamanhos das NE. Em trabalhos anteriores não foi reportada interferência da velocidade de adição nos diâmetros ou estabilidade das NE. KOMAIKO & MCCLEMENTS (2014) avaliaram o diâmetro médio das NE hexadecano/T80 para tempos de  $10^{-1}$  até  $10^2$  min de adição total da fase aquosa, sugerindo não haver diferença entre as taxas para obtenção de diâmetros menores.

#### ***4.3.2.2 - Diâmetro médio e distribuição de tamanho das NE de OE obtidas por microfluidização***

As fotografias digitais das NE, bem como das emulsões grosseiras foram organizadas FIGURA 4.9. O diâmetro médio das NE/Alecrim e NE/Alho obtidas por emulsificação de alta energia, microfluidização (MF) em altas pressões, estão apresentadas, respectivamente, na FIGURA 4.10 e FIGURA 4.11.

A microfluidização por altas pressões é um método mais efetivo para obtenção de NE para diferentes composições (quantidade e tipos de OE, e surfactantes), bem como parâmetro de processo (número de ciclos e pressão) (GALOOYAK & DABIR, 2015; GARCÍA-MÁRQUEZ et al., 2017; JAFARI et al., 2006; MAYER et al., 2013; OSTERTAG et al., 2012; RAO & MCCLEMENTS, 2011). No caso das NE obtidas aqui, constata-se que à pressão de 20000 psi (138 MPa) e variado número de ciclos (de 1 até 10) foram suficientes para promover a rupturas das gotas de OE suspensas na fase contínua (emulsão grosseira) em gotículas nanométricas tanto para OE de alecrim quanto para OE de alho. No comparativo com a emulsificação de baixa energia, a MF foi, como esperado, um método mais efetivo para obtenção de emulsões do que o ICF, cujo tamanho médio das nano-gotas está abaixo dos 200 nm.

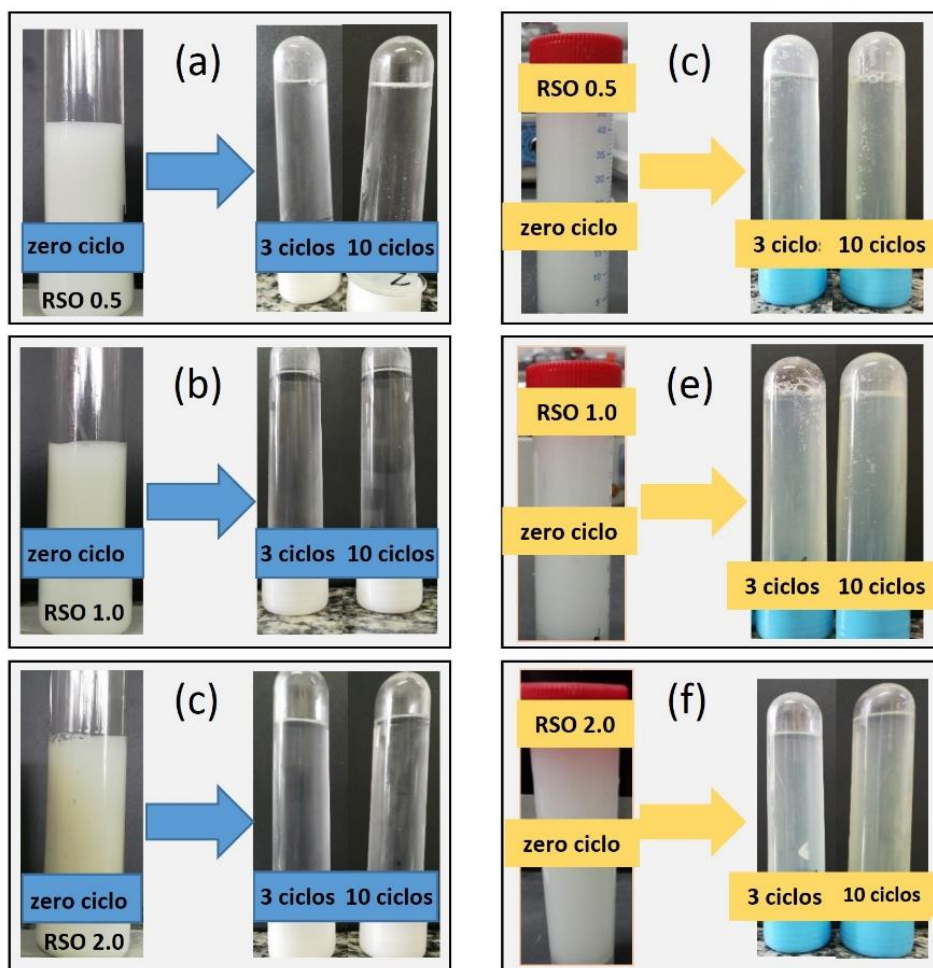


FIGURA 4. 9: Nanoemulsões: OE de alecrim (a,b,c) e OE alho (d, e, f). NE obtidas por 0,3 e 10 ciclos de microfluidização em altas pressões e diferentes razões mássicas surfactante/OE (RSO): (a,d) 0,5; (b,e) 1,0; (c,f) 2,0. Fração volumétrica de água igual a 95

Diferentemente do processo de emulsificação por baixa energia, neste caso iniciou-se a obtenção das NE a partir de emulsões grosseiras, ou seja, de suspensões coloidais com diâmetros de gotas na escala micrométrica, as quais estão indicadas como sendo as com ciclo de microfluidização igual a zero nas FIGURA 4.10 (NE/alecrim) e FIGURA 4.11 (NE/alho).

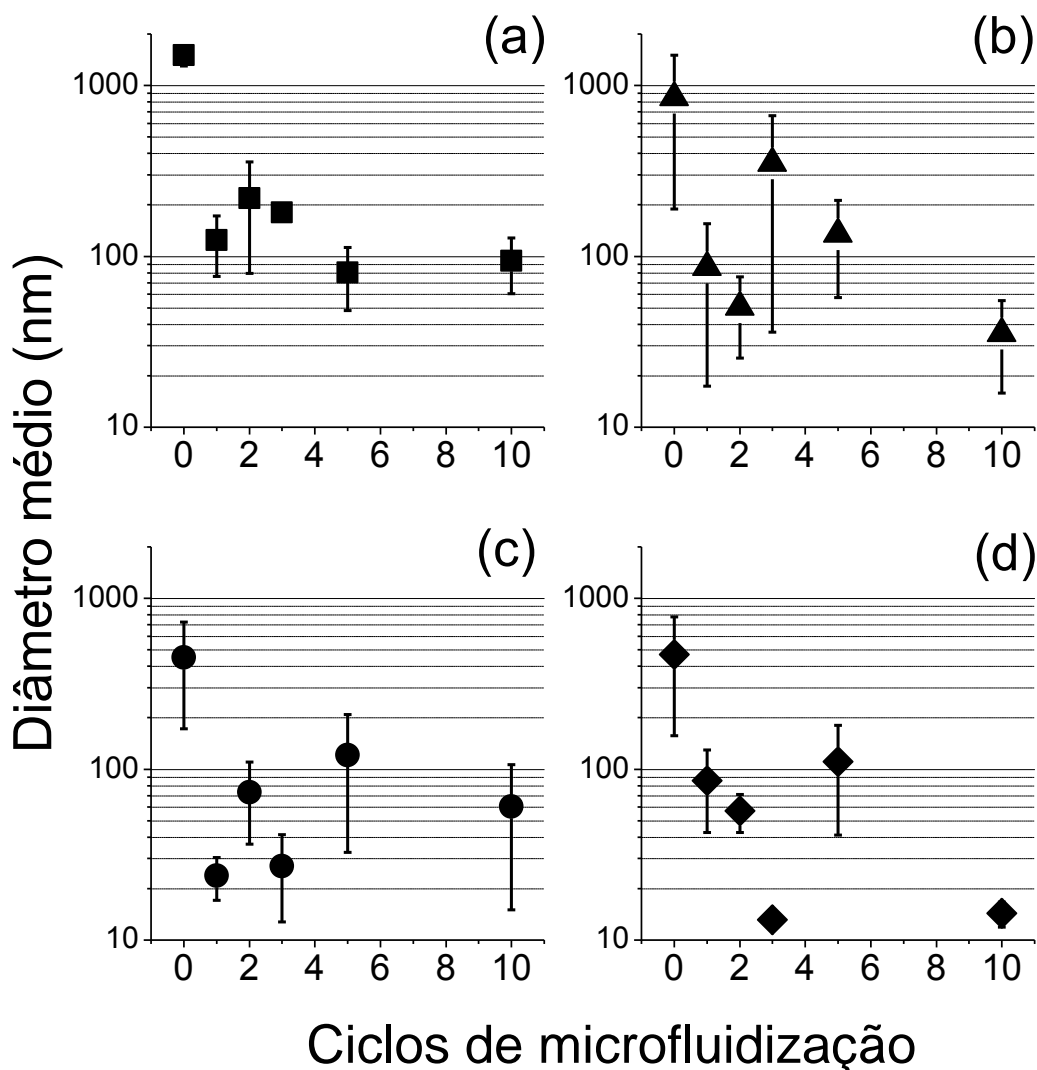


FIGURA 4. 10: Diâmetro médio de nanoemulsões de óleo essencial de alecrim obtidas por microfluidização em altas pressões para diferentes ciclos (0,1, 2, 3, 5 e 10) e diferentes razões mássicas de surfactante e óleo essencial de alecrim (RSO): (■) RSO 0,5; (▲) 1,0; (●) 1,5 (◆). Fração volumétrica de água igual a 95

Tanto para NE/Alecrim quanto para NE/Alho, com a passagem das emulsões grosseiras por um ciclo de MF (esquema FIGURA 2.2), houve um decréscimo considerável no diâmetro médio, partindo de partículas micrométricas para estruturas com diâmetro próximos à 100 nm. Com o aumento no número de ciclos até o valor de 10, o diâmetro médio para as NE/alecrim alcançou valores próximos aos 10 nm (FIGURA 4.12d), e das NE/alho esses valores foram próximos aos 50 nm (FIGURA 4.11c). O número de ciclos já foi reportado como uma forma efetiva de obter NE. SALVIA-

TRUJILLO et al. (2015) produziram NE de diferentes óleos essenciais (erva-cidreira, cravo, tomilho, gerânio, hortelã, entre outros) e para alguns desses, o decréscimo do diâmetro foi observado já a partir do primeiro ciclo de MF. Os autores ainda observaram que esse decréscimo depende do tipo do OE e de suas características com o polaridade e solubilidade à água. No caso das emulsões produzidas neste trabalho, ambos OE permitiram o decréscimo no diâmetro médio apenas com a passagem da emulsão grosseira por um ciclo de microfluidização.

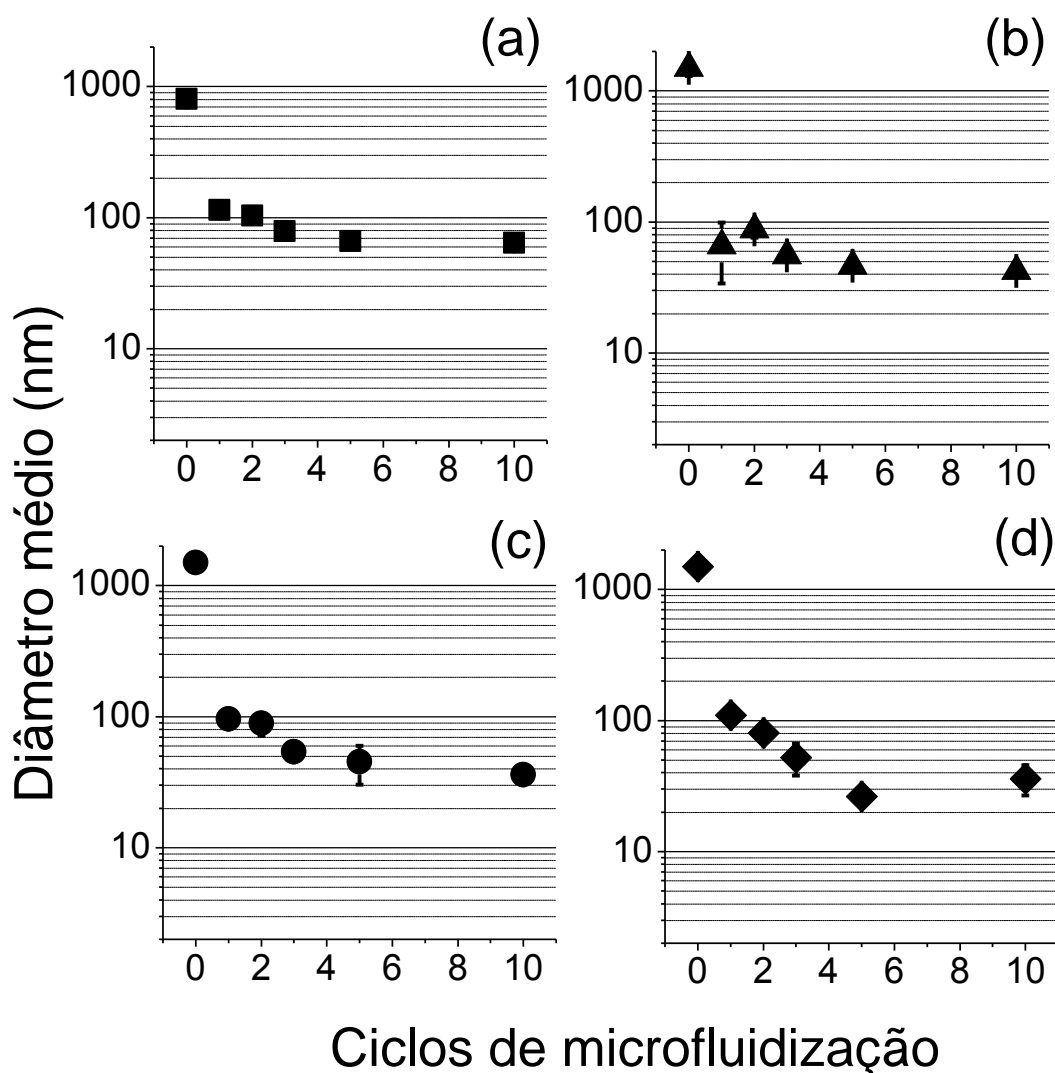


FIGURA 4. 11: Diâmetro médio de nanoemulsões de óleo essencial de alho obtidas por microfluidização em altas pressões para diferentes ciclos (0, 1, 2, 3, 5 e 10) e diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): (■) RSO 0,5; (▲) RSO 1,0; (●) RSO 1,5; (◆) RSO 2,0. Fração volumétrica de água igual a 95

O número de ciclos de passagem no microfluidizador mostrou-se determinante para obter menores diâmetros de gotas. O decréscimo no diâmetro médio à medida que o número de ciclos aumenta foi, em alguns casos, exponencial, o qual mostrou-se mais evidente para as NE/Alho (FIGURA 4.11). NE/alecrim (FIGURA 4.10) apresentaram os menores valores de diâmetro médio para: RSO 2,0/3 ciclos (FIGURA 4.10d) e RSO 2,0/10 ciclos (FIGURA 4.10d). Já para NE/alho obtidas por MF, os menores valores foram: RSO 1,5/10 ciclos (FIGURA 4.11c) e RSO 2,0/10 ciclos (FIGURA 4.11d); o que indica que maiores quantidades de surfactante podem resultar em NE com diâmetros médios menores. GALOYAK & DABIR (2015) produziram NE de óleo de girassol estabilizadas com Tween 20 por diferentes números de ciclos: 1, 2, 3, 4, e 5. Segundo os autores, a recirculação da emulsão pela câmara de interação permite expor, de forma homogênea, todas as partículas à mesma taxa de cisalhamento, e conseqüentemente, às mesmas forças de ruptura, resultando em diâmetros menores e dispersões de tamanho homogêneas.

Para BAI & MCCLEMENTS (2016) a energia de ruptura das gotículas durante os ciclos só é o mecanismo dominante para altas concentrações de surfactante. Para concentrações baixas de surfactante, o mesmo deve ser considerado como atuante (em suas características de solubilidade na fase dispersa) sobre o diâmetro médio das NE. Aqui a quantidade de surfactante foi estudada pela variação nos valores de RSO. Nas NE/alecrim, o aumento nos valores de RSO, ou seja, o aumento da quantidade de surfactante em comparação com a quantidade de OE, reduziu de forma expressiva os diâmetros médios ao final de 10 ciclos de  $94 \pm 33$  nm para  $14 \pm 2$  nm quando o valor de RSO aumentou de 0,5 para 2,0. A diminuição se sucedeu para as NE/alho, reduzindo o diâmetro de gota de  $64 \pm 1$  nm para  $36 \pm 9$  nm, respectivamente relacionados aos valores de 0,5 e 2,0 de RSO. Esta observação sugere que, independentemente do tipo de OE (alecrim ou alho), o surfactante pode facilitar a formação de nano-gotas para NE obtidas por MF. Diâmetros menores foram alcançados para valores de RSO igual a 1 em relação à NE com RSO igual à 0,1 (MAYER et al., 2013). Diversos trabalhos apresentam a diminuição do diâmetro das NE com número de ciclos superior à 1 e com diferentes valores de RSO (ARTIGA-ARTIGAS et al., 2017; RAO & MCCLEMENTS, 2012a; SALVIA-TRUJILLO et al., 2017).

NE foram aqui obtidas com um surfactante hidrofílico (balanço hidrofílico-lipofílico - HLB 15) e a concentração de surfactante inferiu menores diâmetros médios. De forma complementar, PÉREZ-CÓRDOBA et al. (2018) também sugerem que a adição de surfactantes lipossolúvel (HBL 4.1) à fase oleosa (no caso do estudo, OE alho e cinamaldeído) e o aumento no número de ciclos de 1 para 3, resulta em diâmetros médios na região dos 100 nm e dispersões monomodais.

Pelo fato do diâmetro médio das NE não descrever em totalidade a população de partículas com seus respectivos diâmetros (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015), faz-se necessária a avaliação das distribuições de tamanho médio das NE. O efeito do número de ciclos de microfluidização, bem como da quantidade de surfactantes também, fica evidente ao se examinarem as curvas de distribuição de diâmetro das NE/alecrim (FIGURA 4.12) e das NE/alho (FIGURA 4.13). O processo de MF produziu NE com distribuição de diâmetros médios na região entre 10 e 50 nm para todos os casos (FIGURA 4.12 e FIGURA 4.13), algo que não foi alcançado pelas NE obtidas por inversão catastrófica de fase (item 4.3.2.1). Nota-se que um ciclo já foi suficiente para produzir NE monomodais, com exceção de quando a quantidade de surfactante foi menor do que a de OE alecrim (RSO 0,5 – FIGURA 4.12a).

O aumento no número de ciclos resultou na diminuição e homogeneização dos diâmetros médios (FIGURA 4.12a). Os pequenos picos na região entre 100 e 1000nm (FIGURA 4.12a) podem estar relacionados com a agregação de gotículas de óleo formadas após a passagem na câmara de interação (FIGURA 2.2) e que não foram recobertas com surfactante. O aparecimento de picos na região de 100 nm pode estar relacionado com a coalescência de nanogotas, as quais não foram recobertas por surfactante e, portanto, não estabilizadas.

Para os valores de RSO igual ou superior à quantidade de OE ( $RSO \geq 1$ ), verificou-se que o número de ciclos tende a deslocar a dispersão de diâmetros para regiões mais próximas de 10 nm. Isso sugere que o excedente de surfactante tende a recobrir as gotículas de OE de alecrim formadas durante os novos ciclos de microfluidização que tendem a forçar o choque entre as gotículas formadas no ciclo anterior. Isso pode também resultar em possíveis aglomerados, uma vez que partículas podem colidir e, conseqüentemente, coalescer ou agregar, justificando a existência de pequenos picos de dispersão entre 100 e 1000nm.

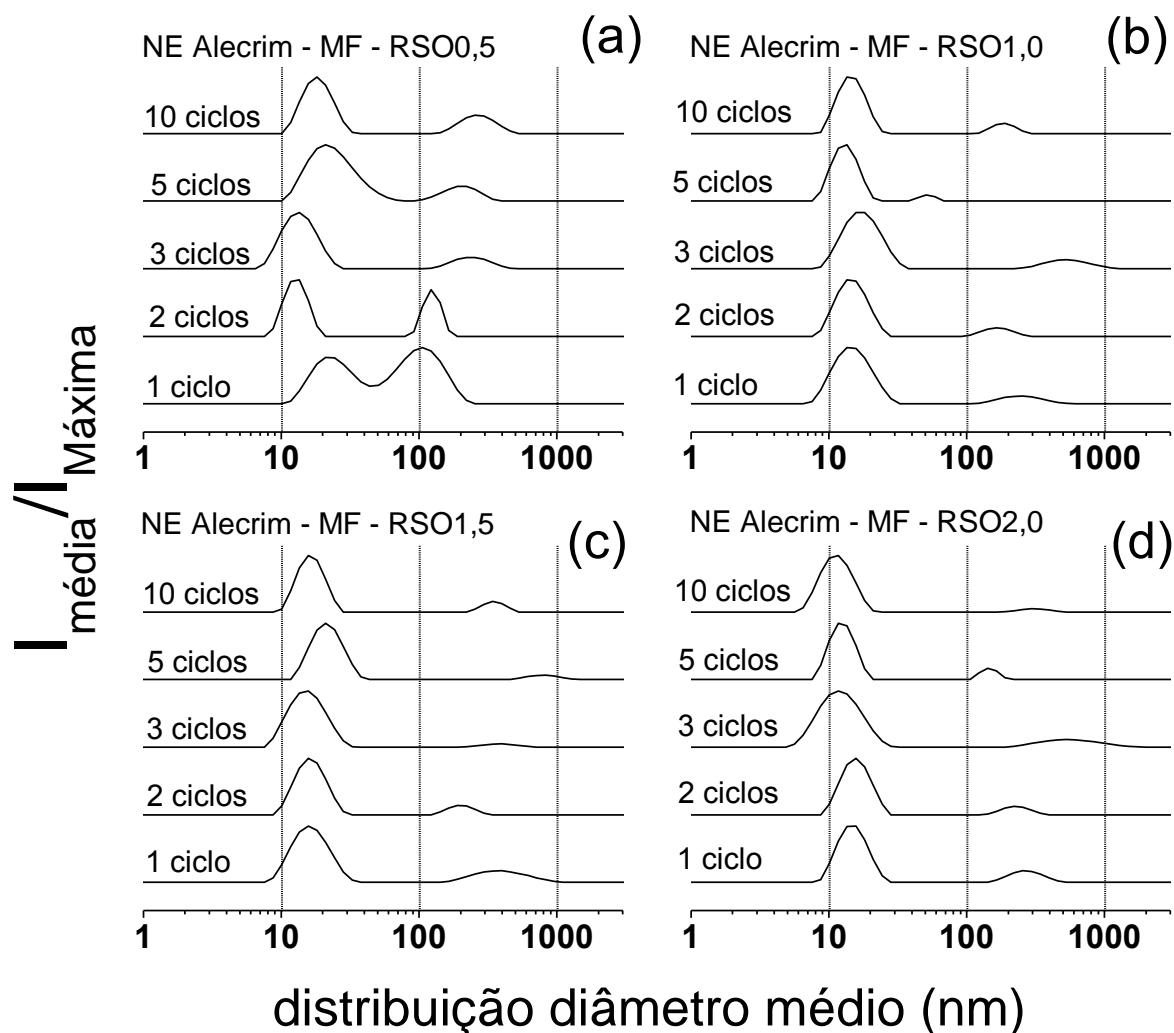


FIGURA 4.12: Distribuição do diâmetro em nanoemulsões de óleo essencial de alecrim para diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): (a) RSO 0,5; (b) RSO 1,0; (c) RSO 1,5; (d) RSO 2,0. Curvas deslocadas no eixo y e indicam diferentes ciclos de microfluidização (MF): 1, 2, 3, 5, 10. Fração volumétrica de água igual a 95

O efeito do número de ciclos e da quantidade de surfactante na distribuição dos diâmetros médios fica mais evidente para as NE/alho e valores de RSO iguais a 0,5 e 1,0. Em ambos os casos, o aumento no número de ciclos de 1 para 10 ciclos, deslocou as dispersões de diâmetro da região de 100 nm para a região de 10 nm, achatando a curva, o que indica uma maior homogeneidade das NE/alho para esses casos. Isso é visível a olho nu, tendo em vista que após 10 ciclos, as NE/Alho estão transparentes, o que sugere que os tamanhos das nano-gotas é inferior ao comprimento de onda da luz (fotografias digitais das NE/alecrim obtidas por MF – FIGURA 4.9). À medida que o valor

de RSO aumenta de 1,0 para 1,5, e posteriormente para 2,0, as curvas de distribuição dos tamanhos médios alargam-se, indicando uma população de gotículas com diâmetro variado. Todavia, até para esses casos, o aumento no número de ciclos resultou em distribuições monomodais. No comparativo entre as NE/alecrim e NE/alho obtidas por MF, verifica-se que as NE/alecrim obtiveram distribuições próximas da região de 10 nm e mais estreitas que as NE/alho, o que indica maior homogeneidade de diâmetros.

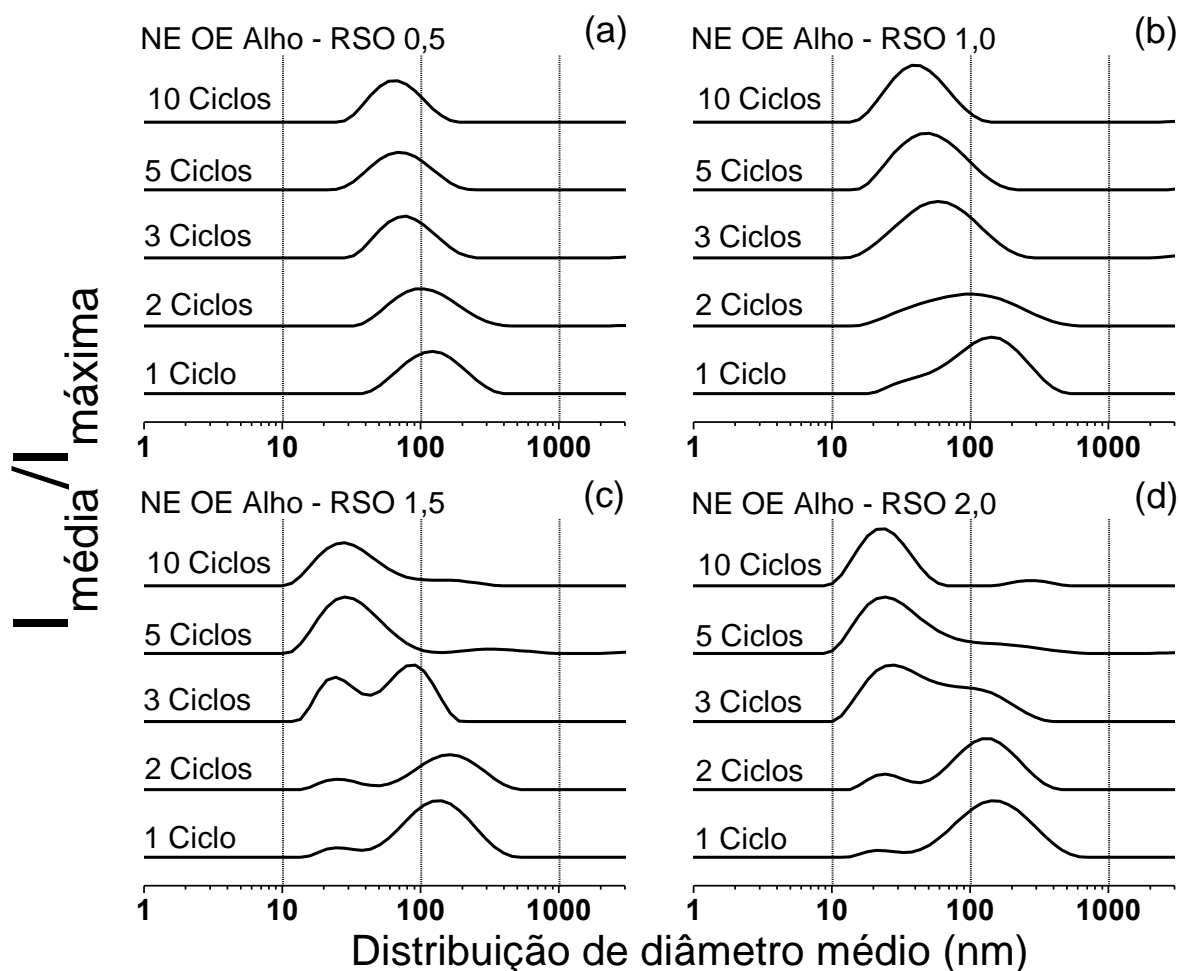


FIGURA 4. 13: Distribuição do diâmetro em nanoemulsões de óleo essencial de alho para diferentes razões mássicas de surfactante/OE (RSO): (a) RSO 0,5; (b) RSO 1,0; (c) RSO 1,5; (d) RSO 2,0. Curvas deslocadas no eixo y e indicam diferentes ciclos de microfluidização (MF): 1, 2, 3, 5, 10. Fração volumétrica de água igual a 95



#### **4.3.2.2 – Potencial zeta das NE obtidas por inversão catastrófica de fase e microfluidização**

O potencial zeta pode ser definido como o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento formado pela interação da carga superficial das partículas suspensas em solução e da interação entre os contra-íons presentes em solução (JOSHI et al., 2016). O potencial zeta é um bom indicador de estabilidade de sistemas coloidais, dentre eles, das nanoemulsões (HUA et al., 2019). Suspensões com potencial, em módulo, próximos ou superiores à 30 mV, tendem a possuírem maior estabilidade, tendo em vista que o módulo da carga é suficiente para promover a repulsão entre as partículas e, conseqüentemente evitar a floculação ou coalescência dessas, mecanismos de instabilidade presentes em sistemas coloidais (LI & CHIANG, 2012). O potencial zeta das NE/alecrim e das NE/alho obtidas por ICF pelos dois protocolos (1 e 2) está apresentada nas FIGURAS 4.14 e FIGURA 4.15, respectivamente.

O potencial zeta das NE/alecrim e NE/alho. NE/alecrim que apresentaram os maiores valores (em módulo), foram aquelas obtidas por ICF2 (FIGURA 4.14b e d), em que o surfactante esteve, primeiramente, solubilizado na fase lipofílica (OE). Contudo, para todas essas NE/alecrim o valor do módulo se mostrou muito abaixo de -30mV, variando de valores entre  $-5,9 \pm 0,2$  mV (RSO 1,0/ICF 2/3mL·min<sup>-1</sup>) e valores positivos como  $1,0 \pm 0,6$  mV (RSO 0,5/ICF 2/1mL·min<sup>-1</sup>). Isso sugere, que NE/alecrim obtidas por ICF tenham baixa estabilidade e sejam suscetíveis à mecanismos de estabilização como floculação e coalescência (MCCLEMENTS, 2007). Cabe aqui, destacar o resultado destoante, neste caso: NE/alecrim (RSO 1,5/ICF 1/3mL·min<sup>-1</sup>), cujo o potencial zeta apresentou valores de  $-22 \pm 1$  mV. Para NE/alho, os valores de potencial zeta não apresentaram, assim como as NE/alecrim, uma correlação entre os métodos de obtenção, bem como na composição (RSO). Verifica-se que o protocolo ICF 1 (em que o surfactante foi inicialmente solubilizado na fase aquosa), para as NE/alho, resultou em maiores valores do módulo do potencial zeta (FIGURA 4.15a e c). Sendo que o maior valor,  $-26 \pm 1$  mV, foi obtido para NE/alho obtidas pelo método ICF 1, RSO 0,5 e velocidade de adição de 1mL·min<sup>-1</sup>.

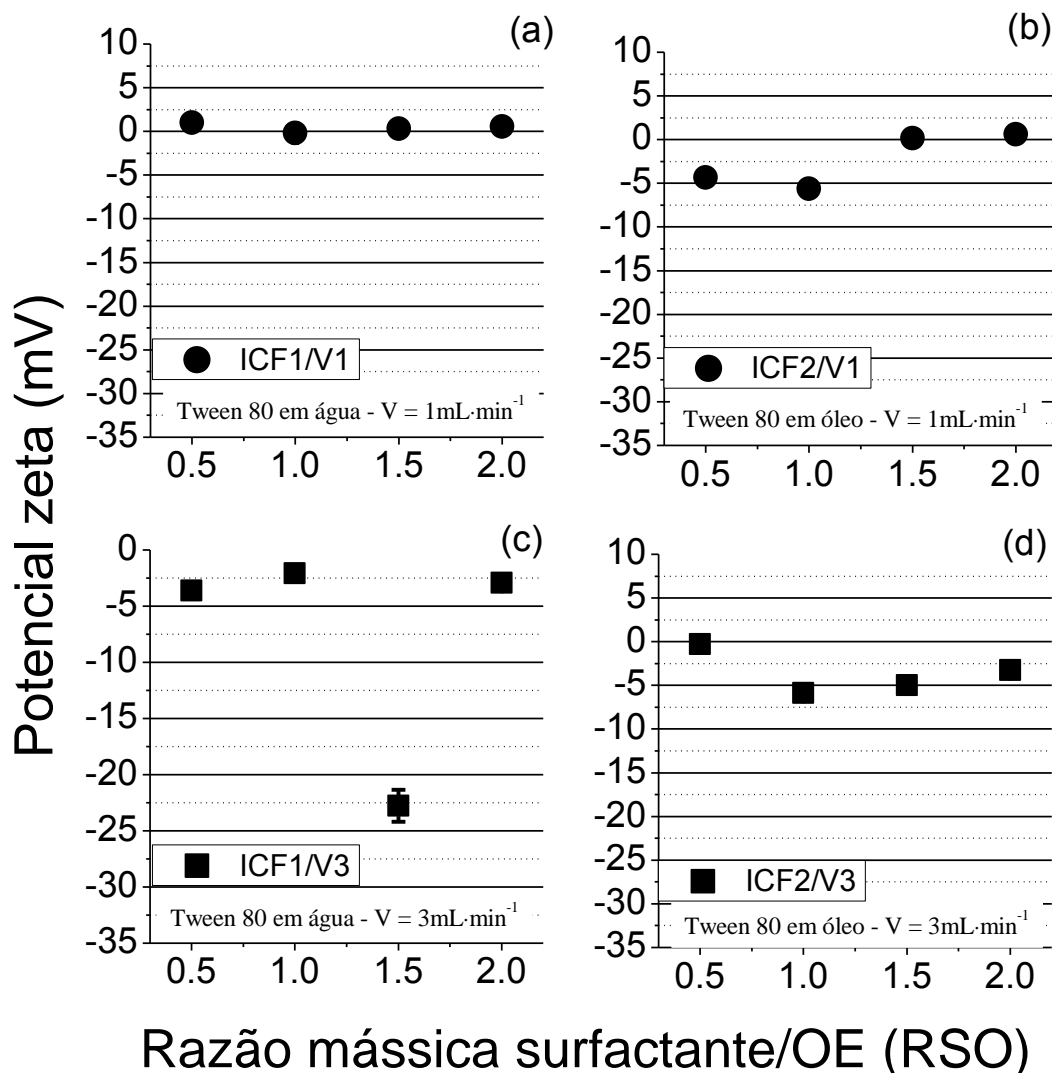


FIGURA 4. 14: Potencial zeta de nanoemulsões de óleo essencial de alecrim obtidas por inversão catastrófica de fase: surfactante solubilizado em água (ICF1 – a e c) e solubilizado no óleo (ICF2 – b e d). Razões mássicas de surfactante/óleo (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Velocidade de adição de (●) de 1,0 mL·min<sup>-1</sup> e (■) de 3,0 mL·min<sup>-1</sup>.

No caso de NE, as características (carga e módulo) do potencial de superfície das nanogotas pode ser controlado, determinando-se qual surfactante a ser aplicado para a estabilização desse sistema, bem com as característica do OE e valores de pH das suspensões. Para as NE aqui obtidas, o pH não foi alterado, estando este valores próximo ao da água pura: entre 6 e 7.

No que compete o sinal da carga do potencial zeta, surfactantes não-iônicos, como o T80, não deveriam apresentar carga de superfície (MCCLEMENTS,

2016), contudo o que se observa, tanto para as NE/alecrim, quanto para as NE/alho é uma carga superficial negativa.

De modo a identificar a natureza da carga negativa do potencial zeta, realizou-se medidas para soluções de água ultrapura e OE (alho ou alecrim) e também para o T80 quando solubilizado nas concentrações utilizadas. Os valores do potencial zeta dos OE de alecrim, alho e T80 foram, respectivamente:  $-17 \pm 3$ ,  $-10 \pm 6$  e  $-12 \pm 5$  mV. Tais valores, todos de natureza negativa corroboram o que foi obtido para as NE, sejam para o OE de alho ou para o OE de alecrim. Entretanto, estes valores não permitem diferenciar a fonte das cargas negativas. Um aumento na quantidade de surfactante, se este fosse o mandatório na carga, resultaria em um aumento nos módulo destas (de RSO 0,5 para 2,0), algo que não foi observado. O que sugere-se aqui, é que a carga seja proveniente de ambos componentes da gota: OE e surfactante; o que está em consonância com discutido por MCCLEMENTS (2016).

A literatura apresenta resultados similares para NE com T80 como estabilizante. ARTIGA-ARTIGAS et al. (2017) NE de óleo de milho e T80 apresentaram valores de potencial zeta de entre  $-16 \pm 2$  até  $-39 \pm 3$  mV com a adição de alginato de sódio às NE. MCCLEMENTS & RAO (2011) sugerem que o valor negativo pode estar relacionado à presença de ácidos graxos livres (presentes nos OE) ou ainda impurezas remanescente do processo de obtenção do surfactante. QIAN et al. (2012) inferem que ânions pequenos (como  $\text{OH}^-$ ) em água, podem preferencialmente ser absorvidos pela interface óleo/água, e com isso contribuírem para a carga de natureza negativa das NE.

Como já discutido, tanto NE/alecrim quanto NE/alho apresentaram carga negativa para o potencial Zeta. Isso também foi observado para as NE produzidas por microfluidização à altas pressões. As FIGURAS 4.16 e FIGURAS 4.17 apresentam, respectivamente o potencial zeta das NE/alecrim e NE/alho.

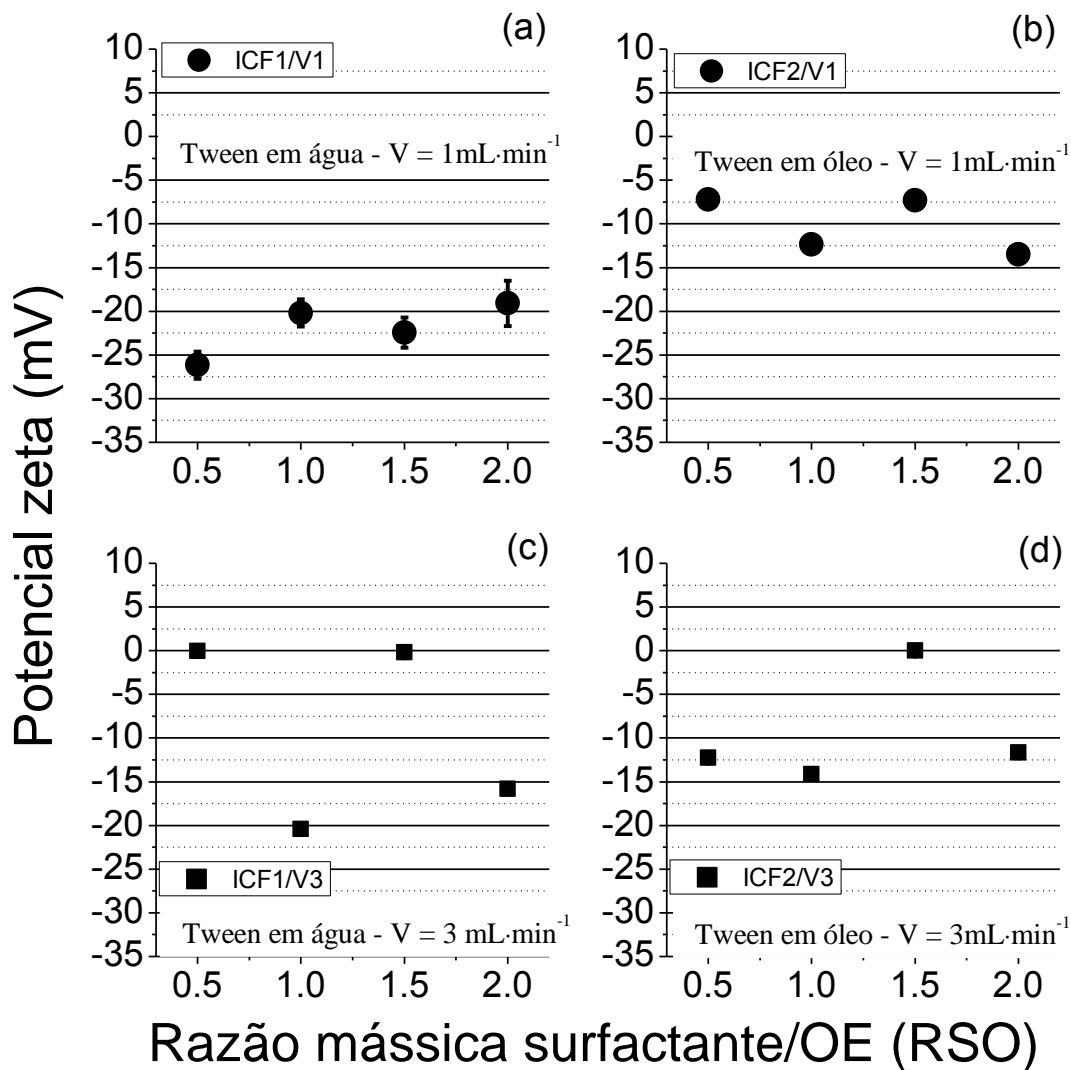


FIGURA 4. 15: Potencial zeta de nanoemulsões de óleo essencial de alho obtidas por inversão catastrófica de fase: surfactante solubilizado em água (ICF 1) e solubilizado no óleo (ICF 2). Razões mássicas de surfactante/óleo (RSO): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0. Velocidade de adição de (●) de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e de  $3,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (■).

Na FIGURA 4.16, verifica-se que o processo de MF gerou nanogotas com potencial de superfície superior ao processo de ICF para obter NE/alecrim, indicando NE com maior estabilidade (HUA et al., 2019). Os maiores valores, em módulo, foram obtidos para as NE com composição de RSO igual a 0,5, com maior valor para 3 ciclos:  $-24 \pm 12 \text{ mV}$ .

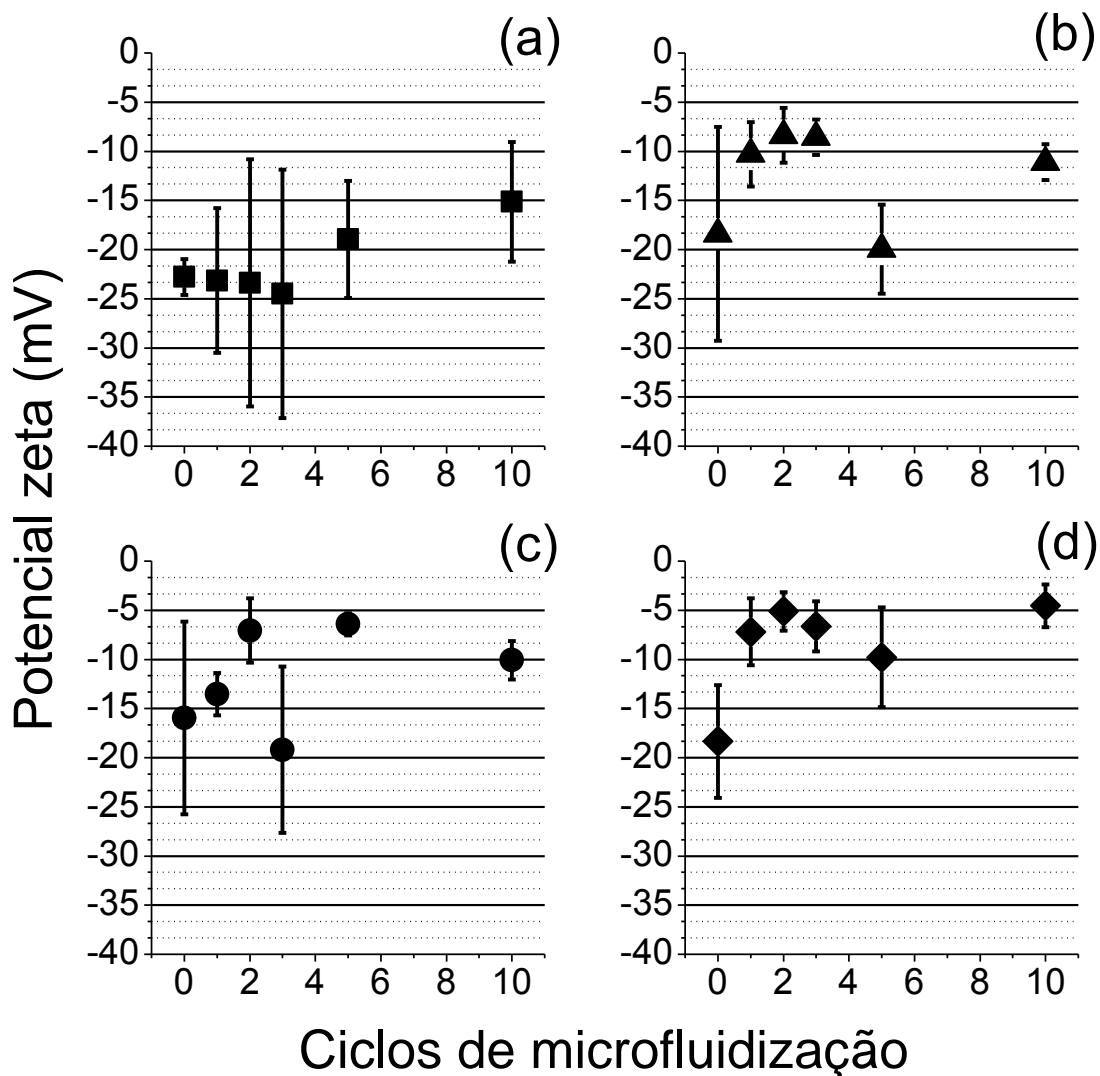


FIGURA 4. 16: Potencial zeta de nanoemulsões de óleo essencial alecrim obtidas por microfluidização em altas pressões para diferentes ciclos (0, 1, 2, 3, 5 e 10) e diferentes razões mássicas surfactante/OE: (■) RSO 0,5; (▲) RSO 1,0; (●) RSO 1,5; (◆) RSO 2,0.

. A composição de RSO 0,5, ou seja, de uma quantidade menor de surfactante em relação à quantidade de OE de alecrim apresentou valores com desvios que chegam à mais de 30% do valor. Isso pode indicar uma dispersão heterogênea do potencial das NE (constatado para as distribuições de diâmetro médio discutidas no item 4.3.2.1). Isso não se repete para as outras composições RSO 1,0, 1,5, e 2,0, o que pode indicar que para quantidade superiores de OE, o potencial possa estar sendo influenciado pela característica do OE (ácidos graxos, por exemplo) presentes em sua composição.

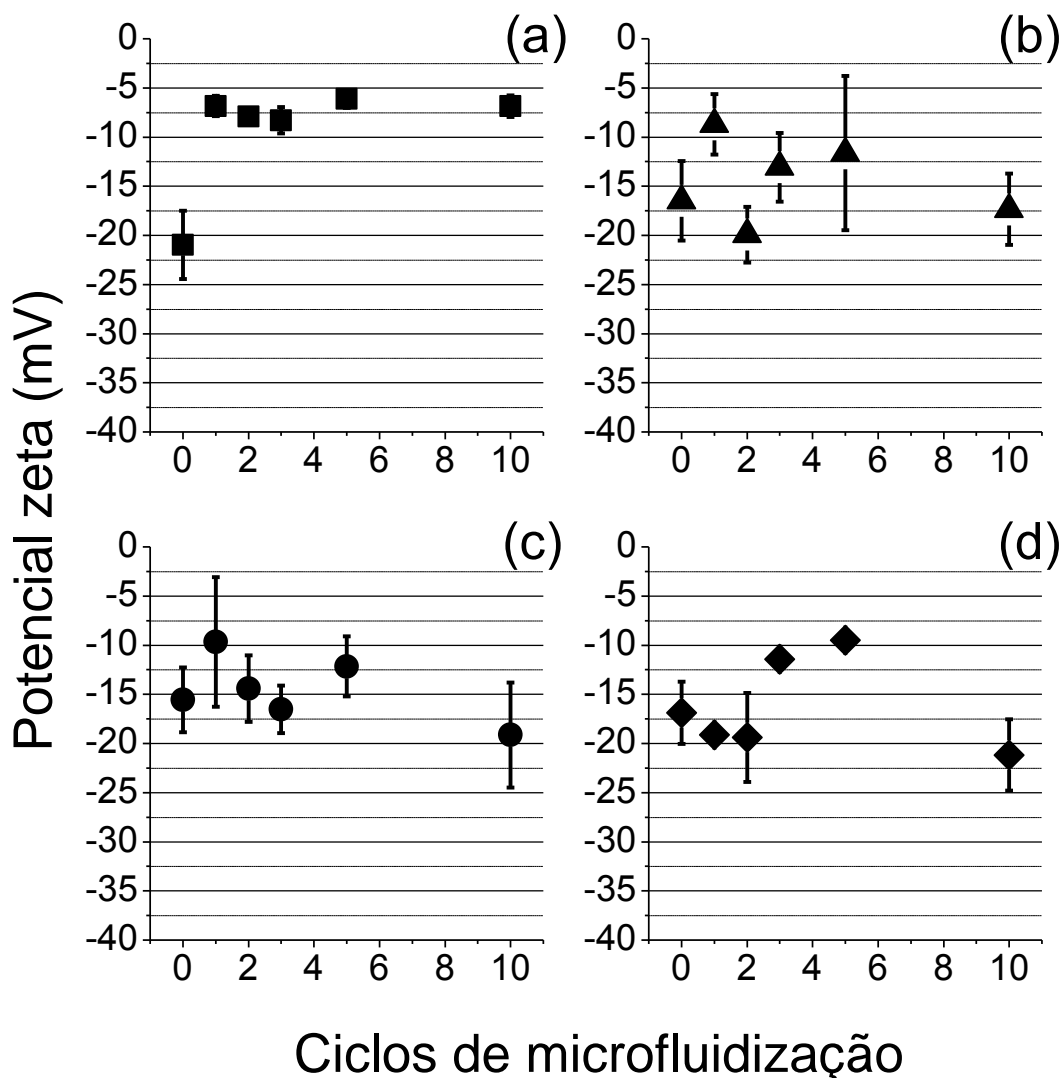


FIGURA 4. 17: potencial zeta de nanoemulsões de óleo essencial alho obtidas por microfluidização em altas pressões para diferentes ciclos (0, 1, 2, 3, 5 e 10) e diferentes razões mássicas surfactante/OE: (■) RSO 0,5; (▲) RSO 1,0; (●) RSO 1,5; (◆) RSO 2,0

O número de ciclos não interferiu no valor do módulo do potencial. Tais resultados contrastam com os de ARTIGA-ARTIGAS et al. (2017), cuja passagem por cinco ciclos de emulsões grosseiras no microfluidizador diminuíram o valor do módulo das NE de milho/Tween80. O mesmo foi encontrado para GARCÍA-MÁRQUEZ et al. (2017) em que cinco ciclos diminuiu o valor de  $-15 \pm 2$  para  $-30 \pm 2$  mV. Contudo, até o presente momento a literatura não apresenta relação entre número de ciclos e aumento na carga superficial. Estudos posteriores, acerca da relação área superficial/carga/ciclos podem elucidar essa dependência.

A quantidade de surfactante (RSO) indicou diferença no módulo do potencial para as NE/alecrim. Para RSO 0,5 o valor foi de  $-15 \pm 6$  mV, enquanto para RSO 2,0, o valor diminuiu para  $-4 \pm 2$  mV. O aumento na quantidade de surfactante tende a dificultar a difusão e o movimento Browniano de partículas. Dessa forma, diminuindo a mobilidade, o que resultaria em valores menores como os obtidos aqui.

As NE/alho obtidas por MF em altas pressões não apresentaram relação entre o número de ciclos e o valor do módulo (FIGURA 4.17). Isso fica evidente para a composição de RSO 0,5 (FIGURA 4.17a) em que o potencial zeta se mostrou superior para a emulsão grosseira, do que para as NE produzidas posteriormente aos ciclos de MF. Com o aumento no valor de RSO, o que se observou foram valores próximos e entre -10 e -20 mV. Valores estes compatíveis, e em alguns casos superiores, aos das NE obtidas por ICF2 (FIGURA 4.15). A natureza da carga, como já discutido para as NE/alecrim, manteve-se consonante aos valores tanto para as NE obtidas por ICF, e com os obtidos para o OE e surfactante ( $-10 \pm 6$  e  $-12 \pm 5$  mV, respectivamente).

### 4.3.3 - Estabilidade das Nanoemulsões

NE são sistemas coloidais formados por duas fases imiscíveis, neste caso óleo disperso em água, as quais podem ser estabilizadas por emulsificantes, como surfactante, que diminuem a tensão interfacial entre as fases (DONSÌ & FERRARI, 2016). NE são definidas com cineticamente estáveis ou metaestáveis (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2016; MCCLEMENTS, 2007), ou seja, suscetíveis à separação de fase, dada a instabilidade termodinâmica. Dessa forma, faz-se necessário compreender a estabilidade das NE, o tempo de estabilidade, bem como os mecanismos que a regem.

Avaliou-se a estabilidade das NE/ produzidas para dois diferentes OE: alho e alecrim; por alta (MF) e baixa (ICF) energia, sendo que no primeiro investigou-se o número de ciclos, enquanto no segundo, a localização do surfactante. Por fim, avaliou-se o efeito da concentração de surfactantes (RSO). A partir das análises, foram gerados três diferentes resultados: os valores de índice de instabilidade (II - valor de 0 à 1), sendo a NE mais instável quanto mais próximo da unidade (TABELA 4.5); curvas de

instabilidade e tempo (FIGURA 4.18 e 4.19); curvas de transmissão de radiação do infravermelho/tempo/posição (APÊNDICE A).

A TABELA 4.5 apresenta os II para de NE estudadas. No caso das microfluidizadas, optou-se por utilizar apenas 0, 3 e 10 ciclos e três valores de concentração de surfactante (RSO 0,5; 1,0; 2,0). Constatou-se que as formulações mais estáveis, ou seja, que apresentaram os menores valores ( $p < 0,05$ ) de índice de instabilidade foram: NE/alecrim/MF/10ciclos/RSO2,0; NE/alecrim/ICF2/RSO2,0; NE/alho/MF/10ciclos/RSO1,0.

Na comparação do grupo com o mesmo OE, no caso do alecrim primeiramente, a concentração de surfactante (RSO), número de ciclos, método de emulsificação não mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Para as NE/alho, com exceção da composição que mostrou diferença (NE/alho/MF/10ciclos/RSO1,0) o IE não foi alterado de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) pela variação em nenhum dos processos (MF ou ICF) ou na composição. Os resultados sugerem que para as combinações utilizadas e tipos de OE, o método de alta energia se mostra mais eficiente para produzir NE mais estáveis.

Os valores de índice de instabilidade (TABELA 4.5) foram obtidos ao final do procedimento e tendem a não descrever o mecanismo, bem como o comportamento das NE quando submetidas a forças que tendem a desestabilizar nanoemulsões por processo de separação gravitacional. Curvas II com relação ao tempo, descrevem o comportamento instável das NE à medida que são submetidas às forças provenientes do processo de centrifugação. Tais curvas estão apresentadas na FIGURA 4.18 (NE por ICF) e FIGURA 4.19 (NE por MF).

A FIGURA 4.18 mostra o método ICF, quando o surfactante foi adicionado à fase aquosa (ICF1 – FIGURA 4.19b e d) ou na fase do OE (ICF2 – FIGURA 4.18a e c). A taxa de aumento do II com o tempo foi menor para NE/Alecrim e NE/Alho obtidas por ICF 2, indicando que a localização do surfactante, em processo de emulsificação de baixa energia, não só interfere nos diâmetros das nanogotas (OSTERTAG et al., 2012), mas também na estabilidade destas. De maneira complementar ao valor de II (TABELA 4.5), notou-se que as NE/Alho para ICF 2 demonstraram uma maior resistência (tempo superior à 100 s) ao início da desestabilização do que as NE/Alecrim (por volta dos 50s).



TABELA 4. 5: Índice de instabilidade das nanoemulsões obtidas por inversão catastrófica de fase tipo 1(ICF1)\* e tipo 2(ICF2)\*\* , e microfluidização (MF) para diferentes valores de razão mássica surfactante/OE (RSO)

NE	ICF Método	MF Ciclos	RSO	Índice de Instabilidade (valor médio)	
alecrim		0	0,5	0,89 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>	
		3	0,5	0,82 ± 0,06 <sup>a,b,c,d</sup>	
		10	0,5	0,82 ± 0,07 <sup>a,b,c,d</sup>	
		0	1,0	0,81 ± 0,02 <sup>a,b,c,d</sup>	
		3	1,0	0,87 ± 0,02 <sup>a,b,c</sup>	
		10	1,0	0,81 ± 0,03 <sup>a,b,c,d</sup>	
		0	2,0	0,60 ± 0,04 <sup>d</sup>	
		3	2,0	0,13 ± 0,05 <sup>e</sup>	
		10	2,0	0,12 ± 0,01 <sup>e</sup>	
		1		0,5	0,90 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>
		1		1,0	0,91 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>
		1		1,5	0,90 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>
		1		2,0	0,89 ± 0,02 <sup>a,b,c</sup>
		2		0,5	0,85 ± 0,02 <sup>a,b,c,d</sup>
	2		1,0	0,87 ± 0,05 <sup>a,b,c</sup>	
	2		1,5	0,89 ± 0,05 <sup>a,b,c</sup>	
	2		2,0	0,61 ± 0,16 <sup>d</sup>	
alho		0	0,5	0,90 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>	
		3	0,5	0,80 ± 0,02 <sup>a,b,c,d</sup>	
		10	0,5	0,75 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>	
		0	1,0	0,92 ± 0,03 <sup>a,b</sup>	
		3	1,0	0,68 ± 0,02 <sup>b,c,d</sup>	
		10	1,0	0,61 ± 0,11 <sup>d</sup>	
		0	2,0	0,94 ± 0,01 <sup>a</sup>	
		3	2,0	0,85 ± 0,01 <sup>b,c,d</sup>	
		10	2,0	0,78 ± 0,07 <sup>a,b,c,d</sup>	
		1		0,5	0,67 ± 0,10 <sup>c,d</sup>
		1		1,0	0,73 ± 0,10 <sup>a,b,c,d</sup>
		1		1,5	0,73 ± 0,03 <sup>a,b,c,d</sup>
		1		2,0	0,80 ± 0,01 <sup>a,b,c,d</sup>
		2		0,5	0,87 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>
	2		1,0	0,88 ± 0,02 <sup>a,b,c</sup>	
	2		1,5	0,92 ± 0,04 <sup>a,b</sup>	
	2		2,0	0,89 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>	

\*surfactante solubilizado em água; \*\*surfactante adicionado à fase lipofílica; letras diferentes indicam, valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

O surfactante atua como componente estabilizante em NE, uma vez que as duas fases são imiscíveis, e para emulsificações de baixa energia, sua concentração é fator importante para a estabilidade. Essa dependência fica evidenciada para NE/alecrim obtidas por ICF 2, em que a curva referente ao valor de RSO 2,0 destoa das demais

(FIGURA 4.18), com valores de  $II$  final muito menores que os demais. Isso permite inferir que não só os valores de RSO, mas também o tipo de OE interferem na estabilidade das NE.

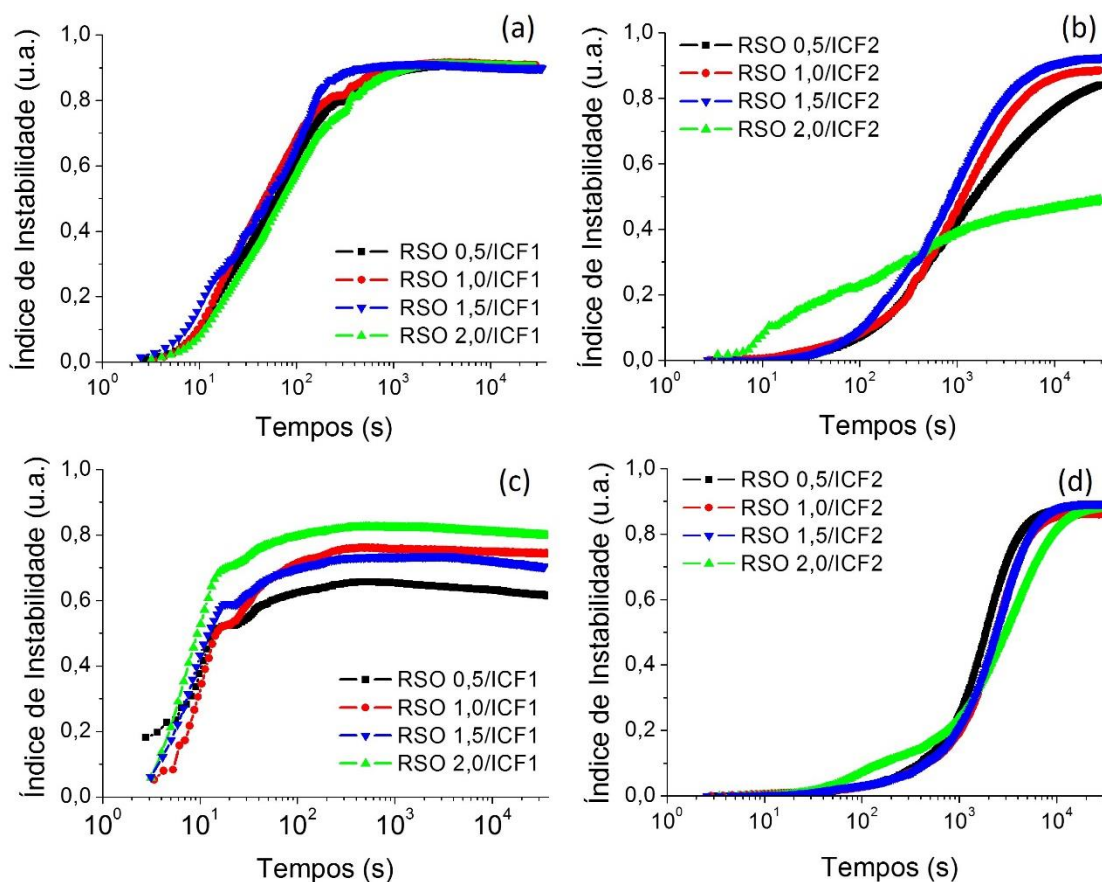


FIGURA 4. 18: Curvas de índice de instabilidade pelo tempo para NE/alecrim (a, b) e NE/alho (c, d). Comparativo entre instabilidade em relação ao tempo para dois protocolos de inversão catastrófica de fase: ICF 1 e ICF 2, variando os valores da razão mássica surfactante/OE (RSO).

A composição das NE também interferiu no  $II$  das NE obtidas por microfluidização. Quando o valor de RSO aumentou de 0,5 (FIGURA 4.19a) para 2,0 (FIGURA 4.19c), observou-se uma diminuição na taxa de variação do  $II$  pelo tempo, mesmo para composições que não foram submetidas ao processo de microfluidização (zero ciclo – FIGURA 4.19, curvas em preto). Esse comportamento se repete para as NE/Alho (FIGURA 4.19d e f). Com o aumento do número de ciclos, a diminuição é acentuada ao ponto de não se modificar a medida que o tempo passa para as NE/alecrim, não sendo tão eficiente para as NE/alho, sugerindo que as características da fase

dispersa (no acaso do OE) tendem a interferir nas propriedades físicas-químicas das NE, como já estudado por OSTERTAG et al. (2012) e SALVIA-TRUJILLO et al. (2015).

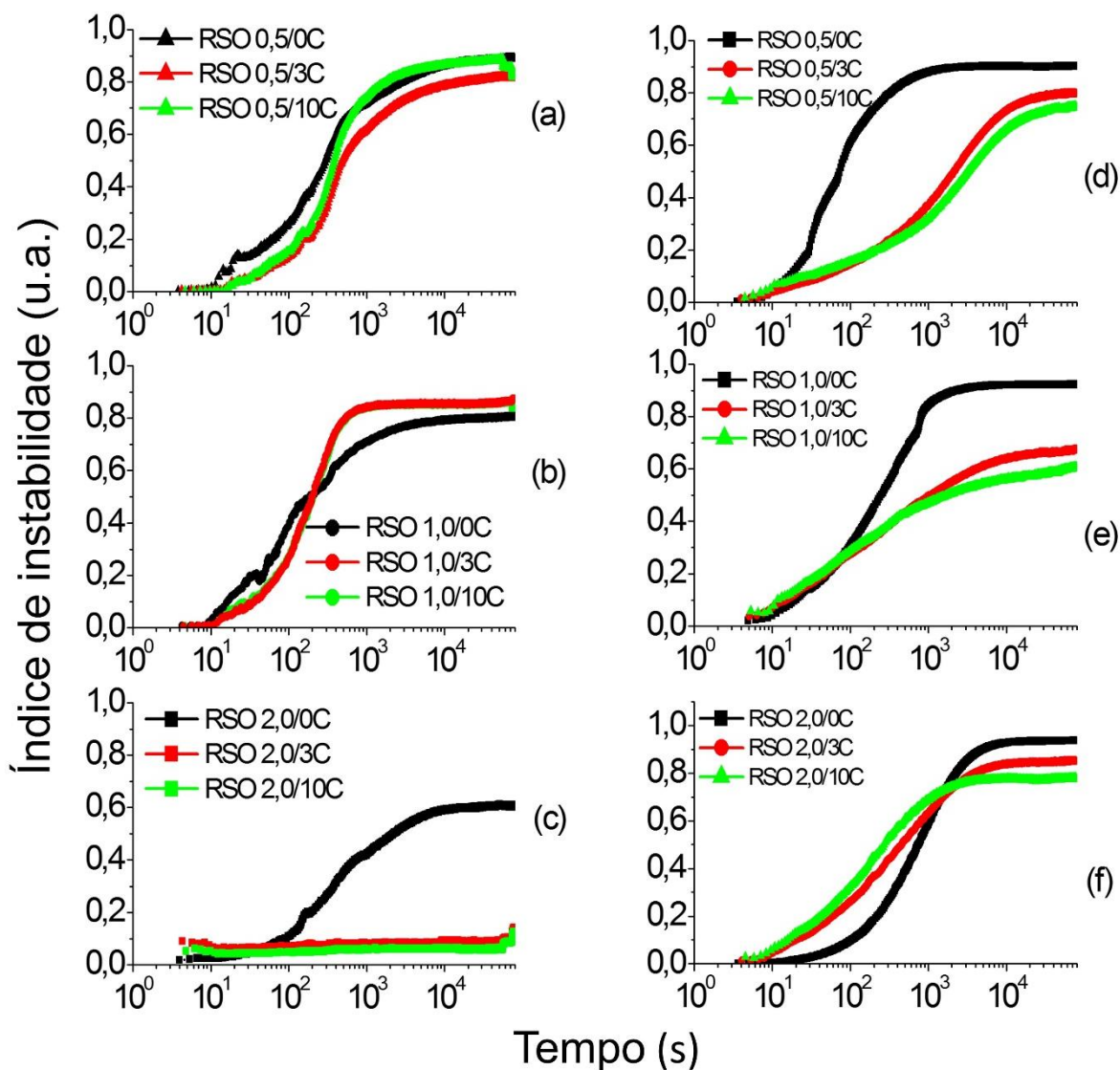


FIGURA 4. 19: Curvas de índice de instabilidade pelo tempo para NE/alecrim (a, b, c) e NE/alho (d, e, f): comparativo entre instabilidade em relação ao tempo para 0, 3 e 10 ciclos de microfluidização e 0,5 (preto), 1 (vermelho) e 2 (verde) para valores de razão mássica surfactante/OE (RSO).

As fotografias das NE (FIGURA 4.3 e FIGURA 4.4) obtidas por ICF, tanto para alecrim quanto para alho, apresentam indícios dos possíveis mecanismos de instabilidade que atuam sobre os sistemas coloidais aqui produzidos, sendo cremeação para as NE/alecrim (densidade do OE alecrim  $0,925 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e sedimentação para NE/alho (densidade do OE de alho  $1,075 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A estabilidade analisada pela técnica LUMISizer® mostra-se interessante pois acelera a velocidade de separação (Equação 2) aumentando o fator aceleração em 10, até 100 vezes. Curvas de transmitância/tempo pela posição foram obtidas para as NE/alecrim e NE/alho tanto para ICF quanto para MF, as quais estão apresentadas no APÊNDICE A (da FIGURA A.1 à FIGURA A.4). Em tais curvas, as medições inferidas no início da análise aparecem em vermelho, enquanto os perfis mais recentes de transmissão estão ao topo em verde. Regiões tracejadas referem-se ao menisco. Maiores valores de transmissão indicam baixa concentração de partículas, enquanto menores valores indicam alta concentração de partículas, sem haver nesse caso distinção entre partículas maiores e aglomerado de partículas. Identifica-se, tanto para ICF quanto para MF, que as NE/alecrim sofrem o processo de cremação. Isso é verificado pela diminuição da transmissão para valores próximos ao menisco, o que indica uma maior concentração de partículas nessa região.

Os perfis de inclinação (FIGURA A.1 e A.2) para NE/alecrim obtidas por ICF (FIGURA 4.18) e por MF (FIGURA 4.19) mostram-se bastante diferente, o que pode estar relacionado à polidispersividade das NE. Segundo DAMMAK & SOBRAL (2018), partículas maiores tendem a se mover de forma mais rápida do que partículas menores. Dessa forma, verifica-se, principalmente para NE/alecrim obtidas por ICF, a existência de variações partículas de diferentes tamanhos devido a linha de aumento da transmissão do infravermelho (indicado com uma seta nas figuras) possuir um perfil e inclinação variado. Isso converge com os diâmetros obtidos para essas NE (FIGURA 4.5 e 4.7). Esse perfil não foi verificado para as NE/alecrim obtidas por MF (FIGURA A.4). Para essas, o que se observa é que uma linha praticamente constante durante todo a análise, sobretudo para o maior número de ciclos. A transmissão quase que constante indica NE com baixa polidispersividade, algo que já fora observado por espalhamento dinâmico da luz (FIGURA 4.10 e 4.12). Essa transmissão constante sugere também uma alta concentração de partículas em toda a extensão da cubeta e a sua resistência à forças de separação de fase. A cremação pode ser observada pelo picos mais intensos de transmissão de infravermelho nas regiões próximas ao menisco (FIGURA A.1), visível para as NE/alecrim por ICF (FIGURA 4.3) e não visualizadas para NE/alecrim obtidas por MF (FIGURA 4.9). Tais resultados indicam que NE/alecrim por MF são mais estáveis à separação por cremação.

NE/alho apresentaram perfis distintos (FIGURA A.2 e A.4), tanto quando comparadas com as NE/alecrim, quanto quando comparados os dois métodos de emulsificação (FIGURA A.2). O OE de alho apresenta uma densidade superior à da água (fase contínua), de forma que o mecanismo de instabilidade por separação gravitacional é a sedimentação. Isso fica evidente nas curvas de transmissão/tempo/posição. Do início ao término da análise o aumento na transmissão se dá em direção ao topo (seta indica a posição nas figuras). Esse aumento indica uma concentração maior de partículas ao fundo do que ao topo das cubetas, indicando assim a sedimentação como processo de instabilidade ocorrendo para NE/alho. Tal perfil ficou mais evidente para NE/alho obtidas por ICF 2 do que para ICF 1, e foi amenizado para aquelas produzidas por MF. A sedimentação ainda pode ser observada nas fotografias das NE obtidas por ICF (FIGURA 4.4)

As distribuições de diâmetros médios das NE/alho (FIGURA 4.13b) indicam uma distribuição bimodal de partículas entre 100 e 1000 nm. Ao observar o perfil das curvas de transmissão/tempo/posição é possível notar o movimento de partículas maiores (primeiras linhas vermelhas da base para o topo – seta indica o sentido) e menores, resultando em um perfil inclinado em toda a extensão da cubeta e por todo o tempo de análise. Esse perfil se repetiu para as NE/alho por MF (FIGURA A.4) para zero ciclo, ou seja, para as emulsões grosseiras de alho. O número de ciclos deslocou consideravelmente a distribuição das NE/alho para região de 10 a 50 nm (FIGURA 4.13), refletindo na estabilidade destas: NE com 10 ciclos apresentaram perfis constante de transmissão ao longo da cubeta, indicando a resistência da NE à forças de separação de fase e a alta concentração de partículas menores, resultado do processo de MF.

De acordo com QIAN & MCCLEMENTS (2011) nanoemulsões são sistemas que tendem a ter uma maior estabilidade à separação gravitacional devido aos diâmetros médios pequenos, os quais são mais suscetíveis ao movimento Browniano do que a forças gravitacionais, suprimindo-a. Os perfis mais estáveis para NE obtidas por MF estão em consonância com o que a literatura apresenta, por apresentarem diâmetros médios menores (FIGURA 4.12 e FIGURA 4.13). NE baseadas em Octano/SDS apresentaram maior estabilidade à cremação com o aumento no número de ciclos para concentração constante de surfactante (ULUATA et al., 2016). Contudo, os autores identificaram que o aumento considerável na concentração de surfactante, resultou na

instabilidade das NE para poucos ciclos. Tal comportamento foi relacionado ao de floculação de depleção, em que a uma concentração crítica, micelas de surfactante que não foram absorvidas pelas gotas tendem a criar um gradiente de concentração entre as gotas de óleo, aumentando as forças atrativas entre as gotículas de óleo (GREGORY, 2013). Para as NE/Alecrim e NE/Alho não foi observado tal fenômeno, tendo em vista que o aumento do surfactante (RSO 0,5 para RSO 2,0) resultou em perfis de estabilidade (FIGURA A.3 e A.4) menos suscetíveis ao mecanismo de separação gravitacional.

Sugere-se aqui, que o aumento da quantidade de surfactante até valores RSO 2,0 tenha ficado abaixo da crítica para o fenômeno de floculação por depleção. Dessa forma a quantidade de surfactante atua de forma a estabilizar as NE, prevenindo a floculação e coalescência destas. Tal fenômeno é conhecido como efeito Gibbs-Marangoni (ESPITIA et al., 2019), em que um filme formado pela fase contínua entre duas gotas é espremido, gerando um gradiente de tensão, o qual diminui a taxa de aproximação das NE, impedindo assim a agregação (seja por coalescência ou floculação).

O mecanismos de agregação dependem das características físico-químicas dos componentes das NE, da carga superficial e do efeito estérico resultado da formação das nanogotas. O potencial zeta permite indicar, do ponto de vista eletrostático, quais NE possam estão aptas a sofrerem processo de floculação ou coalescência. Os valores de potencial zeta para as NE obtidas por ICF (FIGURA 4.14 e FIGURA 4.15) aludem à maior instabilidade do que as NE obtidas por MF (FIGURA 4.16 e 4.17). Valores menores resultam em menor interação eletrostática repulsiva, permitindo a aproximação, e indicando, que durante a separação gravitacional, mecanismos de agregação, como floculação podem ter ocorrido.

O envelhecimento de Ostwald (EOW) é um dos mecanismos mais comuns para NE (LI & CHIANG, 2012; RAO & MCCLEMENTS, 2012a; RAO & MCCLEMENTS, 2012b), principalmente para OE que apresentam certa solubilidade ou polaridade (DONSÌ et al., 2011; MCCLEMENTS, 2007) e pode ser definido como o crescimento de partículas maiores a partir de partículas menores, pela difusão do óleo (fase dispersa) pela fase contínua, devido gradiente de solubilidade criado pela diferença entre os diâmetros (WOOSTER et al., 2008). De acordo com DONSÌ & FERRARI (2016), após atingido o EOW, este ocorre inevitavelmente, a menos que inibidores ou óleos com baixa

solubilidade em água sejam adicionados. Tendo em vista que o gradiente para difusão do óleo de gotas menores para maiores, uma dispersão de partículas homogênea tende a retardar esse mecanismo. Sugere-se que as NE obtidas por MF demonstram-se menos suscetíveis ao EOW a curto prazo, do que as NE obtidas por ICF.

Uma vez que a diferenciação dos mecanismos de instabilidade não foi o escopo desse trabalho e sim se estas são estáveis, e ainda, somado à dificuldade de diferenciar os mecanismos de coalescência e de EOW por técnicas com espalhamento dinâmico da luz e LUMisizer, sugere que posteriormente sejam feitas análises de diâmetro médio em relação ao tempo de forma o mecanismo predominante na instabilidade das NE (RAO & MCCLEMENTS, 2012b).

#### 4.3.4 - Morfologia das NE de Alecrim

A morfologia e estruturação de sistemas coloidais são importantes características que, quando verificadas com imagens nos sistemas originais (não concentrados ou diluídos) permitem sua visualização sem qualquer modificação estrutural consequente do preparo, incluindo artefatos de secagem (KUNTSCHE et al., 2011). A microscopia eletrônica de transmissão em ambiente criogênico (MET-Crio) tem se mostrado como uma alternativa para o estudo de NE (KUMAR & MANDAL, 2018a; KUMAR & MANDAL, 2018b; PAL et al., 2019; REN et al., 2019) pois é possível preservar, durante a vitrificação amorfa da água, os sistemas coloidais ao quais pretende-se estudar (PATTERSON et al., 2017).

Com esse intuito, MET-Crio foram realizadas para as NE/alecrim de forma a identificar a morfologia e estrutura dessas emulsões para os dois métodos de emulsificação (ICF e MF) e o possível efeito da quantidade de surfactante. As FIGURAS 4.20, FIGURA 4.21 e FIGURA 4.22 apresentam respectivamente NE/alecrim obtidas por ICF1 (RSO 1,0), ICF 2 (RSO 2,0) e MF (RSO 2,0).

Verifica-se que os três processos de emulsificação promovem a formação de nanoestruturas *quasi*-esféricas definidas e com diâmetros variados, principalmente para as NE/alecrim obtidas para ICF 1 e ICF 2, corroborando as distribuições de diâmetro médio discutidas no item 4.3.2.1.

A emulsão aqui estudada é um sistema em que uma das fases é composta por um composto hidrofóbico, o OE. Este possui afinidade à outros compostos hidrofóbicos como no caso, o grid para deposição da amostra. Verifica-se para as todas as imagens, em especial as FIGURA 4.20 e FIGURA 4.21 que as gotas estão localizadas ao lado dos grids (FIGURA 4.20f e FIGURA 4.21g) isso ocorre pelo comportamento de interação hidrofóbica entre as gotas de óleo e os grids de carbono (estes identificados por asterisco em branco). Ao ser depositada no grid, as partículas de OE se aproximam, por afinidade, das regiões apolares do grid e, em seguida, são fixadas em suas posições pela secagem instantânea em etano líquido.

Fica evidente a eficiência no processo de MF, uma vez que as de MET-Crio mostram uma dispersão homogênea de partículas com diâmetro entre 10 e 25 nm. É possível ainda averiguar que os métodos de ICF1 e ICF2 produziram gotas com tamanho e morfologia díspares. No caso da ICF1, observa-se gotas (Na FIGURA 4.20



indicada por setas e pela sigla – OE – “óleo essencial”) esféricas com diâmetros variados, contudo sem diferenciação do óleo e do surfactante que o recobre. Isso pode ser analisado pelas microscopias da ICF 2 (FIGURA 4.21g e 4.21h), onde é possível identificar diferenças na estrutura, sugerindo gotículas de óleo estabilizadas com uma espessa camada de surfactante. Tal estrutura se assemelha à observada por LEE, H. S. et al. (2014). NE de hexano e surfactantes isononilfenol-4-etoxilato e isononilfenol-20-etoxilato apresentaram morfologia esféricas e com diferenciação das camadas: uma indicando a fase lipofílica e o recobrimento com os surfactantes.

Para NE/alecrim com RSO 1,0 (FIGURA 4.7b), a distribuição de diâmetros indicou diâmetros entre 10 e 50 nm, bem como diâmetros por volta dos 200 nm. As imagens de MET-Crio indicam uma consonância com esses valores (FIGURA 4.20b). Nanogotas esféricas são podem ser vistas com diâmetros inferiores à 100 nm em FIGURA 4.20b, d e f. Identifica-se (FIGURA 4.20d – indicado com um circunferência preta) estruturas com diâmetro entre 10 e 30nm, as quais são encontradas também nas FIGURA 4.20d e FIGURA 4.21e. Principalmente para as NE/Alecrim obtidas por MF (FIGURA 4.22) há uma homogeneidade de estruturas com diâmetros entre 10 e 30 nm, congruente com as distribuições de diâmetros (FIGURA 4.12), indicando a existência tanto de nanogotas, quanto de micelas do surfactante. Estas já foram referidas como micelas de surfactante circulares com diâmetros na região de 10nm (FATOUROS et al., 2007; VITHANI et al., 2019).

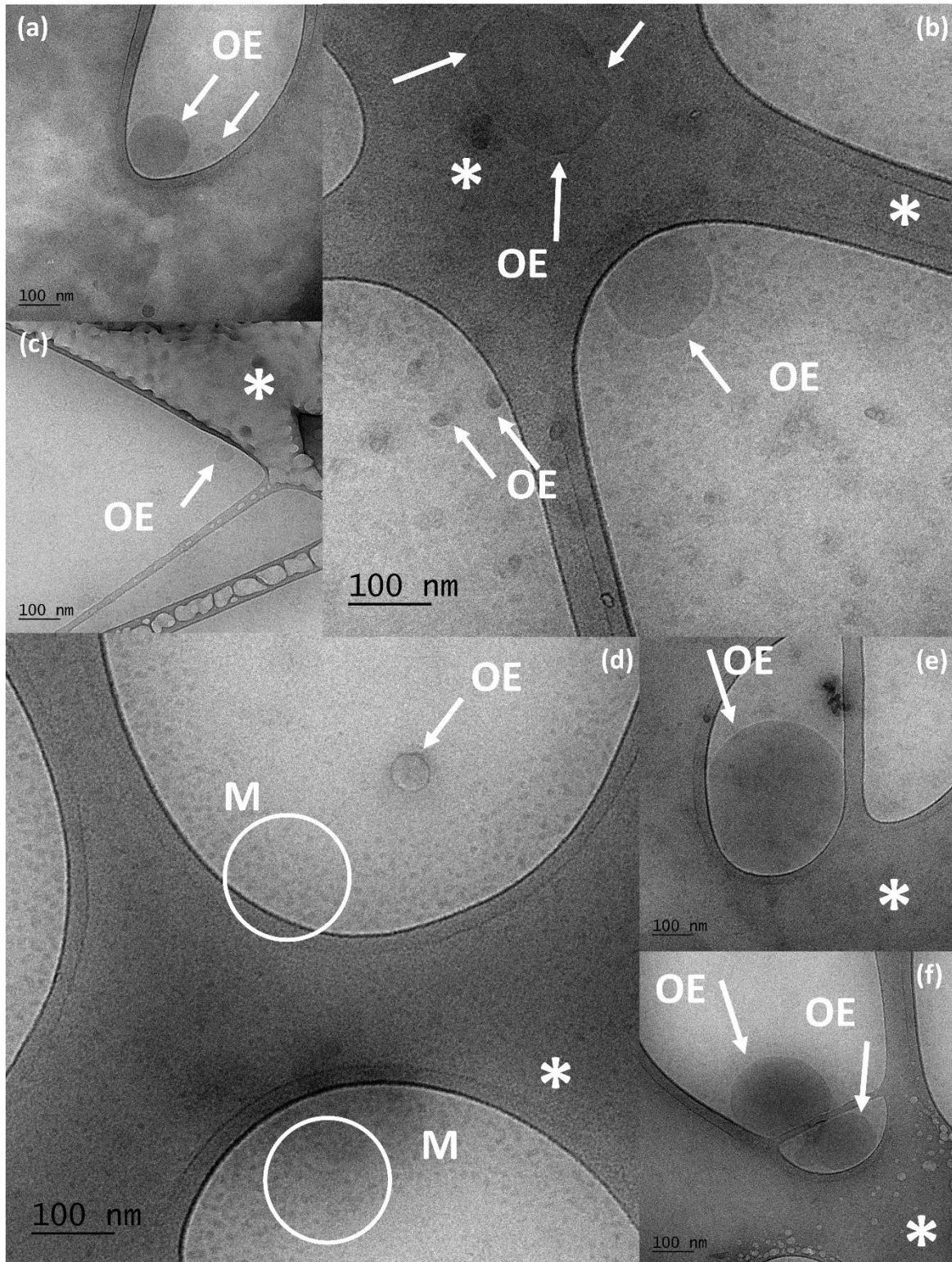


FIGURA 4. 20: Morfologia de NE/Alecrim ICF1 obtidas por MET-Crio. Setas e sigla OE indicam as nanogotas do óleo essencial. O símbolo \* apresenta a região que delimita a área onde a amostra é depositada, o gride de cobre recoberto com carbono. Letra M indica região com micelas do surfactante.

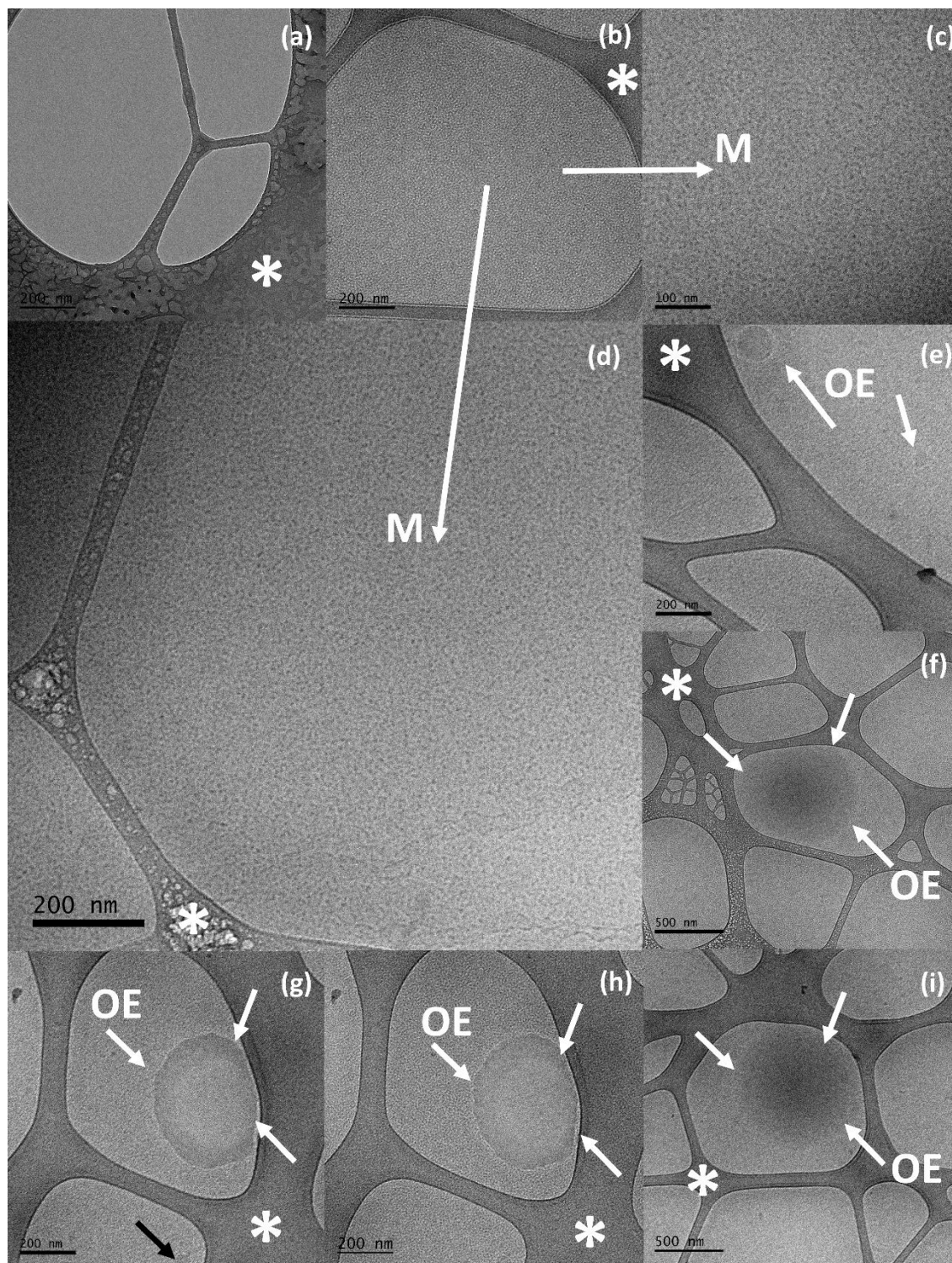


FIGURA 4. 21: Morfologia de NE/Alecrim ICF2 obtidas por MET-Crio para diferentes regiões: (a) grade de amostra apenas com água em estado sólido amorfo para efeito de comparação com grids que apresentaram amostras; (b, c, d, e, f, g, h, i) diferentes diâmetros observados para uma mesma NE. Setas e a sigla OE indicam as nano-gotas observada. O símbolo \* apresenta a região que delimita a área onde a amostra é depositada. Letra M indica as micelas de surfactante.

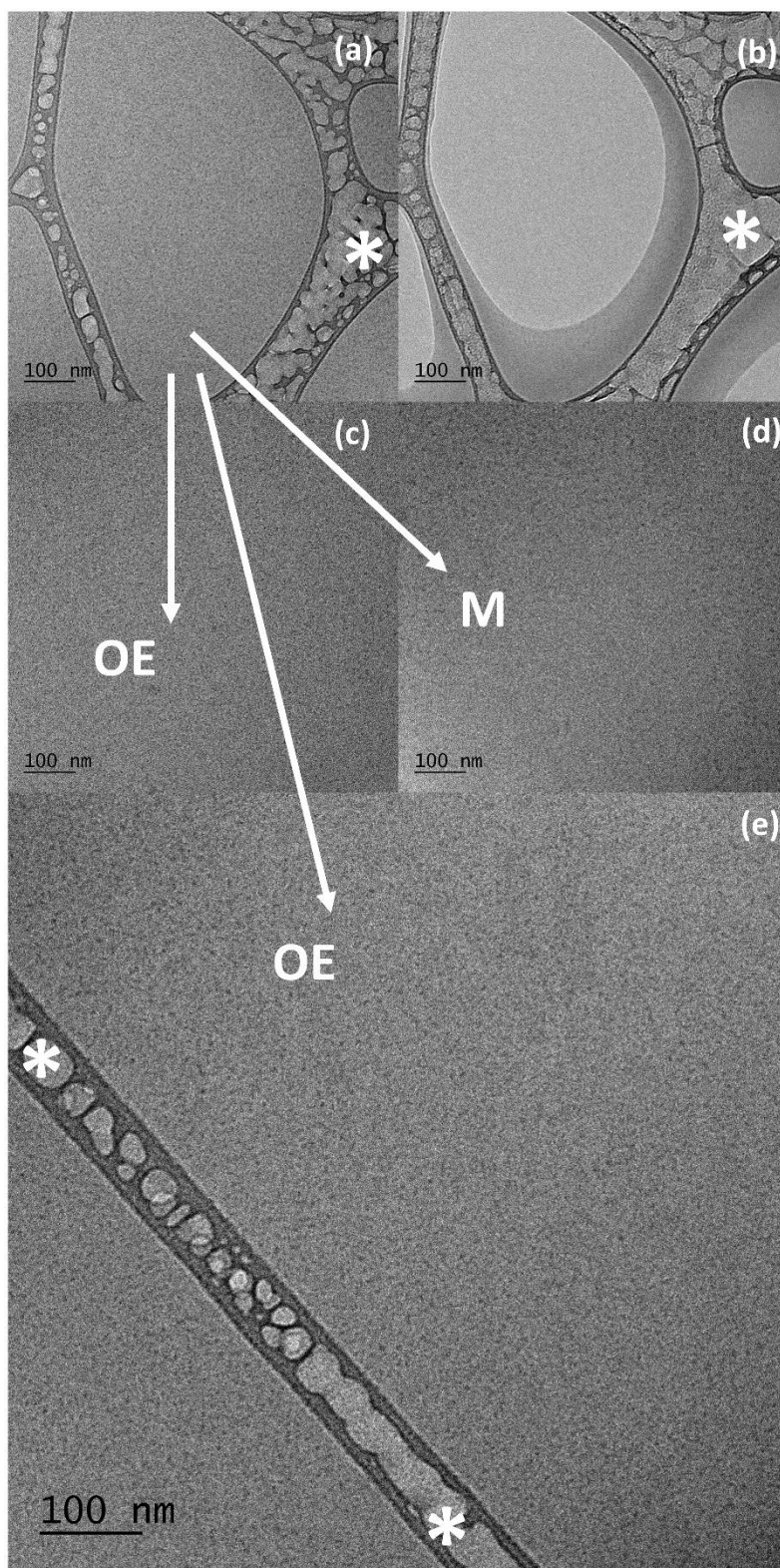


FIGURA 4. 22: Microscopia eletrônica de transmissão criogênica. Morfologia das NE/alecrim produzidas por microfluidização (10 ciclos e RSO 2,0): (a, c, d, e) diferentes regiões do grid de transmissão; (b) região onde não há amostra para comparação. Setas e a sigla OE indicam as nano-gotas observada. O símbolo \* apresenta a região que delimita a área onde a amostra é depositada. Letra M indica as micelas de surfactante.



#### 4.4 - Conclusões Parciais

Os extratos comerciais de óleos essenciais de alecrim e de alho apresentaram atividade antimicrobiana contra 4 diferentes culturas de bactérias: *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* e *E. faecalis*. A concentração mínima inibitória obtida para óleo essencial de alecrim foi de 0,7 % v/v. e do OE de alho apresentou o valores entre 0,1 e 0,3% v/v.

O método de inversão catastrófica de fase mostrou-se eficiente para obtenção de nanoemulsões para os dois óleos. A localização do surfactante indicou a existência de diferentes mecanismos para formação de nanoemulsões: (1) desprendimento de gotas de óleo da interface óleo/surfactante/água quando o surfactante foi adicionado a fase contínua; (2) formação das emulsões múltiplas quando o surfactante foi adicionado a fase dispersa.

A microfluidização em altas pressões produziu, com sucesso, nanoemulsões de alecrim e de alho. O aumento no número de ciclos agiu de forma a homogeneizar a força de ruptura sobre toda a fase oleosa, produzindo partículas abaixo de 60 nm para ambas nanoemulsões (de alecrim e de alho). O aumento na concentração de surfactante diminuiu o diâmetro médio das nanoemulsões, sendo isso consequência da diminuição da tensão interfacial entre as gotas de OE e a fase dispersa.

As nanoemulsões obtidas por microfluidização apresentaram maiores valores de potencial zeta, em comparação com o método de inversão catastrófica de fase. O valor da carga negativa ocorreu para todas as nanoemulsões, proveniente da composição dos óleos essenciais (ácidos graxos que podem sofrer o processo de ionização em água), bem como da região hidrofílica do surfactante, que tende a atrair íons hidroxila para a interface surfactante/água, tornando a camada dielétrica da partícula, negativa.

A microfluidização mostrou-se eficiente para obter nanoemulsões com maior estabilidade se comparada com as obtidas por inversão catastrófica de fase. A estabilidade apresentou-se dependente da densidade de cada óleo essencial. As nanoemulsões de óleo essencial de alecrim sofreram o processo de cremação por apresentar densidade menor que a densidade da fase contínua, enquanto as de alho apresentaram a sedimentação como mecanismo de instabilidade, uma vez que a densidade era maior que a da fase contínua.

A MET-crio possibilitou a identificação da morfologia das nanoemulsões obtidas por inversão catastrófica de fase e microfluidização. No caso da microfluidização, observou-se dispersões de diâmetros mais homogêneas, com diâmetros entre 10 e 30 nm. A inversão catastrófica de fase produziu nanoemulsões com dispersões de diâmetro heterogênea para as quando o surfactante foi adicionado inicialmente à fase dispersa ou quando foi adicionado à fase contínua.

Diante do exposto, as NE/alecrim produzidas por microfluidização apresentaram maior estabilidade, menor diâmetro médio e maior potencial zeta, quando comparadas com as obtidas por inversão catastrófica de fase, nas condições estudadas. Portanto, as NE/alecrim obtidas por microfluidização foram utilizadas para as etapas posteriores.



## CAPÍTULO 5

### 5 – FILMES DE PECTINA: EFEITO DO SURFACTANTE E DAS NANOEMULSÕES NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ANTIMICROBIANAS E ANTIOXIDANTES

#### 5.1 - Material

O polisorbato Tween 80 (T80) de massa molar de  $1310 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e densidade de  $1,065 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP). Pectina de alto grau de metoxilação GENUSET-Z, com massa molar média de  $130.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e grau de metoxilação de 74% oriunda de cascas de frutas cítricas, foi adquirida da empresa CP Kelco (Limeira, SP). Os reagentes DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ágar Müller Hinton foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP).

#### 5.2 – Metodologia

##### 5.2.1 - Composição e protocolo de preparo das soluções filmogênicas de pectina/surfactante

Soluções filmogênicas (SF) estoque de pectina a 5% m/m (5/95 de água deionizada) foram preparadas dissolvendo-se a massa de pectina em água à agitação de 2500 rpm com um agitador mecânico digital (FISATOM - modelo 713D) por 2 h. Em seguida, a solução foi condicionada em dessecador sob vácuo (-600 mmHg) para retirada de bolhas.

Soluções de pectina a 3% m/m e T80 foram produzidas adicionando diferentes quantidade do surfactante T80 (TABELA 5.1) a  $30 \pm 1 \text{ g}$  da solução estoque de pectina e  $20 \pm 1 \text{ g}$  de água deionizada sob agitação de 500 rpm em agitador magnético por 30 min. Em seguida,  $10 \pm 1 \text{ g}$  de SF de pectina/T80 foram vertidas em placas de Petri de poliestireno com diâmetro de  $8,6 \pm 0,1 \text{ cm}$  e condicionadas em estufa a  $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 6 h para secagem.



TABELA 5. 1: Composição e identificação dos filmes de pectina/T80.

<b>SF*</b>	<b>% (m<sub>pec</sub>/m<sub>água</sub>)</b>	<b>% surfactante (m<sub>T80</sub>/m<sub>pec</sub>)</b>	<b>Siglas</b>
PEC/T80	3,0	0	PEC/T80/ 0
PEC/T80	3,0	5,0	PEC/T80/1
PEC/T80	3,0	10,0	PEC/T80/2
PEC/T80	3,0	20,0	PEC/T80/3
PEC/T80	3,0	23,4	PEC/T80/4
PEC/T80	3,0	37,9	PEC/T80/5
PEC/T80	3,0	47,8	PEC/T80/6
PEC/T80	3,0	55,0	PEC/T80/7

\*SF é a sigla para soluções filmogênicas

### 5.2.2 - Composição e protocolo de preparo das formulações filmogênicas de e pectina/nanoemulsões

TABELA 5. 2: composição dos filmes nanocompósitos de pectina/nanoemulsões obtidas por microfluidização:

<b>Nanoemulsões</b>	<b>% (m<sub>pec</sub>/ m<sub>água</sub>)</b>	<b>% surfactante (m<sub>T80</sub>/m<sub>pec</sub>)</b>	<b>% OE de Alecrim (m<sub>OE</sub>/m<sub>pec</sub>)</b>	<b>Siglas</b>
NE/alecrim RSO 0,5	3,0	23,1	37,9	PEC/NE/alecrim RSO0,5
NE/alecrim RSO 1,0	3,0	37,9	37,9	PEC/NE/alecrim RSO1,0
NE/alecrim RSO 1,5	3,0	47,8	37,9	PEC/NE/alecrim RSO1,5
NE/alecrim RSO 2,0	3,0	55,0	37,9	PEC/NE/alecrim RSO2,0

RSO: Razão mássica entre surfactante e óleo essencial. PEC: pectina. NE: nanoemulsões. OE: óleo essencial

Para as SF de pectina/NE,  $20 \pm 1$  g das NE/alecrim (TABELA 5.2) obtidas por MF foram adicionadas aos  $30 \pm 1$  g da SF estoque de pectina a 5% m/m sob agitação de 500 rpm por 30min, obtendo assim, um SF de pectina/NE com 3% m/m de pectina, Em seguida,  $10 \pm 1$  g de SF de pectina/NE foram vertidas em placas de Petri e secas conforme descrito anteriormente.

### **5.2.3 – Interações entre componentes das soluções filmogênicas pectina/surfactante**

As interações entre os componentes das soluções filmogênicas de pectina/T80 foram avaliadas segundo um protocolo pré-estabelecido (JOSHI et al., 2016; MOUSSEAU et al., 2018; VITORAZI et al., 2014) para identificação de possíveis interações entre os componentes a partir da leitura da quantidade de luz espalhadas ou por absorvância por UV para misturas de diferentes volumes de dois componentes (iniciando em 100% do volume da solução componente 1 até 100% do volume da solução do componente 2, ambas soluções, com mesma concentração). Modificações ou no aumento da quantidade de luz espalhada ou na absorvância de um dos componentes em solução pode ser um indicativo do nível de interação entre os componentes, neste caso pectina e o surfactante.

*Protocolo 1:* Método realizado segundo MOUSSEAU et al. (2018). Soluções 0,1% em massa de pectina e 0,1% de polisorbato 80 (T80) foram preparadas e misturas em proporções volumétricas que variaram de 0,001 a 1000 entre as duas soluções. Cerca de  $1,00 \pm 0,01$  mL das misturas de volume foram analisados quanto ao tamanho e à quantidade de luz espalhada no aparelho Malvern Zetasizer Nano ZS (Worcestershire, Reino Unido). *Protocolo 2:* Método adaptado de JOSHI et al. (2016). Soluções a 0,1% em massa de pectina e 0,1% de T80 foram preparadas e misturas em proporções volumétricas que variaram de 0,001 a 1000 entre as duas soluções. A absorvância de cerca de  $1,00 \pm 0,01$  mL das misturas de volume foi determinada a partir da incidência de luz a 282 nm em espectrofotômetro ultravioleta-visível (Shimadzu, modelo UV-1600).

#### 5.2.4 – Reologia das soluções filmogênicas pectina/surfactante

O comportamento reológico foi avaliado para soluções de pectina e o surfactante T80 em dois diferentes protocolos. *Protocolo 1*: Soluções filmogênicas (TABELA 5.1) de pectina/T80 e de pectina/NE/alecrim (TABELA 5.2) foram analisadas por reometria rotacional em reômetro MCR 301 (Anton Paar GmbH, Áustria) operando com geometria de cilindros concêntricos (DG26.7) e taxas de cisalhamento variando de: 0,1 a 100 s<sup>-1</sup>. *Protocolo 2*: Soluções diluídas de pectina (0,1 % m/m) e T80 (0,1% m/m) foram misturas em diferentes proporções volumétricas entre 0,001 à 1000 foram analisadas por reometria rotacional a três diferentes taxas de cisalhamento: 0,1; 1 e 100 s<sup>-1</sup>.

#### 5.2.5 – Aspectos Morfológicos e Estruturais

Filmes de pectina/T80 e de pectina/NE/alecrim foram analisados por microscopia eletrônica de varredura em um microscópio JEOL JSM-6510. Amostras dos filmes foram alocadas em dessecador por 24 h (umidade próxima de 0%) e posteriormente fraturadas em nitrogênio líquido (-195°C). Em seguida, foram fixadas em stubs e recobertas com uma camada de ouro (Denton Vacuum Inc., Moorestown, NJ, E.U.A.) por 45 s em 20 mA.

A composição química dos filmes de pectina/T80 foi analisada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e módulo de atenuação por diamante operando em modo de refletância em espectrômetro FTIR VERTEX 70 (Bruker Optik GmbH, Alemanha), na região espectral de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>, com 128 varreduras acumuladas e resolução de 2 cm<sup>-1</sup>.

#### 5.2.6 – Espessura e propriedades mecânicas

A espessura dos filmes foi analisada por micrômetro digital Absolute-AOS série 500 (Mitutoy, Japão), mensurando-se cinco diferentes pontos dos filmes obtidos.

Os atributos mecânicos dos filmes de pectina/T80 e pectina/NE/Alecrim foram analisados por meio de ensaios de tração uniaxial para obter os valores de tensão máxima (TM), módulo elástico (ME) e alongação máxima até a ruptura (ER). Para isso,

amostras retangulares (12,89 x 6,32 mm) dos filmes foram deformadas rampa de tensão de 0,1%/min até 50% em equipamento DMA Q800 (TA Instruments, Inc., New Castle, EUA) operando em modo tensão. TM foi calculada dividindo a força máxima pela área da seção transversal inicial de cada amostra, enquanto a ER foi calculada subtraindo o comprimento da amostra na ruptura pelo comprimento inicial e normalizando pelo comprimento inicial. Essa análise foi repetida pra 6 filmes diferentes.

### 5.2.7 - Molhabilidade à água

A molhabilidade dos filmes de pectina/T80 e dos filmes nanocompósitos foi determinada por medidas de ângulo de contato (KSV Instruments, Helsinki, Finlândia) com auxílio do FTA 32 Image Software (First Ten Ångstroms). Cerca de 10 µL de água deionizada foram depositados na superfície dos filmes (amostras retangulares de 0,5 x 1,0 cm) e o ângulo de contato gota/superfície foi monitorada por 180s. O ângulo de contato médio em cada tempo foi igual à média aritmética dos ângulos determinados nas extremidades direita e esquerda da gota. Cada filme foi analisado em 5 diferentes pontos.

### 5.2.8 - Termogravimetria

Amostras dos filmes foram (1) aquecidas a 10 °C·min<sup>-1</sup> de 25 até 700 °C, em atmosfera de ar sintético (60 mL·min<sup>-1</sup>), em equipamento TA Q500 (TA Instruments, Inc., New Castle, EUA), para obterem-se curvas termogravimétrica (TG) e as derivadas correspondentes (DTG).

### 5.2.9 – Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos filmes foi realizada segundo método reportado por OTONI et al. (2014) e norma CLSI (2012). Culturas de estocagem de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram mantidas a -80°C até o crescimento em tubos com TSB (*Tryptic soy broth*) (Acumedia Manufactures, Inc., Lansing, MI, EUA) até 37 °C por 24 h e, então, colocadas em diferentes tubos com TSB a 37 °C por 12 h. Colônias isoladas das culturas foram inoculadas com 0,85% (m/v) de solução de NaCl até atingirem a turbidez do padrão McFarland 0,5, o que

corresponde à cerca de  $10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. As suspensões foram vertidas em ágar solidificado (Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD, EUA).

Diferentes composições de filmes de pectina, pectina/T80 (TABELA 5.1) e pectina/NE/MF (TABELA 5.2) foram cortadas em discos de  $4,0 \pm 0,1$  mm de diâmetro e expostas à luz UV (110 V e 254 nm) por 2 min em cada lado antes de serem colocadas nas placas de Petri, as quais foram previamente inoculadas com as culturas de bactérias e deixadas em período de incubação de 16-24 h a 37 °C. O diâmetro do halo de inibição ao redor do filme foi, então, determinado com paquímetro digital Absolute-AOS série 500 (Mitutoyo, Japão). Foi feita uma avaliação visual de inibição, considerando que discos sem área de inibição são filmes que não possuem atividade antimicrobiana.

#### **5.2.10 - Atividade Antioxidante - método de sequestro do radical DPPH**

A atividade antioxidante foi avaliada segundo método reportado por LÓPEZ-MATA et al. (2018) para dois protocolos. *Protocolo 1*: extratos metanólicos contendo OE de alecrim ou OE com diferentes concentrações de T80 (2,26; 4,43; 6,61; e 8,51 %m/v) foram preparados. A  $4,90 \pm 0,01$  mL de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil – 60 $\mu$ M) foram adicionados  $0,10 \pm 0,01$  mL dos extratos previamente preparados. Tais soluções foram condicionadas em ambiente escuro por 30 min. Após a reação, foram analisadas em espectrofotômetro ultravioleta-visível (Shimadzu, modelo UV-1600) por a absorbância a 525 nm. As análises foram feitas em triplicatas. Os valores de absorbância foram utilizados para o cálculo da inibição percentual (IP) dado por:  $IP (\%) = [(Ab_{DPPH} - Ab_{amostra}) / Ab_{DPPH}] \times 100$ . A partir dos pontos de absorbância e da reta resultante do decaimento da concentração do DPPH, calculou-se o valor do EC50%, ou seja, a concentração da amostra necessária para reagir com 50% da quantidade do DPPH. *Protocolo 2*: este difere do primeiro apenas na obtenção dos extratos metanólicos. Cerca de 375 mg de filmes de pectina, pectina/T80 (TABELA 5.1) e pectina/NE alecrim (TABELA 5.2) foram adicionados à  $5,0 \pm 1,0$  mL de metanol por 24 horas para completa extração dos compostos fenólicos. Os extratos foram submetidos a centrifugação a 15°C, 10.000 rpm por 15 min. Diferentes concentrações do extrato (100, 75 e 50%) foram preparadas

de modo a obter valores de absorvância acima e abaixo do EC50% do reagente DPPH. Os valores de IP e EC50% foram calculados como citado acima.

#### **5.2.11 - Análise Estatística dos dados**

Os dados quantitativos foram submetidos a análise de variância ao nível de significância de 5%. Quando esta sugeriu que uma variável dependente fosse afetada pelos diferentes tratamentos ( $p < 0,05$ ), seus valores médios foram comparados através de teste Tukey, ao nível de significância de 5% em software MiniTab 17.1.

### 5.3 - Resultados e Discussão

#### 5.3.1 – Interações entre os componentes da solução filmogênica de pectina, surfactante e nanoemulsões

A partir do que foi estudado o capítulo anterior, as NE são sistemas coloidais formados por micelas de surfactante, nanogotas (óleo recoberto com surfactante) e gotículas de óleo, que quando adicionadas à matriz de pectina para produção dos nanocompósitos podem interagir de diferentes formas com esta matriz. Considerando que as NE são estabilizadas pela presença do surfactante, algumas possibilidades de interação entre as NE e a matriz polimérica estão ilustradas na FIGURA 5.1.

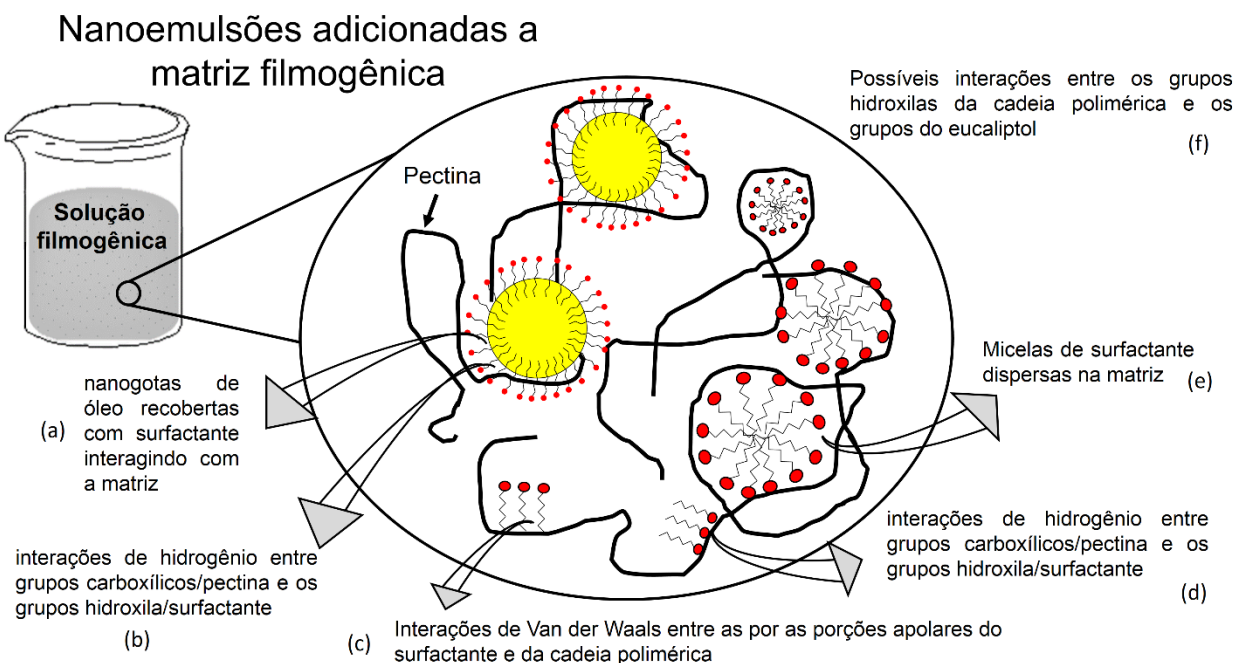


FIGURA 5. 1: hipóteses de interação das nanoemulsões (amarelo, óleo; vermelho, surfactante) na matriz de pectina (linhas em preto). Fonte: próprio autor

A FIGURA 5.2a ilustra os resultados das medidas de espalhamento dinâmico da luz obtidos para misturas de diferentes volumes de pectina e T80. Não foi observado qualquer formação de complexos devido a interações entre os grupos carboxílicos da pectina e os grupos hidroxila da região hidrofílica do surfactante T80, como esperava-se (FIGURA 5.2a). Esperava-se que à medida que a quantidade de T80 aumentasse, a intensidade de luz espalhada para partículas maiores aumentaria, indicando a formação de complexos. O que se nota é decréscimo no diâmetro médio (FIGURA 5.2a) na região de 10 nm para maiores quantidades de T80, o qual refere-se

às micelas do surfactante T80 (PICONE & CUNHA, 2013), tendo em vista que acima da concentração de 0,1% m/v, a concentração mínima micelar do T80 já foi alcançada.

Diferentemente do resultado aqui obtido para um sistema com pectina e o surfactante não iônico T80, MCCLEMENTS (2000) estudou a interação de pectina com dois surfactantes iônicos: dodecil trimetil amônio brometo (DTAB) e o dodecil sulfato de sódio (SDS). Para o sistema formado por pectina e DTAB, o autor sugeriu que ocorrem dois mecanismos de interação: (a) interações eletrostáticas de cargas opostas entre moléculas do surfactante com a matriz e (b) interações entre micelas do surfactante e cadeias do polissacarídeo. No caso do SDS, o mecanismo sugerido foi o de interação das micelas de surfactante SDS e os grupos carboxílicos da pectina. Mesmo o SDS com carga igual à dos grupos carboxílicos, segundo o autor, a formação de micelas de SDS diminuiu a carga média superficial, e permitiu a interação com as cadeias do polissacarídeo.

A FIGURA 5.2b apresenta a absorvância das misturas de soluções de pectina e T80 a 282 nm. Segundo JOSHI et al. (2016), este seria o comprimento relacionado à presença do grupamento carbonila encontrado em residuais de ácido galacturônico, principal unidade de repetição da pectina. Segundo os autores, interações do polissacarídeo pectina com surfactantes aniônico (SDS) e catiônicos (DTAB e CTAB) indicaram uma pequena mudança na absorvância com o aumento da quantidade de surfactante, resultado de modificações estruturais causadas pela formação de complexos. No caso do surfactante não-iônico TX-100, tal incremento foi menor e relacionado a possíveis interações entre as porções apolares tanto do surfactante, quanto da cadeia polimérica (FIGURA 5.2e(1)).

As setas (FIGURA 5.2) indicam possíveis variações na absorvância do sistema, resultantes da adição do surfactante não-iônico T80 para quantidades de 1 e 10% m/m. Isso pode ser resultado da mudança conformacional da pectina em solução (FIGURA 5.2d) para uma estrutura composta por moléculas e micelas do surfactante (FIGURA 5.2e) e a matriz pectica.



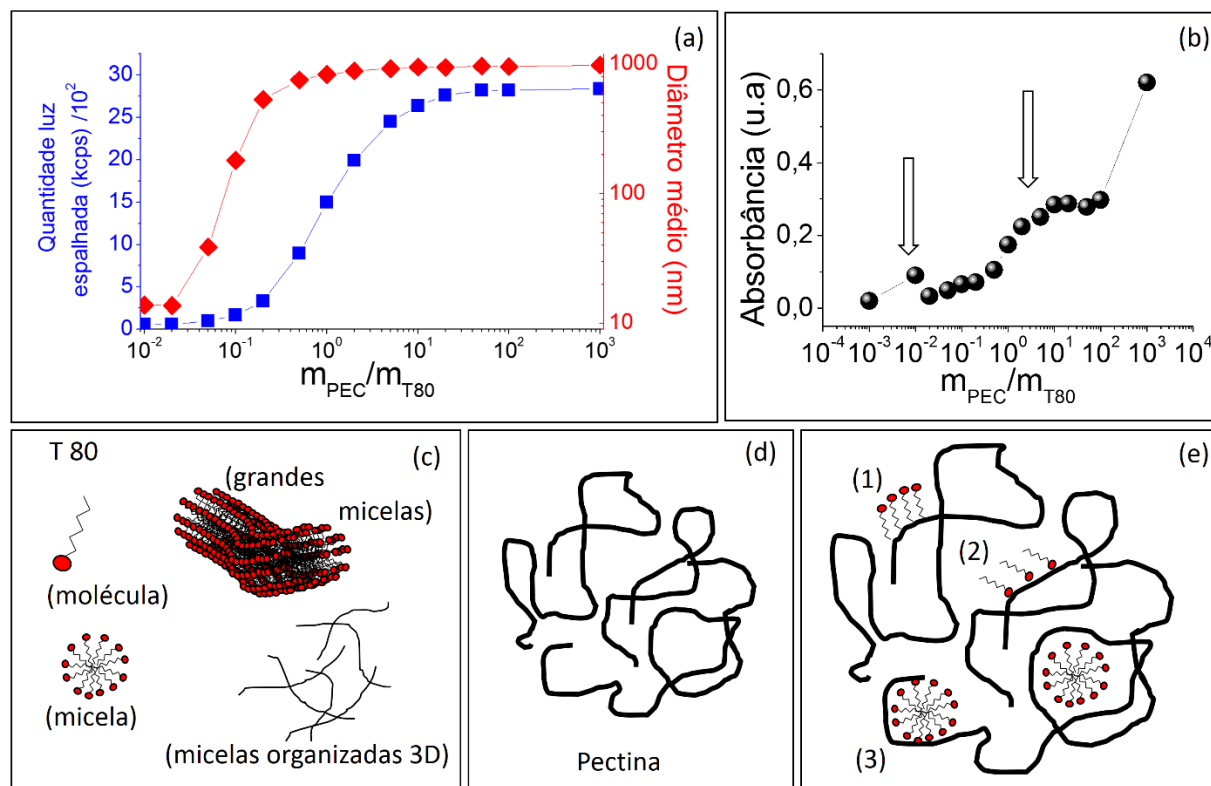


FIGURA 5. 2: interações entre Pectina e T80 para diferentes misturas de volumes avaliadas por quantidade de luz espalhada (a): Quantidade de luz espalhada (■) e diâmetro médio (◆); (b) para espectroscopia na região do Ultravioleta. Modelo representativo das estruturas do surfactante (c) e da pectina (d). Interações sugeridas (e) para o sistema pectina/T80 em solução: (1) interação de Van der Waals entre regiões hidrofóbicas do surfactante e da cadeia polimérica; (2) interações de ligação de hidrogênio entre os grupos hidrofílicos do surfactante (OH) e carboxílicos da pectina; (3) saturação da cadeia polimérica com micelas de surfactante.

Ensaio reológico foram realizados de modo a identificar possíveis interações entre o surfactante T80 e pectina quando soluções são submetidas a diferentes intervalos de taxas de cisalhamento: 0,1 à 1 s<sup>-1</sup>; 1 à 10 s<sup>-1</sup>; 10 à 100 s<sup>-1</sup>.

Curvas de tensão de cisalhamento por taxa de cisalhamento (FIGURA 5.3a) e de viscosidade por taxa de cisalhamento (FIGURA 5.3b) foram obtidas para diferentes concentrações de T80 (0 a 55% m/m) em soluções de pectina (3% m/m). Todas as composições apresentaram um comportamento de fluido não Newtoniano, mais especificamente pseudoplástico, em que o aumento na taxa de cisalhamento diminui a viscosidade (FIGURA 5.3b), comportamento este já apresentado para soluções pecticas (VITHANAGE et al., 2010).

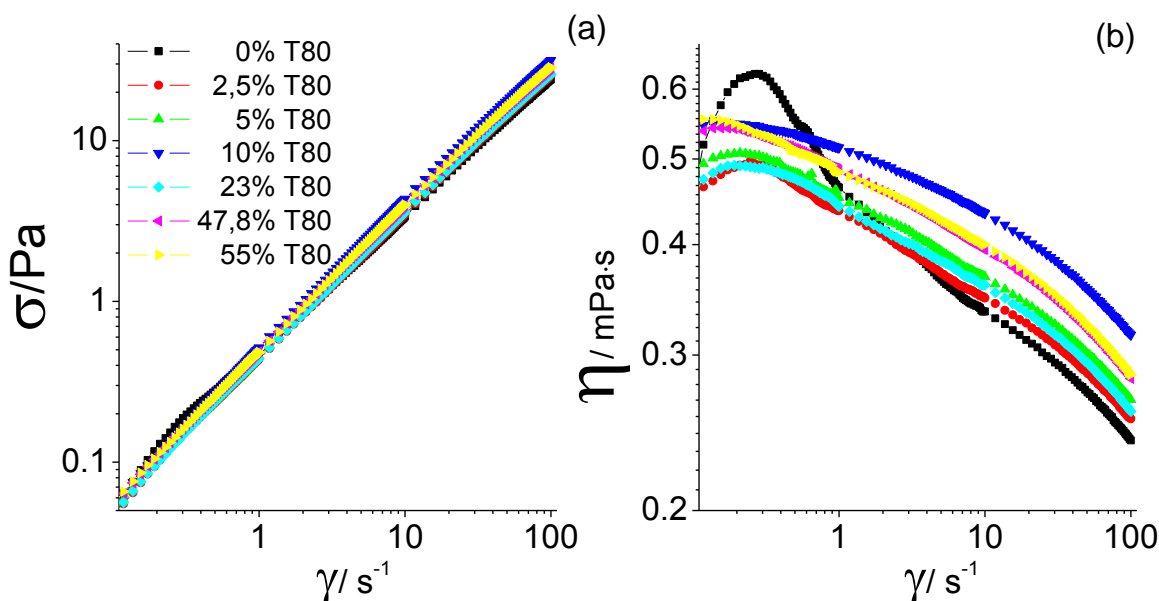


FIGURA 5. 3: aspectos reológicos (a) tensão ( $\sigma$ ) de cisalhamento e (b) viscosidade ( $\eta$ ) de soluções filmogênicas de pectina a 3% com diferentes concentrações de surfactante ( $m_{\text{surfactante}}/m_{\text{pectina}}$ ): (preto) pectina controle; (vermelho) 2,5%; (verde) 5%; (azul) 10%; (ciano) 23,4%; (rosa) 47,8%; (amarelo) 55%.

A adição de T80 nas soluções de pectina não modificou o comportamento pseudoplástico das soluções, contudo alteraram os valores de viscosidade e de tensão de cisalhamento, sendo os maiores valores para concentração de 10% m/m. O aumento nas taxas de cisalhamento tende a alinhar cadeias poliméricas antes diminuindo as interações intermoleculares e reduzindo assim a viscosidade das soluções. Com a adição de T80 até 10% m/m, a viscosidade (definida com a resistência ao fluxo e/ou escoamento) aumentou para as diferentes taxas de cisalhamento, resultado de uma dificuldade maior das cadeias em escoarem umas sobre as outras pela existência de estruturas adicionais (no caso moléculas ou micelas do surfactante – FIGURA 5.2e).

A partir de 10% m/m de T80 há uma diminuição na viscosidade, o que pode ser um indício de saturação das cadeias poliméricas de pectina por micelas e moléculas do surfactante. De acordo com HANSSON & LINDMAN (1996) e KRONBERG et al. (2014), surfactantes não-iônicos podem interagir com polímeros iônicos a partir das porções hidrofóbicas de ambas as moléculas. Na medida em que a quantidade de surfactante aumenta, estas porções tendem a interagir umas com as outras, aumentando a viscosidade do meio. Com maiores proporções de surfactante, estas porções tendem a se afastar, diminuindo assim a viscosidade para valores menores.

De forma identificar esse comportamento para o sistema pectina/T80, outro protocolo de análises reológicas foi realizado, seguindo as proporções volumétricas utilizadas para identificação de interações por espalhamento dinâmico da luz e por UV-vis. Os valores de viscosidade aparente estão apresentados na FIGURA 5.4a.

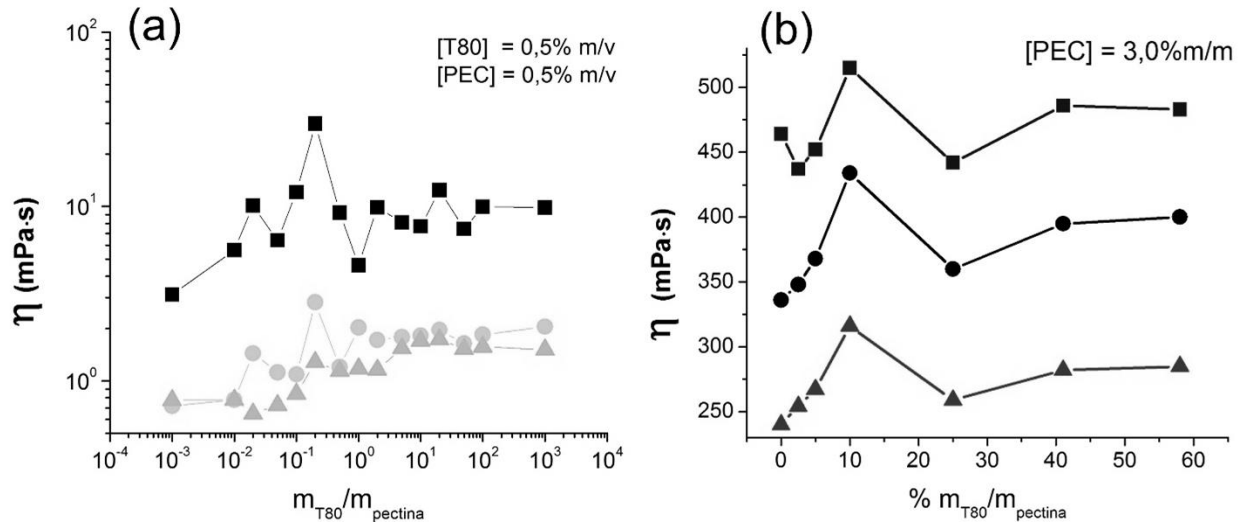


FIGURA 5.4: curvas de viscosidade para três diferentes taxas de cisalhamento ( $\blacksquare$  1,  $\bullet$  10,  $\blacktriangle$   $100 \text{ s}^{-1}$ ) em função (a) de diferentes razões mássicas de surfactante e pectina e, (b) da quantidade de surfactante, esta variando de 0 a 60% em massa.

Em soluções diluídas, as cadeias poliméricas tendem a estar afastas umas das outras, de modo que aumentos na viscosidade podem ser resultado da adição de compostos à cadeia, como moléculas do surfactante ou micelas, sendo menos influenciadas pelas interações das cadeias poliméricas adjacentes quando submetidas a diferentes taxas de cisalhamento. Constata-se, primeiramente, que o comportamento pseudoplástico foi mantido para soluções diluídas (FIGURA 5.4a) e, tanto para diluídas quanto para as suspensões filmogênicas (FIGURA 5.4b), ou seja, àquelas utilizadas para confecção dos filmes. Observa-se que na região de razão  $m_{T80}/m_{pectina}$  igual a 0,1 (10% m/m- FIGURA 5.4a) e em 10% m/m de T80 na solução filmogênica (FIGURA 5.4b), há um aumento na viscosidade das soluções, indicando possíveis interações relacionadas à adição de surfactantes à matriz de pectina. Tais resultados corroboram o que foi observado pela técnica de UV-vis. Estas possíveis interações podem ser do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila da porção hidrofílica do surfactante e os carboxílicos da cadeia polimérica (FIGURA 5.1d) e de natureza hidrofóbica entre as

regiões apolares da molécula do surfactante e das unidade de repetição da cadeia de pectina.

Interações entre pectina e surfactantes CTAB, SDS e TX-100 (catiônico, aniônico e não-iônico, respectivamente) foram avaliadas por reologia e DLS (JOSHI et al., 2016). Pela característica aniônica da pectina, o surfactante CTAB mostrou-se mais eficaz para formar complexos polieletrólíticos com pectina, sendo similar aos resultados obtidos por MCCLEMENTS (2000) pra este mesmo sistema.

Sistemas similares vêm sendo investigados à cerca de interações entre polímeros não iônicos e surfactantes iônios e vice-versa: com pectina e alginato láurico (ASKER et al., 2009); o alginato láurico com diferentes polissacarídeos não iônicos e iônicos (BONNAUD et al., 2010), a hidroxipropil metilcelulose (PATEL & BUMMER, 2017) e a quitosana (PICONE & CUNHA, 2013). No caso do surfactante não-iônico Tx-100, verificou-se que o aumento na concentração deste gerou um aumento das interações hidrofóbicas (ou apolares) com as regiões hidrofóbicas da pectina, evidenciado pelo aumento na distribuição de partículas formadas por moléculas de pectina e do surfactante (JOSHI et al., 2016).

Ensaio reológicos posteriores foram realizados para as soluções de pectina incorporadas com NE/alecrim produzidas por MF a 10 ciclos com diferentes valores de RSO. Os aspectos reológicos estão apresentados na FIGURA 5.5. O comportamento pseudoplástico das soluções não se modificou. Contudo, ocorreu uma diminuição na viscosidade com a adição de NE/alecrim em que a quantidade de surfactante é inferior à de OE (RSO 0,5), com relação à pectina controle. Isso indica que as nanogotas e o OE remanescente (que não foi recoberto com surfactante) conforme a FIGURA 4.12 atuaram de forma a diminuir as forças intermoleculares entre as cadeias da pectina quando estas foram submetidas a diferentes taxas de cisalhamento. Com o valor de RSO igual maior que 1,0, o aumento da viscosidade pode, novamente, estar relacionado à saturação das cadeias pelo surfactante, tendo em vista que há uma quantidade maior de surfactante do que a de OE. Para ORTEGA-TORO et al. (2014), os aumentos na viscosidade e na tensão de cisalhamento podem estar relacionados ao efeito de resistência ao fluxo ocasionado por aglomerados dispersos na matriz. Tal comportamento pode ser observado para as soluções de pectina acrescidas de NE/alecrim. O aumento nos valores de RSO de 0,5 para 2,0, pode ter aumentado a

quantidade de aglomerados tanto de gotas de óleo, quanto de micelas de surfactante, sendo estas opostas ao fluxo e, conseqüentemente, aumentando a viscosidade do meio.

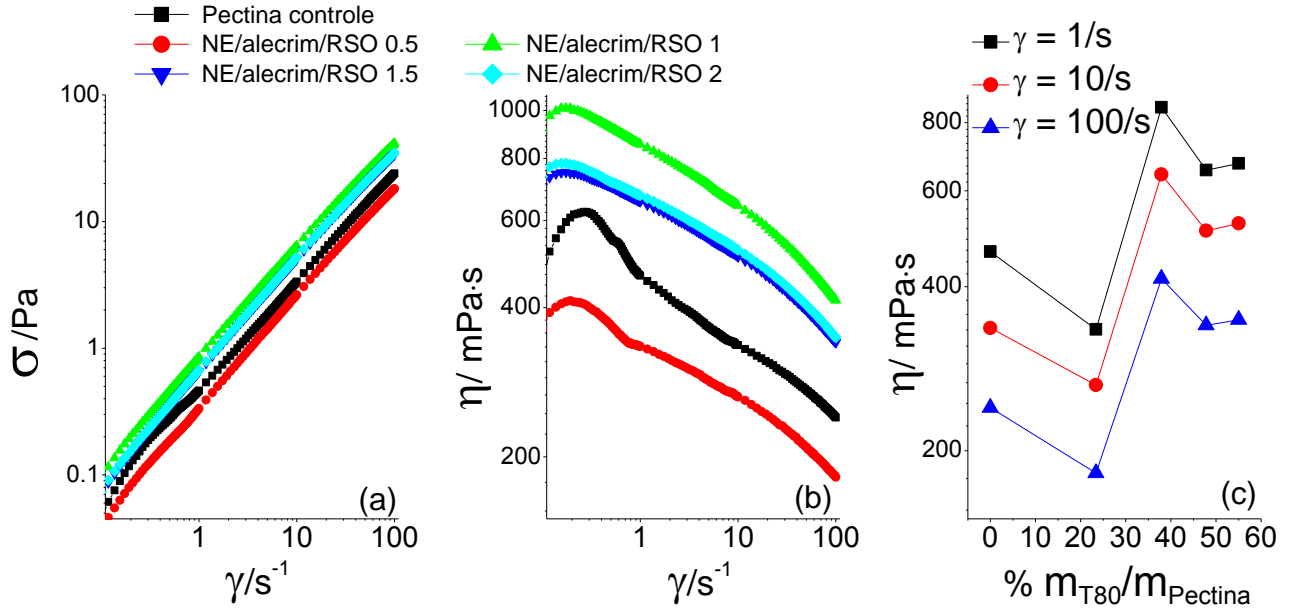


FIGURA 5.5: aspectos reológicos (a) tensão de cisalhamento e (b) viscosidade de soluções filmogênicas de pectina a 3% com NE/alecrim e diferentes razões mássicas de surfactante (RSO). (c) valores de viscosidade para diferentes taxas de cisalhamento (■ 1, ●1, ▲100  $s^{-1}$ )

Diante do exposto, sugerem-se dois mecanismos de interações para o sistema Pectina/T80: (1) grupos carboxílicos das unidades de repetição do ácido galacturônico podem interagir com os grupos hidroxilas da região polar do T80 (FIGURA 5.2 e), por interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio; (2) saturação das porções hidrofóbicas da cadeia polimérica da pectina por micelas e moléculas de surfactante (FIGURA 5.2e(2,3)), de modo a modificar seu emaranhamento em solução, resultando em variações na absorvância a 282 nm e diminuir a viscosidade das soluções a partir de concentrações superiores a 10% m/m. Tal estudo até o momento mostrou-se singular e interessante, pois permite a elaboração de NE e posterior aplicação em matriz de pectina, sem que haja quaisquer restrições à quantidades de surfactante adicionadas e possível formação de complexos polieletrólíticos, os quais inviabilizariam a produção de filmes de pectina.

### **5.3.2 – Aspectos estruturais e morfológicos de filmes de pectina/surfactante e filmes nanocompósitos de pectina/nanoemulsões de alecrim**

Filmes de pectina/T80 e pectina/NE/alecrim foram produzidos e seus aspectos visuais (homogeneidade e transparência) foram analisados e estão apresentados, respectivamente, na FIGURA 5.6 e na FIGURA 5.7.

Em contrapartida ao que foi observado para o sistema em solução, sem restrição das quantidades de surfactante a serem adicionadas à matriz filmogênica, a adição de surfactante em quantidades entre 37 e 55% m/m, com relação à massa de pectina, resultou em aparente formação de fases (FIGURA 5.6l e FIGURA 5.6o), ou seja, descontinuidade ou não homogeneidade na extensão do filme analisada. Tal efeito não foi observado para filmes nanocompósitos de pectina incorporados com NE/alecrim (FIGURA 5.7).

Partindo-se das hipóteses apontadas na FIGURA 5.1, em que a de interação entre as NE e a matriz de pectina pode se dar pela interface pectina/surfactante, esta foi investigada a partir microscopia eletrônica de varredura. Fraturas criogênicas permitem manter a integridade da secção transversal dos compósitos de forma a identificar a conformação dos filmes após a secagem. As concentrações de T80 analisadas foram as mesmas utilizadas para obtenção dos filmes nanocompósitos de pectina e NE/alecrim, para permitir a comparação e um possível entendimento do efeito de cada componente na morfologia dos filmes.

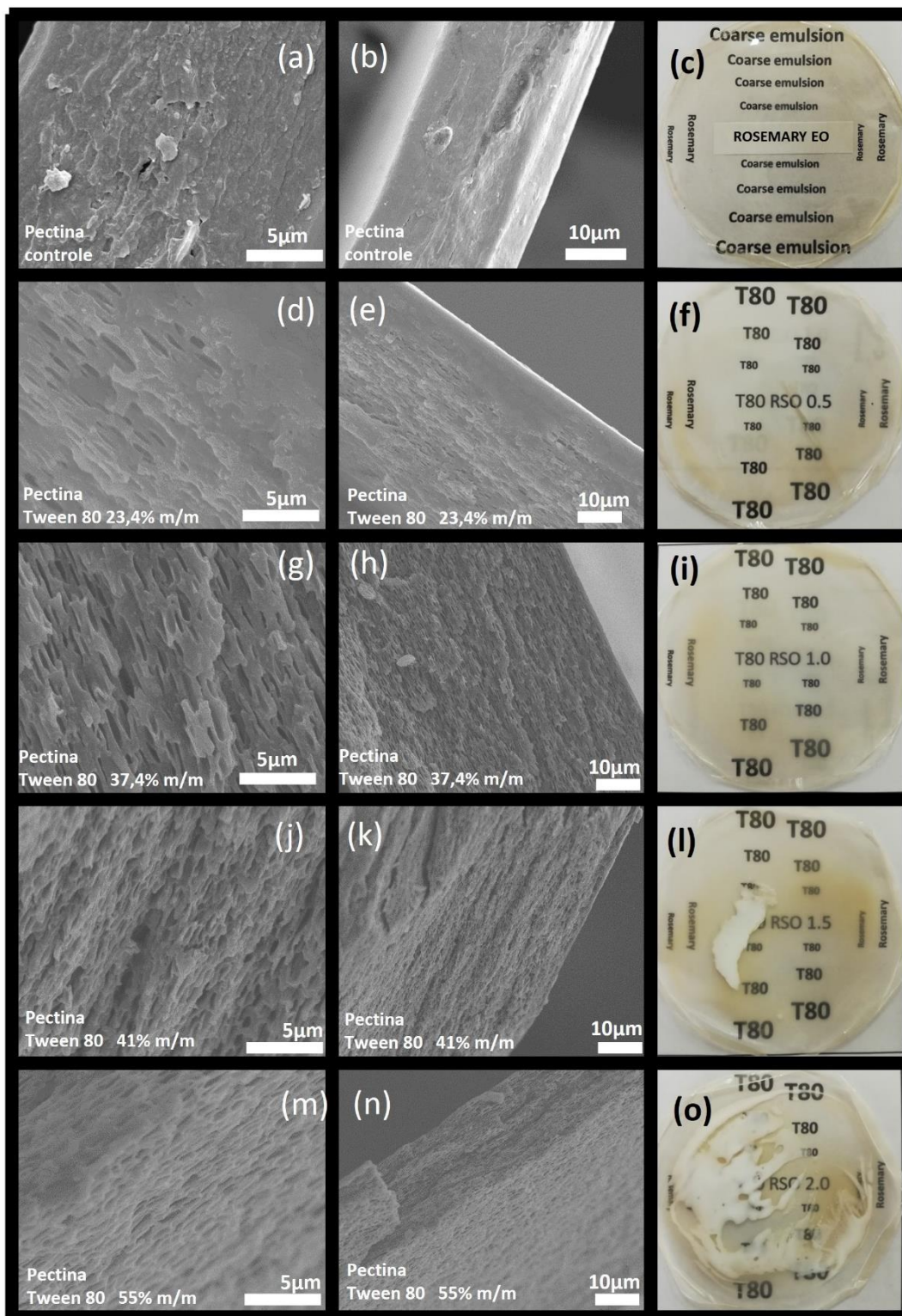


FIGURA 5. 6: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura criogênica da secção transversal e fotografias digitais de filmes de pectina com as seguintes quantidades de surfactante m/m: (a,b,c) controle; (d,e,f) 23,4% m/m; (g,h,i) com 37,1% m/m; (j,k,l) com 41% m/m; (l,m,n) com 55% m/m. Aumento de 3.000 x para a, d, g, j, m; aumento de 1500x para b, e, h, k, n.



Constata-se que a adição de T80 modificou de forma considerável a estrutura dos filmes. Filmes de pectina controle (FIGURA 5.6a e b) mostram-se compactos e, livre de poros ou defeitos. A adição de surfactante resultou no aparecimento de poros em toda a extensão transversal dos filmes, tendo a quantidade de defeitos aumentado com o aumento na concentração do surfactante. Isso fica evidente pelas fotografias digitais dos filmes de pectina adicionados de T80 (FIGURA 5.6). Nelas é possível observar a formação de duas fases, o que indica a imiscibilidade ou saturação da matriz de pectina pela adição de surfactante. Tais imagens divergem da morfologia interna do filme, em que não foram observadas a fases distintas, mas a existência de poros. Uma possível explicação pode ser devido ao fato de que durante a secagem, tenha havido uma maior separação entre cadeias adjacentes da matriz de pectina, resultado da adição de surfactante, contudo como as imagens não permitem inferir tais hipóteses, análises posteriores foram realizadas de forma a corroborar isso.

Os filmes de pectina incorporados com NE/alecrim demonstraram morfologia semelhante a dos filmes apenas com T80 (FIGURA 5.7). Observam-se nos filmes nanocompósitos, indícios de aumento no número de poros, especialmente para valores de RSO iguais a 1,5 e 2,0, indicando que tanto o T80 quanto as nanogotas modificam a morfologia dos filmes. Estruturas semelhantes são apresentadas para filmes de polissacarídeos incorporados com surfactantes, OE e NE de OE, sendo esta porosidade apresentada relacionada, pelos autores, à volatilidade do OE. Devido à baixa solubilidade dos OE na fase contínua, estes tendem a formar esses poros durante a secagem do filme até sua completa evaporação (AHMAD et al., 2012; BENAVIDES et al., 2012; CAO et al., 2018; ESPITIA et al., 2014; TONGNUANCHAN et al., 2013a; TONGNUANCHAN et al., 2013b; TONGNUANCHAN et al., 2012; TONGNUANCHAN et al., 2014). Em complemento a essa possibilidade, BENAVIDES et al. (2012), relatam a formação de uma matriz menos porosa com uma quantidade maior de OE de orégano (de 0,5% para 1,5%*m/m*).



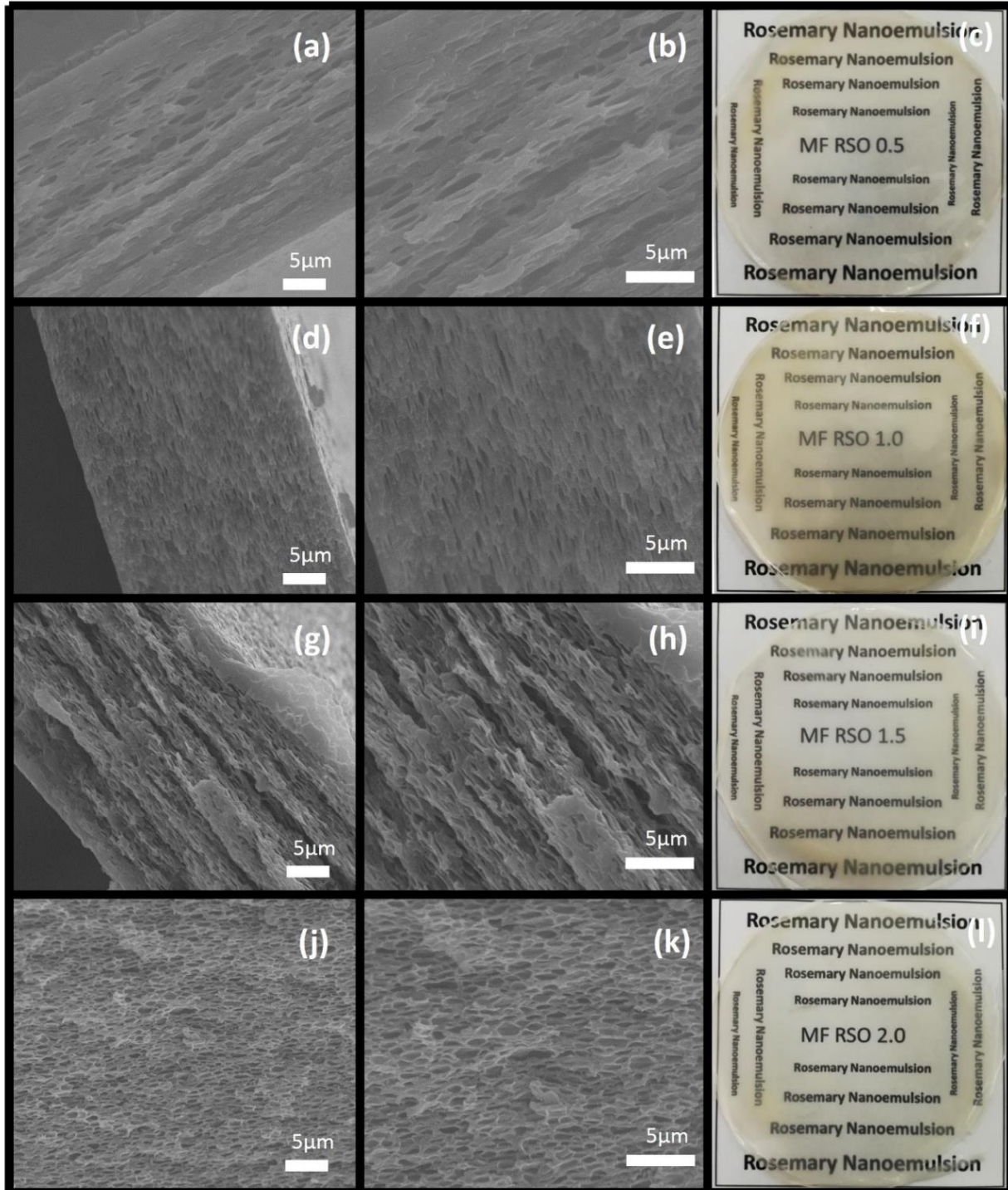


FIGURA 5. 7: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura criogênica da secção transversal e fotografias digitais de filmes de pectina com: (a,b,c) NE/alecrim RSO 0,5; (d,e,f) NE/alecrim RSO 1,0; (g,h,i) NE/alecrim RSO 1,5; (j,k,l) NE/alecrim RSO 2,0, Magnificação de 3,000 x para a, d, g, i; magnificação de 5000x para b, e, f, h,k.

De forma divergente, PÉREZ-CÓRDOBA et al. (2018) obtiveram estruturas contínuas, ausente de poros, ou fissuras provenientes de pequenas bolhas remanescente do processo de secagem, para filmes de gelatina-quitosana adicionados de NE de OE de alho e de cinamaldeído estabilizadas por dois surfactantes (SPAN 60 e Tween 20). Os autores ainda observaram um aumento da rugosidade para os filmes compostos com NE.

TONGNUANCHAN et al. (2014) produziram filmes de gelatina com OE de citronela e de manjerição, cujo efeito do tipo de surfactante (Tween 20, T80 e Lecitina de soja) foi avaliado, mantendo-se a concentração destes constante. Em todos os casos, a adição dos OE ou das emulsões (OE + os diferentes surfactantes) modificou a morfologia interna dos filmes, tornando-a heterogênea, descontínua, com poros. Esta heterogeneidade, segundo os autores, seria resultante da instabilidade das emulsões dos OE e os surfactantes Tween 20 e Tween 80. A lecitina de soja, por outro lado, apresentou morfologia interna com maior grau de homogeneidade, a qual foi relacionada a maior estabilidade das emulsões OE/lecitina de soja.

O efeito de surfactantes lipossolúveis (SPAN 40, 60 e 80) em matriz de amido foi avaliado por ORTEGA-TORO et al. (2014). A adição de SPAN 80, com HLB de 4,3, resultou em microestruturas heterogêneas, consequência do baixo empacotamento das cadeias poliméricas devido à presença de partículas ou aglomerados (micelas de surfactante) insolúveis na fase contínua (aquosa).

Os resultados aqui indicam que a produção de poros pode estar relacionada, não apenas à volatilidade do OE, uma vez que esse manteve-se constante para os nanocompósitos e que a estrutura esponjosa foi observada pra filmes sem OE. No entendimento dos autores, essa compreensão acerca do efeito do surfactante em filmes polissacarídicos ainda é pouco abordada, e os resultados aqui permitem uma nova compreensão do efeito desses na matriz filmogênica.

Espectros de FT-IR foram obtidos para os filmes de pectina incorporados com surfactante e com as NE/alecrim (FIGURA 5.8). Avaliações estruturais de compostos no que compete às suas composições fazem-se necessárias para avaliar interações químicas que ocorreram durante o processo. Para o T80 (FIGURA 5.8a,h) bandas em 2958 e 2921  $\text{cm}^{-1}$  foram identificadas e remetem aos estiramento simétricos e assimétricos dos grupos apolares CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> provenientes da região apolar da

molécula do surfactante (TONGNUANCHAN et al., 2012). Bandas em  $1743\text{ cm}^{-1}$  em  $1110\text{ cm}^{-1}$  são relacionadas aos estiramentos  $\text{-O-C=O}$ . Aqui, as duas bandas em  $1743$  e  $1096\text{ cm}^{-1}$  são identificadas (FIGURA 5.8 a,h) para o espectro do T80. Bandas em  $3400$  e  $3500\text{ m}^{-1}$  são relatadas para presença de grupos OH- (ZHENG et al., 2009).

No caso do OE de alecrim (FIGURA 5.8 g), FERNANDES et al. (2014) apresentam regiões do espectro referentes ao OE: bandas entre  $1078 - 1052\text{ cm}^{-1}$  e  $984 - 1213\text{ cm}^{-1}$ , correlacionam-se, respectivamente, ao estiramentos assimétricos  $\text{-C-O-C}$  e a função epóxi presente no principal composto do OE de alecrim, o eucaliptol (1,8 alfa cineol). No OE alecrim analisado, constatam-se bandas em  $982$ ,  $1310$  e  $1743\text{ cm}^{-1}$ , as quais sugerem a presença de compostos como o eucaliptol. Ainda uma banda em  $2959\text{ cm}^{-1}$  pode ser observada, a qual, assim como o surfactante remete às cadeias de hidrocarbonetos, presentes em lipídios.

Para pectina, bandas em  $1735$  e  $1756\text{ cm}^{-1}$  correspondem à região dos grupos carboxílicos esterificados e ao grupo carbonila, respectivamente. (LOREVICE et al., 2016) Na FIGURA 5.8b,j o grupo carbonila pode ser identificado pela banda em  $1764\text{ cm}^{-1}$ . Ainda é reportado o estiramento do grupo  $\text{-O-CH}_3$  na região de  $2930\text{ cm}^{-1}$ , estrutura relacionada à esterificação do ácido galacturônico, presentes aqui em  $2921\text{ cm}^{-1}$ . De forma complementar, a banda em  $3400\text{ cm}^{-1}$  refere-se aos estiramentos dos grupos hidroxilas presentes em polissacarídeos.

Nos espectros dos compósitos de pectina/T80 (FIGURA 5.8a-f) a banda em  $3400\text{ cm}^{-1}$  da pectina é deslocada para valores entre  $3449$  e  $3487\text{ cm}^{-1}$  à medida que se aumenta a quantidade de surfactante, o que sugere que haja interações tipo ligação de hidrogênio entre as hidroxilas da região hidrofílica do surfactante e a dos monômeros da pectina. Essas mudanças suportam as indagações acerca dos tipos de interações identificados e discutidos para o sistema pectina/T80.

A adição de NE/alecrim deslocou a banda da hidroxila do filme controle de pectina, originalmente em  $3400\text{ cm}^{-1}$ , para valores entre  $3436$  à  $3392\text{ cm}^{-1}$ . Ainda a banda referente aos hidrocarbonetos, em  $2958\text{ cm}^{-1}$ , sugerem que a interface de interação entre NE e pectina é o surfactante T80, convergindo para as discussões apresentadas até então.

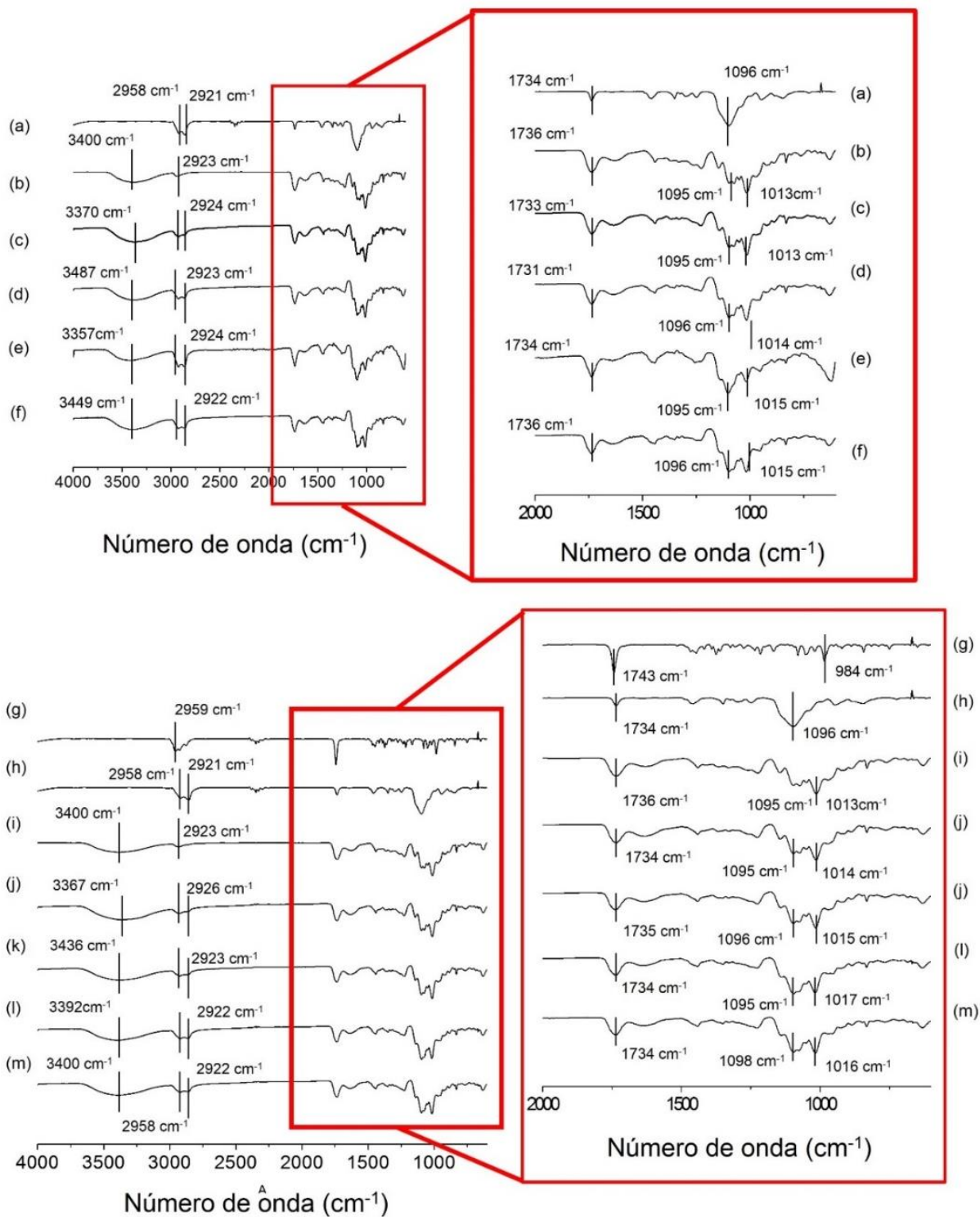


FIGURA 5. 8: Espectros de FT-IR: (a,h) T80; (b,i) filme pectina controle; (c) Pec/T80-4; (d) Pec/T80-5; (e) Pec/T80-6; (f) Pec/T80-8; (g) OE de alecrim; (h) PEC/NE/alecrim RSO0,5; (i) PEC/ NE/alecrim RSO1,0; (j) PEC/ NE/alecrim RSO1,5; (k) PEC/ NE/alecrim RSO2,0.

### 5.3.3 – Propriedades mecânicas

A espessura e os atributos mecânicos de resistência à tração avaliada na tensão máxima, alongação na ruptura e módulo elástico dos filmes de pectina com diferentes concentrações de surfactante T80 ou incorporados com NE/alecrim estão apresentados na TABELA 5.3 e na TABELA 5.4, respectivamente. Curvas representativas de tensão por alongação estão apresentadas no APÊNDICE B.

TABELA 5.3: Espessura, propriedades mecânicas e molhabilidade de filmes de pectinas incorporados com diferentes concentrações do surfactante T80.

Filmes	T80** (%)	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Resistência à tração (MPa)	Elongação na ruptura (%)	Módulo elástico (MPa)	Ângulo de contato ( $^{\circ}$ )
PEC/T80/0	0	25 $\pm$ 6 <sup>c,d</sup>	43 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	12744 $\pm$ 4323 <sup>a</sup>	49 $\pm$ 4 <sup>c,d,e</sup>
PEC/T80/1	5	27 $\pm$ 7 <sup>c,d</sup>	44 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	8806 $\pm$ 3963 <sup>a,b</sup>	48 $\pm$ 4 <sup>c,d,e</sup>
PEC/T80/2	10	17 $\pm$ 2 <sup>d</sup>	24 $\pm$ 3 <sup>a,b,c</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	18750 $\pm$ 13624 <sup>a</sup>	81 $\pm$ 9 <sup>a,b</sup>
PEC/T80/3	20	61 $\pm$ 11 <sup>c</sup>	39 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	8657 $\pm$ 2588 <sup>a,b</sup>	91 $\pm$ 14 <sup>a</sup>
PEC/T80/4	23,4	55 $\pm$ 4 <sup>c</sup>	17 $\pm$ 7 <sup>b,c</sup>	1,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	73 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	57 $\pm$ 6 <sup>b,c,d</sup>
PEC/T80/5	37,9	146 $\pm$ 35 <sup>b</sup>	11 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	1,8 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	41 $\pm$ 9 <sup>d,e</sup>
PEC/T80/6	47,8	54 $\pm$ 8 <sup>c,d</sup>	14 $\pm$ 1 <sup>c,d</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	72 $\pm$ 25 <sup>a,b,c</sup>
PEC/T80/7	55,0	203 $\pm$ 37 <sup>a</sup>	7 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	1,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	6 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	26 $\pm$ 9 <sup>e</sup>

\*A sigla zero indica o filme de pectina controle, ou seja, sem adição de surfactante. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). \*\* Quantidade de surfactante em relação à massa de pectina ( $m_{T80}/m_{pec}$ ).

A espessura dos filmes de pectina mostrou significativa diferença ( $p < 0,05$ ) quando o aumento de surfactante ultrapassou valores de 37,9% m/m. O mesmo foi observado (TABELA 5.4) para os filmes incorporados com NE/alecrim ( $p < 0,05$ ). Para quantidades menores de surfactante (TABELA 5.3) isso não foi significativo ( $p > 0,05$ ).

A adição de NE resultou em uma compactação maior dos filmes do que os que foram produzidos apenas com T80. O incremento na espessura pode estar relacionado com uma maior quantidade de sólidos ocasionada pela adição de T80, as quais diminuem a eficiência das interações entre cadeias adjacentes do polímero e, conseqüentemente, aumentam a espessura dos filmes (MENDES et al., 2019).

As propriedades de resistência à tração avaliada na tensão máxima, alongação na ruptura e módulo elástico são importantes parâmetros avaliados para filmes

de biopolímeros que possam ser aplicados à fabricação de embalagens, por estarem diretamente associados à composição, estrutura química e características microestruturais do material (ESPITIA et al., 2019).

Para valores menores ou iguais à 20% m/m, a resistência à tração não apresentou diferença ( $p > 0,05$ ), acima deste ocorreu um decréscimo considerável de  $(43 \pm 7)$  para  $(7 \pm 3)$  MPa, cerca de 7 vezes menor que o valor do filme controle de pectina. Ensaio reológico (FIGURA 5.3) mostraram um aumento máximo na viscosidade para 10% m/m de T80. Aqui, a resistência à tração manteve-se inalterada ( $p > 0,05$ ) para valores até 20% m/m. Nota-se uma diferença de interações entre os componentes (pectina e surfactante) em solução, e no filme seco. Sugere-se que durante a secagem, moléculas ou micelas do surfactante, que em solução saturavam as cadeias diminuindo suas interações intermoleculares, tendem a se rearranjar de modo a aumentar o número de interações entre as cadeias adjacentes da pectina, resultando assim em uma resistência à tração maior até quantidades de 20% m/m.

A morfologia dos filmes (FIGURA 5.6) indicou que a adição de surfactante na matriz produziu filmes com alta porosidade, semelhantes a esponjas. Os ensaios reológicos, de espalhamento dinâmico da luz e UV-vis mostraram que de alguma forma o surfactante T80 interage com a matriz de pectina, principalmente pelas porções hidrofóbicas. Deslocamentos nas bandas no espectro de FT-IR na região entre 3400 e 3300  $\text{cm}^{-1}$  e entre 2900 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  (FIGURA 5.8) indicaram possíveis interações de ligação de hidrogênio e hidrofóbicas, respectivamente. Essas interações, no entanto, mostram-se de natureza fraca, tendo em vista que não atuaram como agentes de reforço mecânico nos filmes, mesmo para pequenas proporções de T80.

Diminuição nas forças coesivas nos filmes de amido e SPAN 60 e SPAN 40 foram reportadas por ORTEGA-TORO et al. (2014) como causadoras na diminuição nos valores de resistência à tração, quando os surfactantes foram adicionados. A diminuição da coesão das cadeias do polímero correlaciona-se ao efeito plastificante em filmes. Filmes de amido com Tween 20, Span 80 e lecitina de soja foram avaliados quanto às suas propriedades mecânicas por RODRÍGUEZ et al. (2006). Concentrações de 5% m/m de surfactante atuaram de forma sinérgica com o glicerol, aumentando a elongação na ruptura e diminuindo a tensão máxima. O Tween 20, com caráter mais hidrofílico (HLB 16,7), foi o que apresentou o maior efeito plastificante. As curvas de tensão versus

deformação apresentaram valores similares aos encontrados aqui (FIGURA APÊNDICE B).

A alongação na ruptura tanto para os filmes de pectina/T80 (TABELA 5.3) quanto para os filmes de pectina/NE (TABELA 5.4) não sofreram variância ( $p > 0,05$ ) para todos os filmes.

O que se nota é que filmes de pectina com 10% m/m não apresentaram mudança ( $p > 0,05$ ) no módulo elástico, se comparado com filmes de pectina controle (TABELA 5.3). Tais resultados convergem com os encontrados em reologia, DLS e UV-vis, nos quais as possíveis interações pectina/T80 se mostraram mais intensas. No trabalho de ORTEGA-TORO et al. (2014) surfactantes diminuíram a rigidez dos filmes (menores valores de módulo elástico). Contudo, para o SPAN 80, um surfactante mais hidrofóbico, o decréscimo foi menor, consequência do possível aumento na cristalinidade dos filmes de amido, acarretando porções mais rígidas. Resultados similares foram obtidos para (RODRÍGUEZ et al., 2006) em filmes de amido e diferentes concentrações de SPAN 80.

TABELA 5. 4: Espessura, propriedades mecânicas e molhabilidade a água de filmes nanocompósitos de pectina e NE/Alecrim.

Filmes	T80*** (%)	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Resistência à tração (MPa)	Elongação na ruptura (%)	Módulo elástico (MPa)	Ângulo de contato ( $^{\circ}$ )
PEC/T80/0*	0	$26 \pm 6^c$	$43 \pm 7^a$	$1,3 \pm 0,2^{a,b}$	$12744 \pm 4323^a$	$49 \pm 5^{a,b}$
PEC/NE/alecrim RSO 0,5**	23,4	$38 \pm 8^{b,c}$	$20 \pm 5^b$	$0,7 \pm 0,4^b$	$101 \pm 15^b$	$55 \pm 6^a$
PEC/NE/alecrim RSO 1,0	37,9	$67 \pm 16^a$	$14 \pm 4^{b,c}$	$1,1 \pm 0,3^{a,b}$	$32 \pm 23^b$	$43 \pm 9^b$
PEC/NE/alecrim RSO 1,5	47,8	$49 \pm 8^{a,b}$	$10 \pm 3^c$	$1,7 \pm 0,4^a$	$5 \pm 2^b$	$29 \pm 3^c$
PEC/NE/alecrim RSO 2,0	55,0	$55 \pm 6^{a,b}$	$9 \pm 3^c$	$1,6 \pm 0,4^{a,b}$	$17 \pm 9^b$	$31 \pm 6^c$

\*a sigla zero indica o filme de pectina controle, ou seja, sem adição de surfactante\*\* razão mássica surfactante/OE e concentração de OE alecrim constante de 37,9 % ( $m_{OE}/m_{pec}$ ) para todos os filmes NE/alecrim. \*\*\*Quantidade de surfactante em relação à massa de pectina ( $m_{T80}/m_{pec}$ ). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes em uma mesma coluna ( $p < 0,05$ ).

Altas concentrações de surfactante resultaram em um decréscimo do módulo elásticos de filmes de pectina ( $p < 0,05$ ). A adição de 23,4% m/m de T80 na matriz



de pectina reduziu de 12 GPa para 70 MPa ( $p < 0,05$ ). O mesmo se observa para os filmes adicionados de NE. Tanto o surfactante, quanto as NE tornaram o material menos rígido, diminuindo módulo elástico ( $p < 0,05$ ).

A adição de NE em matrizes de biopolímeros apresenta resultados diversos quanto ao efeito nas propriedades mecânicas: plastificante ou anti-plastificante (ESPITIA et al., 2019); de modo que os tipos de OE, surfactante e matriz mostram-se importantes para prever os efeitos esperados (ATARES & CHIRALT, 2016).

NE/alecrim quando adicionadas à matriz diminuíram a resistência à tração para valores próximos a 9 MPa. Nesse caso, a adição de NE resultou um ganho nos valores de tensão máxima, se comparados os sistemas com (TABELA 5.4) e sem surfactante (TABELA 5.3). Os valores de alongação na ruptura não foram significativamente ( $p > 0,05$ ) diferentes dos obtidos para os filmes controle de pectina (TABELA 5.4). Nota-se uma diferença ( $p < 0,05$ ) no módulo elástico dos filmes incorporados com NE/Alecrim. As NE tornaram os filmes mais flexíveis se comparados com o controle (TABELA 5.4) ou com os filmes apenas com surfactante (TABELA 5.3).

De acordo com ATARES & CHIRALT (2016), lipídeos induzem a formação de matrizes heterogêneas e uma estrutura descontínua, as quais dependem da característica da fase oleosa. Segundo os autores, lipídeos tendem a substituir interações entre cadeias poliméricas laterais ou adjacentes por interações mais fracas do tipo polímero-óleo. Tal interpretação é congruente aos resultados obtidos aqui.

Sem considerar o efeito do surfactante, já abordado, o OE de alecrim diminuiu a tensão máxima e o módulo elástico, e pode estar relacionado à diminuição na coesão entre as cadeias da pectina. Contudo, se comparado com os filmes de pectina/T80 com a mesma quantidade de surfactante que os filmes com NE, o OE incrementou os valores de tensão máxima. Isso indica que o OE pode interagir com a matriz tanto quanto o surfactante. O efeito anti-plastificante já foi apresentado em trabalhos anteriores LÓPEZ-MATA et al. (2018), OTONI et al. (2014) e BILBAO-SÁINZ et al. (2010). Resultados contrastantes são encontrados na literatura acerca dos efeitos plastificantes para adição de NE em matriz de biopolímeros (ATARES & CHIRALT, 2016; PÉREZ-CÓRDOBA et al., 2018).

Sendo assim, pode-se inferir que adição de NE/alecrim possui um efeito somatório das características do surfactante e do OE de alecrim nas propriedades



mecânicas, sendo o primeiro atuando como plastificante, enquanto o OE atua reforçando o filme. O balbuciar dos dois efeitos ainda resulta em filmes mecanicamente inferiores, se comparados com os filmes de pectina controle.

#### **5.3.4 – Molhabilidade à água**

As molhabilidades de filmes de pectina com T80 e dos filmes de pectina e NE/alecrim estão apresentadas na TABELAS 5.3 e na TABELA 5.4, respectivamente. O ângulo de contato mensura a afinidade do solvente com a superfície a qual foi adicionado. Tratando-se de água, valores acima de 90° indicam superfícies hidrofóbicas, enquanto valores abaixo indicam superfícies hidrofílicas (ORTEGA-TORO et al., 2014). Adicionado a isso, avaliou-se o efeito da quantidade de surfactante na afinidade da superfície dos filmes com o solvente água, uma vez que este é uma molécula anfifílica, ou seja, com regiões polares e apolares, que podem se orientar de formas distintas em contato com diferentes solventes.

O T80 modificou a afinidade da superfície de modo que para concentrações entre 10 e 20% m/m houve diferença ( $p < 0,05$ ) para os filmes controle de pectina. Os valores sofreram um incremento de  $49 \pm 4^\circ$  para  $90 \pm 14^\circ$  (TABELA 5.3), indicando assim uma superfície hidrofóbica para os filmes acrescidos de surfactante. Entretanto, a adição de quantidade maiores de surfactante diminuiu os valores para próximos do filme controle, não havendo diferença ( $p > 0,05$ ) entre eles. Em contrapartida, a adição de um componente hidrofóbico, o OE de alecrim, à composição dos filmes não reduziu a hidrofobicidade destes (TABELA 5.4). Todos os filmes contendo OE de alecrim continham a mesma quantidade de OE em relação à massa de pectina: 37,9% m/m. Constata-se que, para as composições utilizadas, mesmo aquelas em que há menos surfactante do que OE (RSO 0,5), o componente hidrofóbico não tornou o filme menos hidrofílico. Um análise complementar dos resultados permite verificar que as NE/alecrim com valores de RSO 0,5 e 1,0, ou seja, com concentração de surfactante iguais à 23,4 e 37,9% m/m, respectivamente, não mostraram variação significativa ( $p > 0,05$ ) no valor do ângulo com relação ao filme controle. Já para NE com RSO 1,5 e RSO 2,0, os valores diminuem ( $p < 0,05$ ), tornado o filme mais hidrofílico.

Não obstante, a adição de compostos hidrofóbicos vem sendo reportada como alternativa para diminuir a afinidade de polissacarídeos à água (CAO et al., 2018). Filmes inovadores foram produzidos por MANRICH et al. (2017), cuja adição do biopoliéster lipossolúvel extraído da pele do tomate, a cutina, aumentou ( $p < 0,05$ ) os valores do ângulo de contato da água com a superfície dos filmes, não mostrando diferença apenas para variações de cutina na composição (25 e 50% m/m) ou a região de contato da superfície do filme (substrato ou ar). ALEXANDRE et al. (2016) obtiveram filmes de gelatina incorporados com NE de OE de gengibre e/ou argila montmorillonita e verificaram-se um acréscimo ( $p < 0,05$ ) com adição de 5% de OE à composição: valores de  $(104 \pm 1)^\circ$  (filme controle de gelatina) para  $(124 \pm 3,5)^\circ$ . Filmes de gelatina incorporados com glicerol e NE/óleo\_soja/rutina apresentaram um decréscimo nos ângulos de contato da água com a superfície do filme que secou em contato com o ar. Os autores indicaram compreensões acerca da influência da NE incorporada sobre o ângulo de contato: (1) a adição de glicerol, um plastificante, diminui as interações polímero-polímero, e o excedente migra para a superfície, aumentando a hidrofiliabilidade do filme; (2) a hidrofobicidade esperada pela adição da fase lipofílica (óleo de soja) não foi eficaz, tendo em vista que o surfactante T80 intermedia a interface óleo/água dificultando o efeito hidrofóbico nas mediações da superfície do filme.

A hidrofobicidade maior para filmes entre 10% e 20% m/m convergem para a direção das discussões anteriores (DLS, UV-vis, reologia e propriedades mecânicas) em que há uma quantidade específica para melhoria ou mudanças nas propriedades físico-químicas dos filmes de pectina. A porosidade visualizada nas imagens de microscopia (FIGURA 5.6 e FIGURA 5.7) não interferiu na hidrofobicidade dos filmes. Nessa vertente, os valores dos ângulos das superfícies inferior e superior do filme, ou seja da secagem em contato com o substrato (inferior) e em contato com o ambiente (superior) não mostraram (dados não inseridos no texto) diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Assim sugere-se que as características hidrofóbicas convergem para a composição química do material e não para as variáveis de processamento. Os resultados sugerem que, nesta concentração o arranjo entre a cadeia polimérica da pectina e das micelas e/ou moléculas do surfactante esteja feito de forma a diminuir a polaridade ou hidrofiliabilidade da superfície do filme.

### 5.3.4 – Propriedades Térmicas

Os perfis de degradação térmica dos filmes de pectina adicionados de surfactante e incorporados com NE/alecrim estão apresentados, respectivamente na FIGURA 5.9 e na FIGURA 5.10. O perfil de degradação do T80 (FIGURA 5.9 – a, linha preta) diverge dos filmes de pectina acrescidos deste composto, apresentando duas temperaturas de degradação: 375°C e 416°C (FIGURA 5.9b).

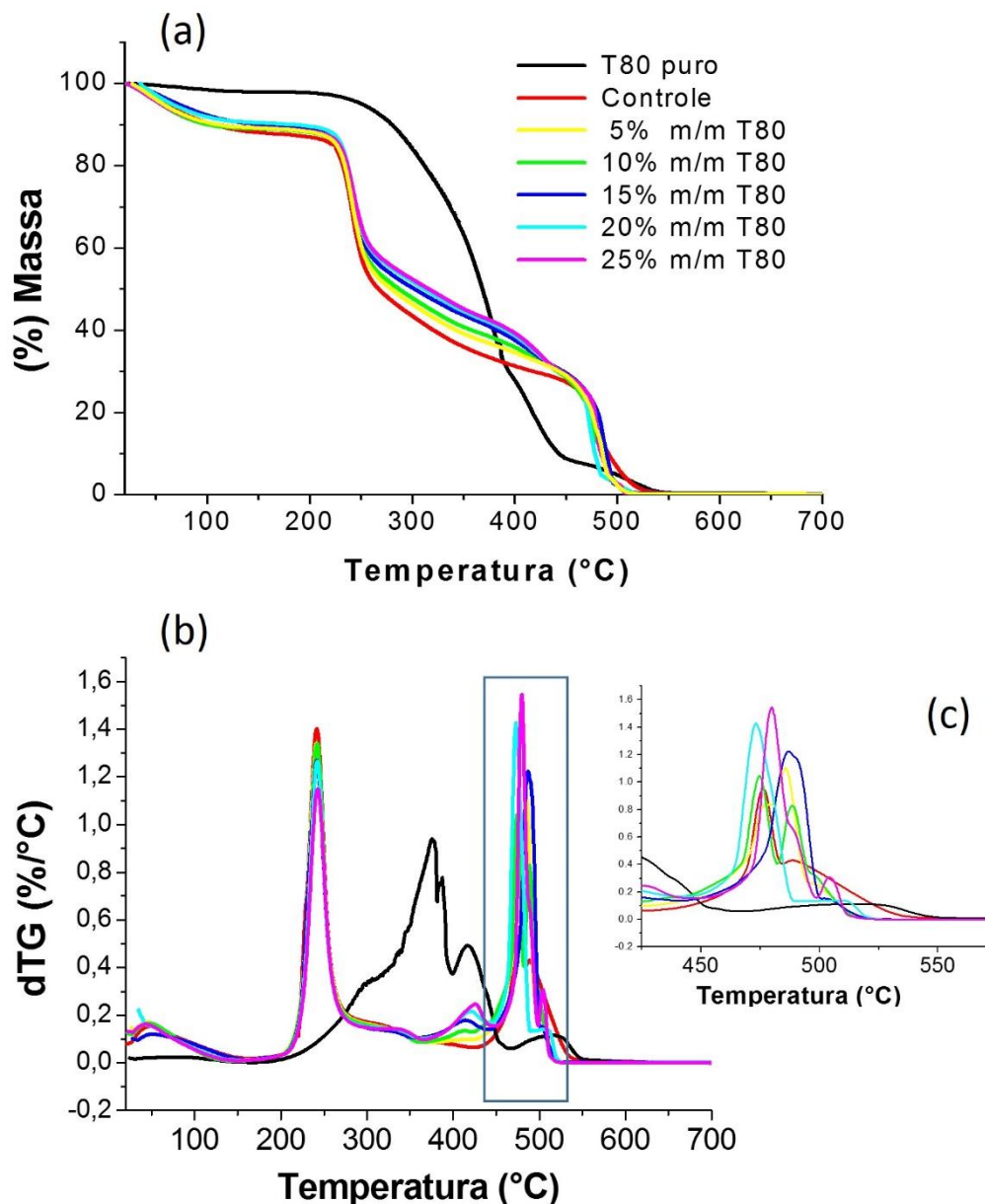


FIGURA 5. 9: (a) curvas termogravimétricas e (b) termogravimétrica derivada de filmes de pectina controle (vermelho), T80 bulk (preto) e filmes de pectina/T80 (m/m): (amarelo) 5%; (verde) 10%; (azul) 15%; (ciano) 20%; (magenta) 25%, (c) curva termogravimétrica derivada ampliada na região entre 425 e 575°C.

O filme de pectina controle apresenta duas temperaturas características de degradação, 241 °C e 476°C, características de polissacarídeos. A degradação destes materiais pode comumente ser separada em três estágios: desidratação do material (até 100 °C), seguido pela degradação térmica dos sacarídeos (230°C) e, por fim, acima de 230 °C, degradação do restante da amostra em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O quando em atmosfera oxidativa (MARTELLI et al., 2013).

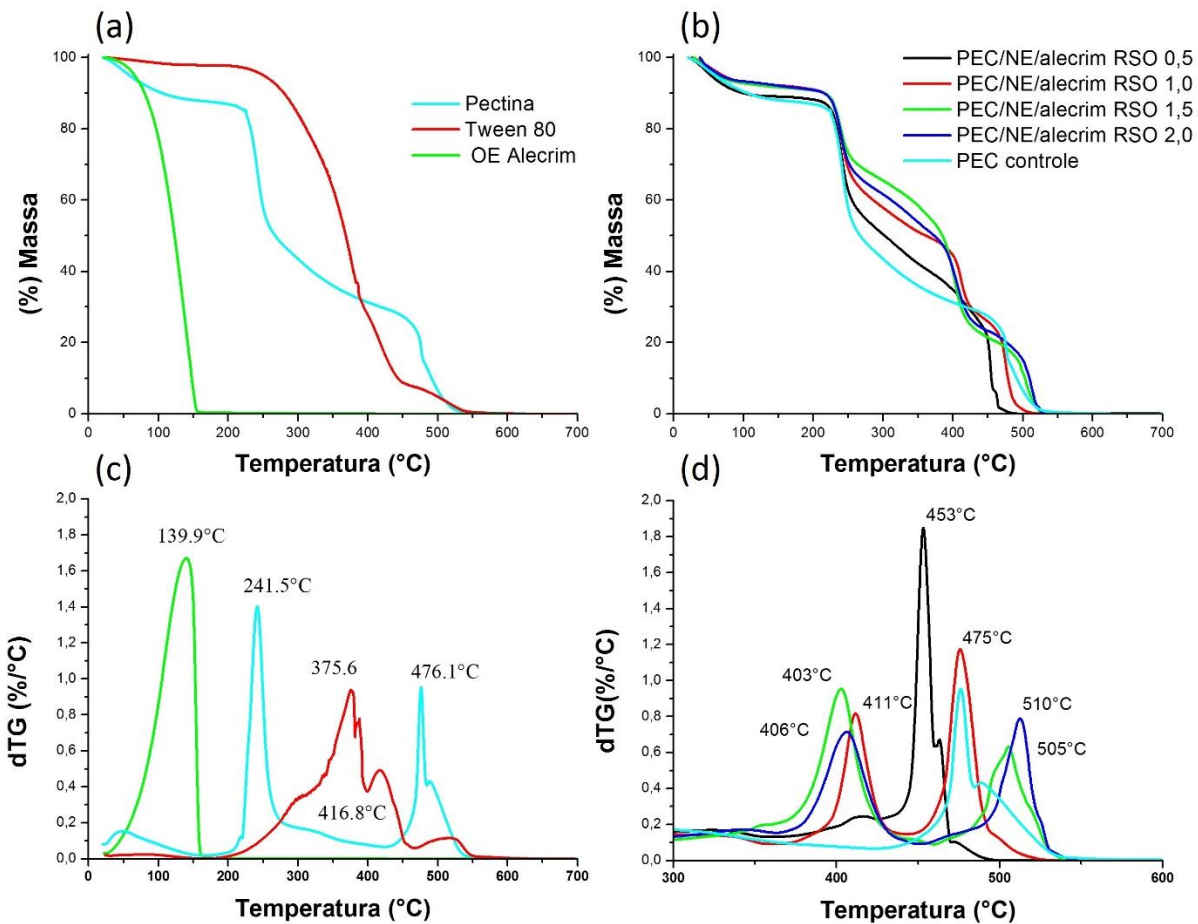


FIGURA 5. 10: Esquerda: (a) curvas termogravimétricas e termogravimétrica derivada (c) de pectina (ciano), T80 (vermelha), OE de alecrim (verde). Direita: (b) curvas termogravimétricas e (d) termogravimétricas derivadas de filmes de pectina (PEC) com NE/Alecrim microfluidizadas (MF) com diferentes razões (RSO): 0,5; 1; 1,5; 2.

A adição de surfactante na matriz polimérica não modificou o perfil de degradação da pectina (FIGURA 5.9a), mesmo para altas concentrações de surfactante. A primeira temperatura de degradação da pectina (241 °C) se mantém constante para todas as composições. O que se nota é um ligeiro deslocamento da inflexão das curvas

próximo à temperatura de 300 °C, e verificada na curva da derivada de degradação (FIGURA 5.9b), indicando eventos de perda de massa por volta de 300 °C, sendo assim abaixo dos 375 °C para o T80 puro. As diferenças foram observadas para temperaturas entre 400 e 600°C (FIGURA 5.9c). A pectina (linha vermelha – FIGURA 5.9c) apresenta um pico de degradação térmica por volta de 460°C, próximo ao filme controle, indicando que o T80 quando adicionado pode diminuir temperatura de degradação dos sacarídeos e outros compostos presentes na pectina. Para 5 e 10% m/m de pectina, evidencia-se a presença de dois picos (475 e 480 °C), os quais podem estar relacionados às degradações dos remanescentes tanto do T80 quanto da pectina. Acima de 15% observa-se apenas uma temperatura de degradação para todo o composto, por volta de 480°C.

O surfactante T80 não modificou a temperatura inicial de degradação da pectina, indicando que sua adição, mesmo para altas concentrações, como as abordadas aqui, a matriz filmogênica mantém-se estável a temperaturas até 240 °C. A quantidade de surfactante resultou em diferentes temperaturas na segunda etapa de degradação, na degradação dos remanescente em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Nesse caso, as modificações podem ser ocasionadas pelo aumento da quantidade de sólidos, de modo a requerer uma maior quantidade de energia e, conseqüentemente, temperatura ao sistema.

As curvas de degradação do T80, OE de alecrim e pectina estão organizadas na FIGURA 5.10a. O OE de Alecrim apresentou um único perfil de degradação térmica, com temperatura de degradação muito abaixo dos outros componentes pectina e T80 e valor de 139 °C (FIGURA 5.10c). A adição de NE/alecrim à matriz de pectina foi avaliada quanto à sua estabilidade térmica, e o perfil de degradação foi ligeiramente modificado pela adição das nanoestruturas. Nenhuma temperatura relacionada à evaporação do OE foi observada. Para todas as composições, o OE foi mantido constante a 37% m/m para massa de pectina. Durante o aquecimento, não há evidência da evaporação de compostos ou perda de massa em temperaturas próximas à de degradação do OE, cerca de 140 °C. Sugere-se que a matriz de pectina atue como uma manta térmica, impedindo a evaporação do OE presente em sua estrutura, a qual apresentou poros em toda sua extensão (FIGURA 5.6 e 5.7) e que foram relacionados à presença de OE e do surfactante.

A primeira temperatura de degradação novamente não se modificou para a pectina, mesmo para os filmes adicionados com NE. As variações evidentes se localizaram na segunda temperatura de degradação. O valor de RSO 0,5 deslocou a segunda temperatura para 452 °C (pectina controle foi de 475 °C) enquanto o valor de RSO 2,0 aumentou a temperatura para 512 °C. NE/alecrim com quantidades inferiores de surfactante RSO 0,5 demonstraram um efeito mais oxidativo que os maiores valores. Isso indica que, por possuir mais OE do que surfactante, este pode interagir com a matriz de pectina, facilitando o processo de degradação. Para quantidades superiores de RSO, suporta-se que os deslocamentos sejam resultados do aumento na quantidade de sólidos, haja vista que a concentração do surfactante aumenta para valores próximos de a 55% m/m para a massa de pectina.

### **5.3.5 – Propriedades Antioxidantes**

As propriedades antioxidantes do OE de alecrim, com a adição de surfactante, bem como da incorporação nos filmes de pectina, foram avaliadas de modo a verificar se o surfactante pode atuar modificando as propriedades provenientes do OE de alecrim. Os resultados estão apresentados na TABELA 5.5, a qual apresenta os valores de inibição percentual (IP), o qual se refere à quantidade de DPPH que reagiu com compostos do OE, e dos valores de EC 50% (capacidade do OE de reduzir à metade a concentração do DPPH). O reagente Trolox® foi utilizado como composto padrão para análise comparativa da efetividade do OE de alecrim.

Diferentes mecanismos são apresentados para a compreensão das atividades antioxidantes (MAISANABA et al., 2017). No caso dos OE, as provenientes da capacidade de eliminação de radicais livre tem se mostrado o método mais reportado. Segundo AMORATI et al. (2013) os antioxidantes podem atuar como inibidores do ataque inicial do radical ou moléculas, que o autor denomina “antioxidantes de quebra de cadeia”, os quais podem atuar na captura dos radicais já existentes no processo oxidativo e diminuir esta taxa de oxidação ou saná-la por completo.

A atividade antioxidante de OE está relacionada à presença de compostos fenólicos dispersos ou terpênicos no óleo (ATARES & CHIRALT, 2016; BARATTA et al.,

1998; GACHKAR et al., 2007), sendo para o OE de alecrim relacionada à existência de compostos como 1,8 cineol,  $\alpha$ -pirene, cânfora e geraniol (WANG et al., 2008).

TABELA 5. 5: Valores de inibição percentual (IP) e do EC 50% do OE de alecrim sem e acrescido de diferentes concentrações de T80, reagente padrão comparativo Trolox®; de filmes de pectina incorporados com NE de OE de alecrim obtidas por MF.

Nome	T80		RSO	IP	Atividade Antioxidante	
	% m/v	% m/m pectina			EC 50 %	% m/v
Trolox	-	-	-	95,57 $\pm$ 1,01a	0,02 $\pm$ 0,01b	-
	-	-	-	83,71 $\pm$ 0,35c,d	2,93 $\pm$ 0,06a	-
OE alecrim	2,26	-	0,5	82,16 $\pm$ 0,64d	3,01 $\pm$ 0,01a	-
	4,43	-	1,0	85,49 $\pm$ 0,15b,c	2,50 $\pm$ 0,59a	-
	6,51	-	1,5	85,34 $\pm$ 0,05b,c	2,82 $\pm$ 0,05a	--
	8,51	-	2,0	85,88 $\pm$ 0,80b	2,91 $\pm$ 0,08a	-
Pectina/NE alecrim	-	23,4	0,5	60,45 $\pm$ 2,72a	-	46,59 $\pm$ 6,75a,b
	-	37,9	1,0	57,73 $\pm$ 2,39a,b	-	43,27 $\pm$ 1,64b
	-	47,9	1,5	51,00 $\pm$ 6,06a,b	-	54,97 $\pm$ 5,07a
	-	55,0	2,0	49,37 $\pm$ 3,96b	-	43,68 $\pm$ 0,61b

*T80: Surfactante polisorbato 80. RSO: razão mássica surfactante e óleo essencial. IP: inibição percentual*

O OE de alecrim apresentou valores de IP entre 82,71 e 85,88%, não sendo verificada diferença ( $p > 0,05$ ) quando o surfactante foi adicionado ou com o aumento de concentração do surfactante ( $p > 0,05$ ). O surfactante, nas concentrações apresentadas na TABELA 5.5, não apresentou qualquer variação ( $p > 0,05$ ) na concentração inicial do DPPH e, portanto, para o escopo desse estudo não foram considerados como moléculas passíveis a propriedades antioxidantes. No comparativo com o Trolox®, seus valores foram inferiores ( $p < 0,05$ ), contudo interessantes à concentração de 5% m/v, indicando que a quantidade escolhida de OE (item 4.3.1) em solução é suficiente para apresentar boas propriedades antioxidantes. Os valores de EC 50% mostraram nesse caso a

efetividade do OE em reduzir 50% da quantidade de DPPH com cerca de metade da concentração utilizada de OE. Se comparado com um reagente padrão, a quantidade de OE necessária para reagir com 50% do DPPH presente foi cerca de 100 vezes maior ( $p < 0,05$ ) que o Trolox®, e não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao aumento de concentração do surfactante, demonstrando assim que para efeitos de propriedades ativas do OE, o surfactante não atua de modo a interferir na atividade antioxidante.

O mesmo foi observado para os filmes de pectina incorporados com NE/alecrim com diferentes concentrações de surfactante T80. Os filmes apresentaram atividade antioxidante para todas as formulações, como já foi reportado por GÓMEZ-ESTACA et al. (2009). Não houve variação significativa ( $p > 0,05$ ) para os valores tanto de IP quanto de EC 50% para os filmes analisados (TABELA 5.5). Cabe salientar que os filmes de pectina controle e pectina/T80 não apresentaram resposta à adição de DPPH (variação da concentração de DPPH inicial não variou,  $p > 0,05$ ). Isso demonstra que, para a atividade antioxidante, o surfactante tanto em solução quanto incorporado aos filmes não interferiu. Os menores valores de IP e EC 50% para os filmes, se comparados com as dispersões do OE, justificam-se pelos seguintes: meio de análise (hidrofílico e lipofílico) e interações entre os componentes dos filmes, uma vez que ambos podem dificultar o processo de difusão do OE, diminuindo sua reação com o DPPH (MAISANABA et al., 2017).

### 5.3.7 – Propriedades Antimicrobianas

A atividade antimicrobiana dos filmes de pectina adicionados de NE de OE de alecrim foi avaliada por halo de inibição por difusão em ágar, de modo a identificar a influência da quantidade de surfactante na inibição do crescimento de duas culturas de bactérias *E. coli* e *S. aureus*, uma Gram-negativa e outra Gram-positiva, respectivamente. A FIGURA 5.11 e a FIGURA 5.12 ilustram o ensaio realizado.



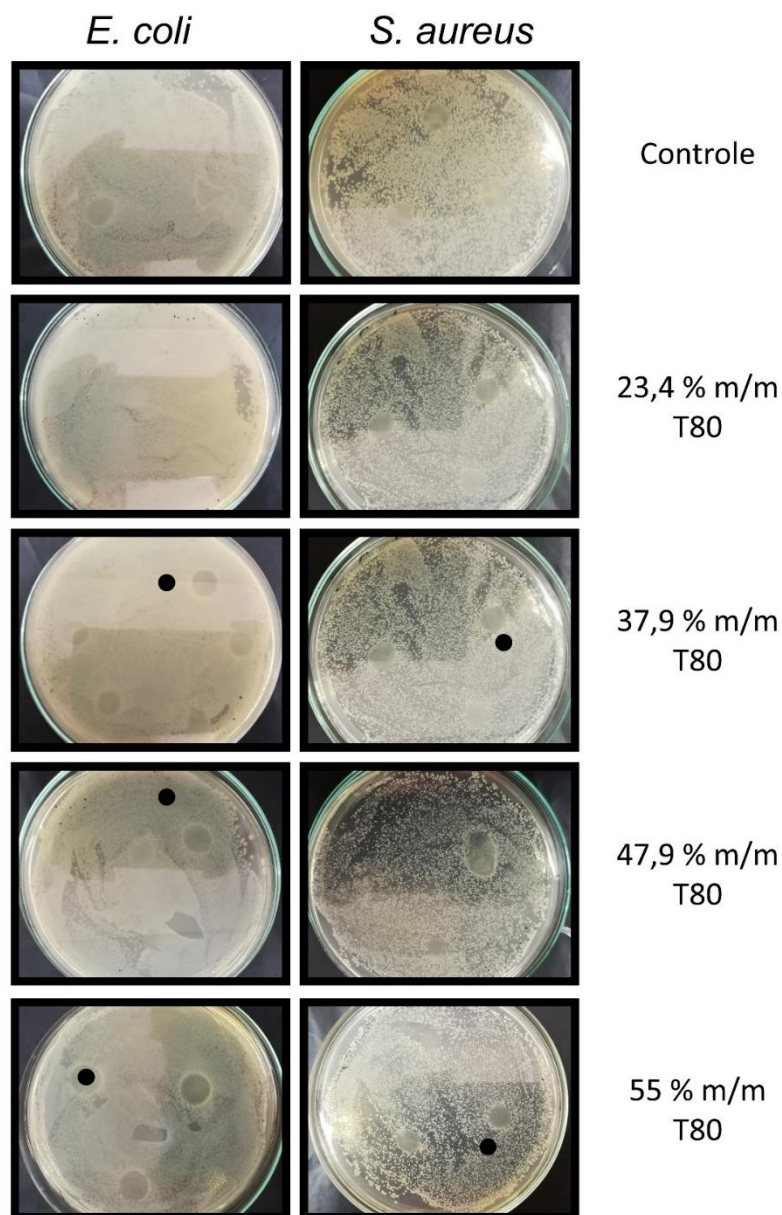


FIGURA 5.11: Fotografias digitais dos filmes de pectina com T80 em diferentes concentrações quando submetidos ao teste antimicrobiano de halo de inibição por difusão em ágar. Coluna da esquerda indica culturas *E. coli* e coluna da esquerda indicam culturas da *S. aureus*. Círculo preto indica tamanho real do filme colocado no início do ensaio.

Constatou-se que, para todos os casos, a inibição foi inexistente ou mínima. Para os filmes de pectina controle (FIGURA 5.11), como esperado, não é possível identificar qualquer filme após o ensaio. À medida que a quantidade de surfactante aumenta, verifica-se pequenos círculos nos quais, em alguns casos, não há crescimento bacteriano. Esse comportamento se repete tanto para bactérias Gram-positivas, quanto

Gram-negativas. Com a concentração de 55% m/m (FIGURA 5.11), há uma região de cuja cultura parece não ter se proliferado como nas outras regiões sem o filme. Comparando com o filme controle, esse comportamento pode ser relacionado ao surfactante, que atuou para dificultar o crescimento dos micro-organismos na região onde foi depositado o filme.

O mesmo comportamento foi verificado para os filmes adicionados de NE/alecrim (FIGURA 5.12). Essas regiões foram ampliadas para facilitar a visualização. Não foi verificado qualquer halo de inibição. Uma vez que tanto para os filmes de pectina/T80 e pectina/NE possuem as quantidades de surfactante, esperava-se identificar o efeito do OE para o caso dos filmes nanocompósitos (FIGURA 5.12) uma vez que cerca de 37% de OE de alecrim foi adicionado à composição. O que verificou-se foi o mesmo comportamento para os filmes de pectina/T80, indicando que o sistema pectina/NE dificultou a atuação do OE de alecrim no processo de inibição.

A aparente falta de inibição do crescimento das duas culturas observado para os filmes com as NE/alecrim destoam dos resultados obtidos para concentração mínima inibitória, obtidas no item 4.3.1. Permite, contudo, indagar a atuação do surfactante barreira às propriedades ativas do OE nos filmes.

Óleos essenciais como o de alecrim são reconhecidos como possuidores de atividade antimicrobiana, a qual é relacionada à presença de compostos terpênicos e fenólicos (ATARES & CHIRALT, 2016; GAMAGE et al., 2009; MAISANABA et al., 2017; SEYDIM & SARIKUS, 2006), assim como o incremento significativo na atividade antimicrobiana para filmes com NE de OE incorporadas (ESPITIA et al., 2019). O estudo preliminar verificou a concentração mínima inibitória para o OE de alecrim para as referidas culturas de bactéria. Todavia, fatores como quantidade de surfactante, ao nosso entendimento, demonstraram interferências nas propriedades ativas dos filmes nanocompósitos.

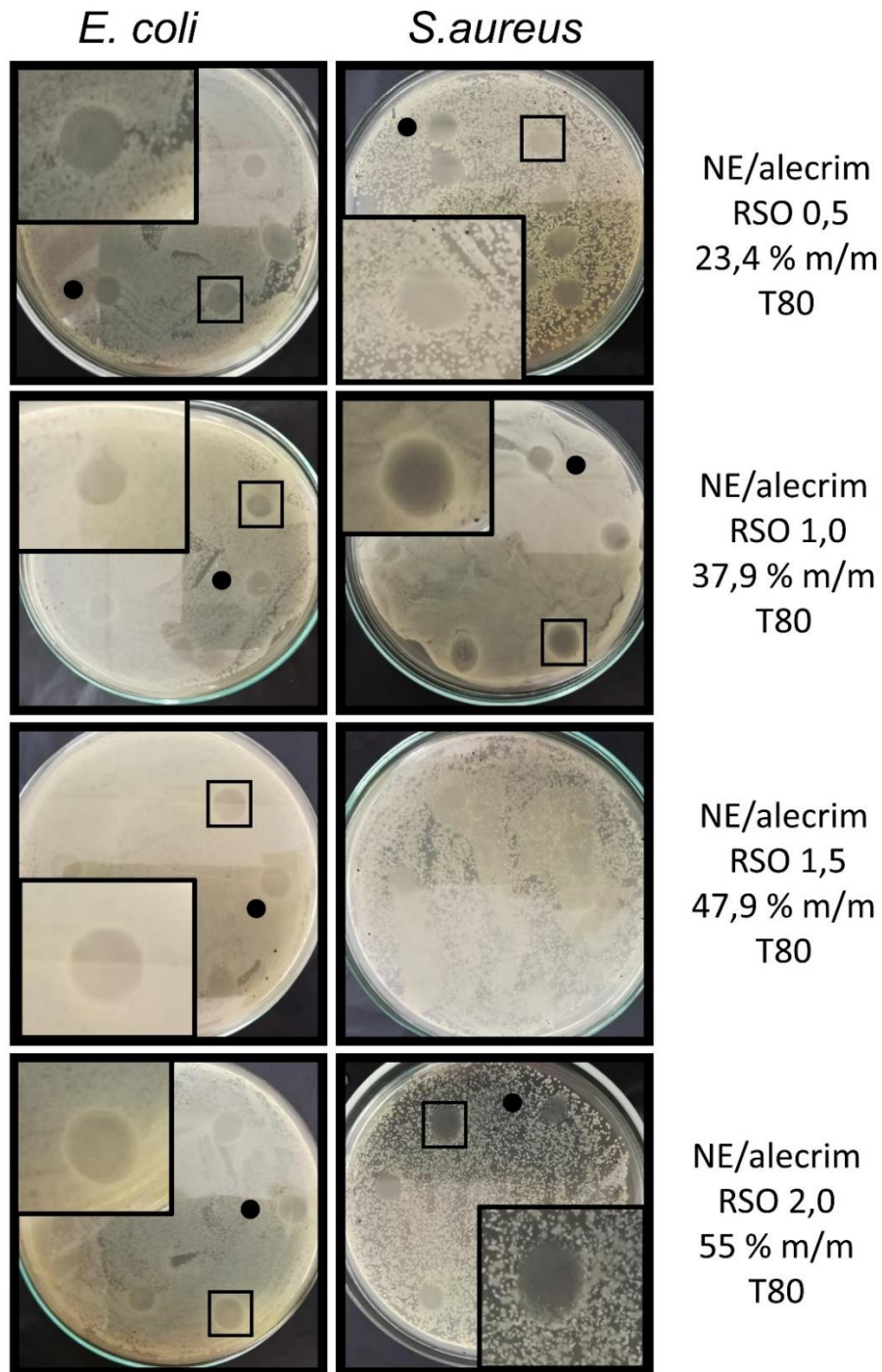


FIGURA 5.12: Fotografias digitais dos filmes de pectina com NE de alecrim em diferentes valores de RSO (razão mássica de surfactante/OE) quando submetidos ao teste antimicrobiano de halo de inibição por difusão em ágar. Coluna da esquerda indica culturas *E. coli* e coluna da esquerda indicam culturas da *S. aureus*. Círculo preto indica tamanho inicial do filme colocado no início do ensaio.

Sugere-se que o mecanismo de difusão dos compostos ativos presentes no OE de alecrim tenha sido dificultado pela presença do surfactante nos filmes. O surfactante atua de modo a recobrir as gotas de OE, diminuindo a energia interfacial e permitindo a estabilidade dessas NE). Sendo assim, mesmo para tamanhos menores, os componentes ativos presentes no OE não difundiram para o meio de cultura, inibindo apenas a região onde foi depositado. Dessa forma, sugere que a inibição se deu por contato e não por difusão, permitindo assim a aplicação dessas embalagens, em que o há o contato direto do alimento com a embalagem carreadora do composto antimicrobiano.

De acordo com BASTARRACHEA et al. (2011) embalagens ativas podem ser divididas nas que permitem a migração da substância antimicrobiana para o alimento ou das embalagens que inibem o crescimento de micro-organismos apenas na superfície dos alimentos. Para QUINTAVALLA & VICINI (2002) embalagens antimicrobianas, cujo mecanismo de ação é por contato, mostra-se uma alternativa para inibição do crescimento de micro-organismos em alimentos prontos para o consumo e frescos como carne e queijo por exemplo, que não são passíveis aos métodos tradicionais de preservação como adição de sais, congelamento ou processamento térmico.

No exposto os resultados indicam que para o sistema formado por pectina/NE o surfactante atuou como uma barreira a difusão do agente antimicrobiano (OE de alecrim). Todavia, como a inibição só ocorre para regiões em contato direto com o meio cultura, o sistema aqui estudado poderia ser aplicado em embalagens que inibem o crescimento apenas na superfície de alimentos.

#### 5.4 - Conclusões Parciais

Os resultados deste trabalho indicaram que o surfactante não apresentou interações eletrostáticas com os grupos carboxílicos da pectina nos sistemas de pectina/surfactante e o de pectina com as NE/alecrim, e isso foi evidenciado pela não formação de complexos em solução, conforme demonstraram as medidas de espalhamento dinâmico de luz. Por outro lado, propõe-se a existência de interações das porções apolares da pectina com as micelas ou moléculas de surfactante, indicado pelo aumento na viscosidade com a adição de surfactante (ou das nanoemulsões) à matriz filmogênica de pectina.

A adição de surfactante ou das NE/alecrim produziu um aspecto esponjoso na morfologia interna dos filmes. Este aspecto pode ser relacionado tanto à volatilização do óleo essencial na secagem, quanto ao surfactante, que pode estar atuando de modo a diminuir as interações polímero/polímero durante a secagem. Essa diminuição na interação resultou em um decréscimo considerável nas propriedades mecânicas, tanto para resistência à tração, quanto para rigidez (módulo elástico dos filmes).

A hidrofobicidade de filmes de pectina aumentou para concentrações de surfactante entre 10 e 20% m/m. Para valores menores ou superiores a estes, o filme apresentou caráter hidrofílico semelhante ao filme controle de pectina. A adição de um componente hidrofóbico (óleo essencial de alecrim) à matriz não aumentou a hidrofobicidade dos filmes, indicando que o surfactante pode atuar sobre as propriedades de superfície do filme. Tal efeito foi relacionado à orientação das moléculas de surfactante com suas regiões hidrofóbicas para o ar na superfície de secagem do filme, enquanto a porção hidrofílica ficou orientada para a parte interna da superfície do filme.

O óleo essencial de alecrim apresentou atividade antioxidante. O surfactante não interferiu na atividade antioxidante do óleo tanto em solução, quanto nos do filme de pectina incorporado com NE/alecrim. No caso dos nanocompósitos, observou-se uma diminuição na propriedade antioxidante, a qual pode ser justificada pela volatilização do óleo durante a produção do filme. De modo oposto, a quantidade de surfactante mostrou-se interferente nas propriedades antimicrobianas. Neste caso, observou-se uma restrição ao crescimento apenas para a região em que o filme foi depositado.

## CÁPITULO 6

### 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

#### 6.1 – Conclusões

Nanoemulsões de óleos essenciais de alecrim e de alho foram obtidas com sucesso por inversão catastrófica de fase e microfluidização e, posteriormente, aplicadas no desenvolvimento de bionanocompósitos de pectina.

Os óleos essenciais de alecrim e de alho apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias: *E. coli*, *S. typhimurium*, *S.aureus* e *E. faecalis*. Para o OE de alecrim o valor de concentração mínima inibitória foi de 0,7% v/v tanto para bactérias Gram-positivas (*E. coli* e *S. typhimurium*) quanto para Gram-negativas (*S.aureus* e *E. faecalis*). No caso do óleo essencial de alho, os valores de concentração mínima inibitória diferenciaram de acordo com a característica da parede celular: para Gram-negativas, onde uma camada externa de polipeptídioglicanos seletiva a compostos hidrofóbicos existe, o valor foi maior e igual a 0,7% v/v. Para Gram-positivas, o valor foi menor, cerca de 0,3% v/v.

O processo de emulsificação por alta e baixa energia permitiu a obtenção de nanoemulsões tanto de óleo essencial de alho e de alecrim. O método de microfluidização mostrou-se mais eficaz para obter nanoemulsões com baixa polidispersividade e diâmetros médios menores para os dois óleos essenciais. A concentração de surfactante foi interferente para ambos métodos de obtenção de nanoemulsões, sendo para a emulsificação de baixa energia um fator importante, pois sua localização foi determinante para o processo de inversão de fase. Ainda pode-se concluir que solubilização do surfactante na fase contínua (aquosa), não promove a inversão catastrófica de fase, mas sim a emulsificação direta.

A estabilidade coloidal das nanoemulsões indicou mecanismos diferentes para os dois tipos de óleo essencial. Para o de alecrim a cremação foi mecanismo de instabilidade por separação gravitacional, devido à densidade do óleo ser menor que a da água. No caso do de alho, cuja densidade é superior à da água, o mecanismo identificado foi a sedimentação. No comparativo entre os métodos e a quantidade de surfactante, bem como o tipo de óleo essencial, constatou-se que as nanoemulsões

obtidas com 10 ciclos de microfluidização e razão mássica de surfactante/óleo igual a 2,0 foram as menos suscetíveis à mecanismo de separação, demonstrando assim maior estabilidade.

As interações no sistema pectina/surfactante e pectina/nanoemulsões não foram de natureza eletrostática. A partir de ensaios reológicos e de espectroscopia UV-vis, dois possíveis mecanismos foram propostos: (1) interações entre as moléculas do surfactante e a cadeia poliméricas, e essas ocorrendo pelas porções hidrofóbicas de ambos compostos; (2) interações do tipo ligação de hidrogênio entre a região hidrofílica do surfactante e os grupos carboxílicos da pectina.

A morfologia dos filmes controle modificou-se de um filme compacto sem imperfeições para um com aspecto esponjoso para ambos sistemas: pectina/surfactante e pectina/nanoemulsões. Tais modificações podem estar relacionadas não apenas à volatilização do óleo essencial na secagem, mas também o surfactante.

A hidrofobicidade dos filmes de pectina/surfactante aumentou para concentrações de surfactante entre (10 e 20% m/m), se comparadas com o filme controle. Foi proposto que tal comportamento se deu pela orientação da parte hidrofóbica do surfactante para a interface ar/filme, tornando a superfície mais hidrofóbica. Em concentrações maiores, esse efeito não foi verificado, o que sugeriu que em altas quantidades de surfactante, a diminuição das interações polímero-polímero tornam a superfície mais exposta a grupos polares, o que pode justificar o aumento na hidrofobicidade dos filmes.

O óleo essencial de alecrim apresentou capacidade antioxidante tanto para sistemas sem ou com adição do surfactante. O mesmo comportamento foi observado para os nanocompósitos de pectina/nanoemulsões de alecrim.

A atividade antimicrobiana por halo de inibição não foi verificada para tanto para os sistemas pectina/surfactante quanto para pectina/nanoemulsões. Os resultados indicaram que o surfactante e sua quantidade pode ter dificultado a difusão do óleo do filme para o meio de cultura, considerando que o óleo essencial de alecrim apresentou propriedade antimicrobiana em solução contra as células estudadas.

Dessa forma, este trabalho permitiu o desenvolvimento, com sucesso, de bionanocompósitos de pectina/óleo essencial e surfactante, além de inferir os mecanismos que regem as interações entre polissacarídeo/surfactante e

polissacarídeo/nanoemulsões, importante para o entendimento da correlação preparação-estrutura-propriedades de bionanocompósitos.

## 6.2 – Sugestões para trabalhos futuros

Sugerem-se as seguintes investigações para trabalhos futuros:

(1) Estudo do mecanismo de inversão catastrófica de fase acompanhado por MET-crio: Como exposto no capítulo 4, o mecanismo mais proposto para formação de NE por inversão catastrófica de fase é a formação e emulsões múltiplas. Com o advento da técnica de MET-Crio, as possibilidades e os desafios se abrem para acompanhar visualmente a formação das NE. Propõe-se para trabalhos futuros, o estudo da formação das emulsões múltiplas por MET-crio para diferentes surfactantes e co-surfactantes.

(2) Estudo de NE de OE e co-surfactantes: polisorbato e biopolímeros. Comparar os diferentes métodos de emulsificação no que compete a adição de biopolímeros como emulsificantes ou uma mistura de emulsificantes, em que um componente seja o biopolímero.

(3) Estudo das propriedades ativas pelo desenvolvimento de filmes e de nanocompósitos a partir da quantificação inicial de cargas entre matriz/surfactante em solução: estudo de estabilização de NE em solução e na produção e nanocompósitos.

(4) Avaliação da volatilização do OE em NE incorporadas em matriz biopoliméricas: surfactante como agente retentor da volatilização do OE, de forma poder quantificar quanto do OE foi adicionado à suspensão filmogênica e o quanto é volatilizado durante as etapas de processamento.





## CAPÍTULO 7

### 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. & AGUSTINI, T. W. "Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils". *Food Hydrocolloids*. **28**: 189, 2012.

ALEXANDRE, E. M. C.; LOURENÇO, R. V.; BITTANTE, A. M. Q. B.; MORAES, I. C. F. & SOBRAL, P. J. d. A. "Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications". *Food Packa. Shelf Life*. **10**: 87, 2016.

AMORATI, R.; FOTI, M. C. & VALGIMIGLI, L. "Antioxidant Activity of Essential Oils". *J. Agric. Food Chem.*, **61**: 10835, 2013.

ANKRI, S. & MIRELMAN, D. "Antimicrobial properties of allicin from garlic". *Microbes and Infection*. **1**: 125, 1999.

ARORA, A. & PADUA, G. W. "Review: Nanocomposites in Food Packaging". *J. Food Sci.*, **75 (1)**: R43, 2010.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A. & MARTÍN-BELLOSO, O. "Effect of sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions". *Food Hydrocolloids*. **70**: 191, 2017.

ASKER, D.; WEISS, J. & MCCLEMENTS, D. J. "Analysis of the Interactions of a Cationic Surfactant (Lauric Arginate) with an Anionic Biopolymer (Pectin): Isothermal Titration Calorimetry, Light Scattering, and Microelectrophoresis". *Langmuir*. **25 (1)**: 116, 2009.

ATARES, L. & CHIRALT, A. "Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging". *Trends in Food Sci. Tech*. **48**: 51, 2016.

ATTI-SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L. D.; RECH, J. C.; PANSERA, M. R.; AGOSTINI, F.; SERAFINI, L. A. & MOYNA, P. "Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oils". *Braz. Arch. Biol. Tech*. **48**: 1035, 2005.

AZEREDO, H. M. C. d. "Nanocomposites for food packaging applications". *Food Res. Int*. **42**: 1240, 2009.

BAI, L. & MCCLEMENTS, D. J. " Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants : Rhamnolipids". *J. Colloid Interf. Sci.*, **479**: 71, 2016.

BAKRI, I. M. & DOUGLAS, C. W. I. "Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria". *Arch. Oral Biol.*, **50**: 645, 2005.

BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; BIONDI, D. M. & RUBERTO, G. "Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils". *J. Essent. Oil Res.* **10**: 618, 1998.

BARBOSA, I. d. M.; MEDEIROS, J. A. d. C.; DE OLIVEIRA, K. Á. R.; GOMES-NETO, N. J.; TAVARES, J. F.; MAGNANI, M. & DE SOUZA, E. L. "Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables". *Food Control.* **59**: 468, 2016.

BASSOLÉ, I. H. N. & JULIANI, H. R. "Essential oils in combination and their antimicrobial properties". *Molecules.* **17**: 3989, 2012.

BASTARRACHEA, L.; DHAWAN, S. & SABLANI, S. S. "Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging: A Review". *Food Eng. Rev.* **3**: 79, 2011.

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

BENKEBLIA, N. "Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*)". *LWT - Food Sci.Tech.* **37**: 263, 2004.

BILBAO-SÁINZ, C.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; WOOD, D. F.; WILLIAMS, T. G. & MCHUGH, T. H. "Nanoemulsions prepared by a low-energy emulsification method applied to edible films.". *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 11932, 2010.

BONILLA, J.; VARGAS, M.; ATARÉS, L. & CHIRALT, A. "Effect of Chitosan Essential Oil Films on the Storage-Keeping Quality of Pork Meat Products". *Food Bioprocess Tech.* **7**: 2443, 2014.

BONNAUD, M.; WEISS, J. & MCCLEMENTS, D. J. "Interaction of a Food-Grade Cationic Surfactant (Lauric Arginate) with Food-Grade Biopolymers (Pectin, Carrageenan, Xanthan, Alginate, Dextran, and Chitosan)". *J. Agric. Food Chem.*, **58 (17)**: 9770, 2010.

BOUCHAMA, F.; AKEN, G. A. V.; AUTIN, A. J. E. & KOPER, G. J. M. "On the mechanism of catastrophic phase inversion in emulsions". *Colloids Surface A.* **231**: 11, 2003.

BURT, S. "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review". *Int. J. Food Microbiol.*, **94 (3)**: 223, 2004.

BURT, S. A. **Antibacterial activity of essential oils: potencial applications in food.** Utrecht, The Netherlands: 142 p. 2007.

CAO, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, W.; MENG, X. & LIU, B. "Hydrophobicity and physicochemical properties of agarose film as affected by chitosan addition". *Int. J. Biol. Macromol.*, **106**: 1307, 2018.

CELIKTAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T. & BASER, K. H. C. "Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations". *Food Chem.* **100**: 553, 2007.

CHIN, J.; LIEW, L.; NGUYEN, Q. D. & NGOTHAÏ, Y. "Effect of sodium chloride on the formation and stability of n-dodecane nanoemulsions by the PIT method". *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, **5**: 570, 2010.

CHIRALT, A. & ATAR, L. "Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging". *Trends Food Sci. Tech.* **48**, 2016.

COFFIN, D. R. & FISHMAN, M. L. "Physical and mechanical properties of highly plasticized pectin/starch films". *J. Appl. Polym. Sci.* **54**: 1311, 1994.

DA SILVA BOMFIM, N.; NAKASSUGI, L. P.; FAGGION PINHEIRO OLIVEIRA, J.; KOHIYAMA, C. Y.; MOSSINI, S. A. G.; GRESPAN, R.; NERILO, S. B.; MALLMANN, C. A.; ALVES ABREU FILHO, B. & MACHINSKI, M. "Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg". *Food Chem.*, **166**: 330, 2015.

DAMMAK, I. & SOBRAL, P. J. d. A. "Effect of different biopolymers on the stability of hesperidin-encapsulating O/W emulsions". *J. Food Eng.* **237**: 33, 2018.

DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; SOUZA, J. R. & MATTOSO, L. H. C. "Preparação de novos nanobiocompósitos comestíveis ativos contendo nanoemulsão de canela e pectina". *Polím.* **24**: 486, 2014.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M. & FERRARI, G. "Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods". *LWT - Food Sci. Techn.* **44**: 1908, 2011.

DONSÌ, F. & FERRARI, G. "Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food". *J. Biotechnol.*, **233**: 106, 2016.

EÇA, K. S.; SARTORI, T. & MENEGALLI, F. C. "Films and edible coatings containing antioxidants - a review". *Braz. J. Food Tech.* **17**: 98, 2014.

ERKAN, N.; AYRANCI, G. & AYRANCI, E. "Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol". *Food. Chem.* **110**: 76, 2008.

ESPITIA, P. J. P.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; DU, W. X.; CHIOU, B. S.; WILLIAMS, T. G.; WOOD, D.; MCHUGH, T. H. & SOARES, N. F. F. "Physical and antibacterial properties

of açai edible films formulated with thyme essential oil and apple skin polyphenols". *J. Food Sci.*, **79**, 2014.

ESPITIA, P. J. P.; FUENMAYOR, C. A. & OTONI, C. G. "Nanoemulsions: Synthesis, Characterization, and Application in Bio-Based Active Food Packaging". *Compre. Rev. Food Sc. F.* **18 (1)**: 21, 2019.

FAKHREDDIN HOSSEINI, S.; REZAEI, M.; ZANDI, M. & GHAVI, F. F. "Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films". *Food Chem.*, **136**: 1490, 2013.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMÉNEZ, A.; MUÑOZ, J. A. & IBARZ, A. "Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use". *Trends Food Sci. Tech.* **22 (6)**: 292, 2011.

FARIAS, M. G.; FAKHOURI, F. M.; DE CARVALHO, C. W. P. & ASCHERI, J. L. R. "Physicochemical Characterization of Edible Starch Films with Barbados Cherry (*Malpighia Emarginata* Dc)". *Quim. Nova.* **35**: 546, 2012.

FATOUROS, D. G.; BERGENSTAHL, B. & MULLERTZ, A. "Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during in vitro digestion". *Eur. J. Pharm. Sci.*, **31 (2)**: 85, 2007.

FERNANDES, R. V. d. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. & OLIVEIRA, C. R. d. "Physical and chemical properties of encapsulated rosemary essential oil by spray drying using whey protein-inulin blends as carriers". *Int. J. Food Sci. Tech.* **49**: 1522, 2014.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J. & KÜHNLE, A. "Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion". *Colloids Surf. A.* **251**: 53, 2004.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I.; MACCHIA, M. & CECCARINI, L. "Main Agronomic-Productive Characteristics of Two Ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and Chemical Composition of Their Essential Oils". *J. Agric. Food Chem.*, **50 (12)**: 3512, 2002.

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S. & EFFERTH, T. "Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination". *Phytother Res* **994**: 989, 2007.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; BAGHER, M. & TAGHIZADEH, M. " Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils". *Food Chem.* **102**: 898, 2007.

GALOOYAK, S. S. & DABIR, B. "Three-factor response surface optimization of nano-emulsion formation using a microfluidizer". *J. Food Sci. Tech.* **52**: 2558, 2015.

GALUS, S. & KADZIŃSKA, J. "Food applications of emulsion-based edible films and coatings". *Trends Food Sci. Tech.* **45 (2)**: 273, 2015.

GAMAGE, G. R.; PARK, H. J. & KIM, K. M. "Effectiveness of antimicrobial coated oriented polypropylene/polyethylene films in sprout packaging". *Food Res. Int.* **42**: 832, 2009.

GAO, C.; TIAN, C.; LU, Y.; XU, J.; LUO, J. & GUO, X. "Essential oil composition and antimicrobial activity of *Sphallerocarpus gracilis* seeds against selected food-related bacteria". *Food Control.* **22**: 517, 2011.

GARCÍA-MÁRQUEZ, E.; HIGUERA-CIAPARA, I. & ESPINOSA-ANDREWS, H. "Design of fish oil-in-water nanoemulsion by microfluidization". *Innov. Food Sci. Emerg.* **40**: 87, 2017.

GENENA, A. K.; HENSE, H.; SMANIA JUNIOR, A. & SOUZA, S. M. D. "Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide". *Ciencia Tecnol. Alime.* **28**: 463, 2008.

GÓMEZ-ESTACA, J.; BRAVO, L.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; ALEMÁN, A. & MONTERO, P. "Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts". *Food Chem.*, 112 (1): 18, 2009.

GOMEZ-ESTACA, J.; LOPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNANDEZ-MUNOZ, P.; CATALA, R. & GAVARA, R. "Advances in antioxidant active food packaging". *Trends Food Sci. Tech.* **35**: 42, 2014.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ DE LACEY, A.; 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**: 889, 2010.

GREGORY, J. Flocculation Fundamentals. In: TADROS, T. (Ed.). **Encyclopedia of Colloid and Interface Science**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p.459. ISBN 978-3-642-20665-8.

GULL, I.; SAEED, M.; SHAUKAT, H.; ASLAM, S. M.; SAMRA, Z. & ATHAR, A. M. "Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria". *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **11**: 8, 2012.

HAN, J. H. "Edible Films and Coatings: A Review". *Innovations in Food Packaging*. HAN, J. H. San Diego: Academic Press: 213 p. 2014.

HANSSON, P. & LINDMAN, B. "Surfactant-polymer interactions". *Curr. Opin Colloid In.* 1 (5): 604, 1996.

HARRIS, J. C.; COTTRELL, S. L.; PLUMMER, S. & LLOYD, D. "Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic)". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**: 282, 2001.

HONÓRIO, V. G.; BEZERRA, J.; SOUZA, G. T. & CARVALHO, R. J. "Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole". *Frontiers Microbiol.* **6**: 1, 2015.

HUA, X.; DING, P.; WANG, M.; CHI, K.; YANG, R. & CAO, Y. "Emulsions prepared by ultrahigh methoxylated pectin through the phase inversion method". *Int. J. Biolol. Macromol.*, **128**: 167, 2019.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T. & MEYER, R. L. "Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components". *Frontiers Microbio.* **3**: 1, 2012.

INSTITUTE, C. a. L. S. **Performance standards for antimicrobial disk Susceptibility tests; approved standard - Elenventh Edition** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2012.

JAFARI, S. M.; HE, Y. & BHANDARI, B. "Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison AU - Mahdi Jafari, Seid". *Int. J. Food Prop.* **9** (3): 475, 2006.

JAHANZAD, F.; JOSEPHIDES, D.; MANSOURIAN, A. & SAJJADI, S. "Dynamics of Transitional Phase Inversion Emulsification : Effect of Addition Time on the Type of Inversion and Drop Size". *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**: 7631, 2009.

JOHNSON, M.; OLALEYE, O. & KOLAWOLE, O. "Antimicrobial and Antioxidant Properties of Aqueous Garlic (*Allium sativum*) Extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*". *Brit. Microbio. Res. J.* **14**: 1, 2016.

JOSHI, N.; RAWAT, K. & BOHIDAR, H. B. "Influence of Structure , Charge , and Concentration on the Pectin – Calcium – Surfactant Complexes". *J. Phys. Chem. B.* **120**(8): 4249-57 2016.

KABALNOV, A. "Thermodynamic and theoretical aspects of emulsions and their stability". *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **3**: 270, 1998.

KIM, J. W. K., K. H. . "Antiyeast Activity of Heated Garlic in the Absence of Alliinase Enzyme Action". *Food Microbio.* **68** (5), 2003.

KOMAIKO, J. & MCCLEMENTS, D. J. "Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation : Hydrocarbon oil , non-ionic surfactant , and water systems". *J. Colloid Interf.* **425**: 59, 2014.

KOMAIKO, J. & MCCLEMENTS, D. J. "Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size". *J. Food Eng.* **146**: 122, 2015.

KOMAIKO, J. S. & MCCLEMENTS, D. J. "Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods". *Compre. Rev. Food Sci. F.* **15**: 331, 2016.

KROCHTA, J. M. & DEMULDERJOHNSTON, C. "Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities". *Food Tech.* **51**: 61, 1997.

KRONBERG, B.; HOLMBERG, K. & LINDMAN, B. Surfactant–Polymer Systems. In: B. KRONBERG, K. H. A. B. L. (Ed.). **Surface Chemistry of Surfactants and Polymers**: John Wiley & Sons, Ltd., 2014. p.271. ISBN 9781118695968.

KUMAR, N. & MANDAL, A. "Surfactant Stabilized Oil-in-Water Nanoemulsion: Stability, Interfacial Tension, and Rheology Study for Enhanced Oil Recovery Application". *Energy Fuels.* **32** (6): 6452, 2018a.

KUMAR, N. & MANDAL, A. "Thermodynamic and physicochemical properties evaluation for formation and characterization of oil-in-water nanoemulsion". *J. Mol. Liq.* **266**: 147, 2018b.

KUNTSCHE, J.; HORST, J. C. & BUNJES, H. "Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems". *Int. J. Pharm.*, **417** (1): 120, 2011.

KUORWEL, K. K.; CRAN, M. J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J. & BIGGER, S. W. "Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents". *J. Food Sci.*, **76**: 90, 2011a.

KUORWEL, K. K.; CRAN, M. J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J. & BIGGER, S. W.. "Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films". *J. Food Sci.*, **76**, 2011b.

LAGARON, J. M. "Nanotechnology for bioplastics: opportunities, challenges and strategies". *Trends Food Sci. Tech.* **v. 22 (no. 11)**: pp. 611, 2011.

LEE, H. S.; MORRISON, E. D.; FRETHERM, C. D.; ZASADZINSKI, J. A. & MCCORMICK, A. V. "Cryogenic electron microscopy study of nanoemulsion formation from microemulsions". *Langmuir.* **30**: 10826, 2014.

LEE, L.; HANCOCKS, R.; NOBLE, I. & NORTON, I. T. "Production of water-in-oil nanoemulsions using high pressure homogenisation: A study on droplet break-up". *J. Food Eng.* **131**: 33, 2014.

LI, P. H. & CHIANG, B. H. "Process optimization and stability of d-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology". *Ultrason. Sonochem.*, **19**: 192, 2012.

LI, Y.; ZHANG, Z.; YUAN, Q.; LIANG, H. & VRIESEKOOOP, F. "Process optimization and stability of D -limonene nanoemulsions prepared by catastrophic phase inversion method". *J. Food Eng.* **119**: 419, 2013.



LIEW, J. C. L.; NGUYEN, Q. D. & NGOTHAI, Y. "Effect of sodium chloride on the formation and stability of n-dodecane nanoemulsions by the PIT method". *Asia-Pacific J. Chem. Eng.* **5** (4): 570, 2010.

LÓPEZ-MATA, M. A.; RUIZ-CRUZ, S.; DE JESÚS ORNELAS-PAZ, J.; DEL TORO-SÁNCHEZ, C. L.; MÁRQUEZ-RÍOS, E.; SILVA-BELTRÁN, N. P.; CIRA-CHÁVEZ, L. A. & BURRUEL-IBARRA, S. E. "Mechanical, Barrier and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporating Cinnamaldehyde". *J. Polym. Environ.*, **26** (2): 452, 2018.

LOREVICE, M. V.; DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A. & MATTOSO, L. H. C. "Development of novel guava puree films containing chitosan nanoparticles". *J. Nanosci. Nanotech.* **12**, 2012.

LOREVICE, M. V.; DE MOURA, M. R. & MATTOSO, L. H. C. "Nanocomposite of Papaya Puree and Chitosan Nanoparticles for Application in Packaging.". *Quim.Nova.* **37**: 931, 2014.

LOREVICE, M. V.; OTONI, C. G.; DE MOURA, M. R. & MATTOSO, L. H. C. "Chitosan nanoparticles on the improvement of thermal, barrier, and mechanical properties of high- and low-methyl pectin films". *Food Hydrocolloids.* **52**, 2016.

LV, G.; WANG, F.; CAI, W. & ZHANG, X. "Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Characterization of the emulsions formed by catastrophic phase inversion". *Colloids Surface A.* **450**: 141, 2014.

MA, T.; LUO, J.; TIAN, C.; SUN, X.; QUAN, M.; ZHENG, C.; KANG, L. & ZHAN, J. "Influence of technical processing units on chemical composition and antimicrobial activity of carrot (*Daucus carrot* L.) juice essential oil". *Food Chem.*, **170**: 394, 2015.

MAALI, A. & MOSAVIAN, M. T. H. "Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000–2010)". *J. Disper. Sci. Tech.* **34**: 92, 2013.

MAISANABA, S.; LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; GUTIÉRREZ-PRAENA, D.; PICHARDO, S.; PUERTO, M.; PRIETO, A. I.; JOS, A. & CAMEÁN, A. M. "New advances in active packaging incorporated with essential oils or their main components for food preservation AU - Maisanaba, S". *Food Rev. Int.* **33** (5): 447, 2017.

MANRICH, A.; MOREIRA, F. K. V.; OTONI, C. G.; LOREVICE, M. V.; MARTINS, M. A. & MATTOSO, L. H. C. "Hydrophobic edible films made up of tomato cutin and pectin". *Carbohydr. Polym.* **164**, 2017.

MARTELLI, M. R.; BARROS, T. T.; DE MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C. & ASSIS, O. B. G. "Effect of Chitosan Nanoparticles and Pectin Content on Mechanical Properties and Water Vapor Permeability of Banana Puree Films". *J. Food Sci.*, **78**: N98, 2013.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S. & FERREIRA, I. C. F. R. "Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review". *Food Chem.*, **211**: 41, 2016.

MAYER, S.; WEISS, J. & JULIAN, D. " Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion : Factors influencing droplet size and stability". J. Colloid Interface Sci., **402**: 122, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. "Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability". Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **47**: 611, 2007.

MCCLEMENTS, D. J.. "Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques. ". Third Edition Boca Raton CRC Press, 2016. 714 ISBN 9781498726696.

MCCLEMENTS, D. J. "Isothermal Titration Calorimetry Study of Pectin - Ionic Surfactant Interactions". 5604, 2000.

MCCLEMENTS, D. J. "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities". Soft Matter. **8**: 1719, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; BAI, L. & CHUNG, C. "Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions". Annu. Rev. Food. Sci. Technol. (8)1, 2017.

MCCLEMENTS, D. J. & RAO, J. "Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity.". Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **51**: 285, 2011.

MENDES, J. F.; MARTINS, J. T.; MANRICH, A.; SENA NETO, A. R.; PINHEIRO, A. C. M.; MATTOSO, L. H. C. & MARTINS, M. A. "Development and physical-chemical properties of pectin film reinforced with spent coffee grounds by continuous casting". Carbohyd. Polym. **210**: 92, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. p. 17, 14 fevereiro de 2019 2017. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017> >.

MOUSSEAU, F.; OIKONOMOU, E. K.; BALDIM, V.; MORNET, S. & BERRET, J.-F. "Nanoparticle-Lipid Interaction: Job Scattering Plots to Differentiate Vesicle Aggregation from Supported Lipid Bilayer Formation". Colloid Interface. **2 (4)**: 50, 2018.

ORTEGA-TORO, R.; JIMÉNEZ, A.; TALENS, P. & CHIRALT, A. "Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films". Food Hydrocolloids. **38**: 66, 2014.

OSTERTAG, F.; WEISS, J. & MCCLEMENTS, D. J. "Low-energy formation of edible nanoemulsions : Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion". J. Colloid Interface Sci., **388**: 95, 2012.

OTONI, C. G.; 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". *Compre. Rev. Food Sci. F.* **16**, 2017.

OTONI, C. G.; MOURA, M. R. D.; AOUADA, F. A.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, R. S.; LOREVICE, M. V.; SOARES, N. D. F. F. & MATTOSO, L. H. C. "Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films". *Food Hydrocolloids.* **41**, 2014.

PAL, N.; KUMAR, N. & MANDAL, A. "Stabilization of Dispersed Oil Droplets in Nanoemulsions by Synergistic Effects of Gemini Surfactant, PHPA Polymer and Silica Nanoparticle". *Langmuir.* 2019.

PANAGOPOULOU, E.; TSOUKO, E.; KOPSAHELIS, N.; KOUTINAS, A.; MANDALA, I. & EVAGELIOU, V. "Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Olive oil emulsions formed by catastrophic phase inversion using bacterial cellulose and whey protein isolate". *Colloid Surface A.* **486**: 203, 2015.

PATEL, S. G. & BUMMER, P. M. "Thermodynamics of aggregate formation between a non-ionic polymer and ionic surfactants : An isothermal titration calorimetric study". *Int. J. Pharm.*, **516**: 131, 2017.

PATTERSON, J. P.; XU, Y.; MORADI, M.-A.; SOMMERDIJK, N. A. J. M. & FRIEDRICH, H. "CryoTEM as an Advanced Analytical Tool for Materials Chemists". *Acc. Chem. Res.*, **50 (7)**: 1495, 2017.

PAVLATH, A. E. & ORTS, W. **Edible Films and Coatings: Why, What, and How?** Edible Films and Coatings for Food Applications. HUBER, K. C. e EMBUSCADO, M. E. New York, NY: Springer New York: 1 p. 2009.

PERAZZO, A.; PREZIOSI, V. & GUIDO, S. "Phase inversion emulsi fi cation : Current understanding and applications". *Adv. Colloid Interface Sci.*, **222**: 581, 2015.

PÉREZ-CÓRDOBA, L. J.; NORTON, I. T.; BATCHELOR, H. K.; GKATZIONIS, K.; SPYROPOULOS, F. & SOBRAL, P. J. A. "Physico-chemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds". *Food Hydrocolloids.* **79**: 544, 2018.

PICONE, C. S. F. & CUNHA, R. L. "Formation of nano and microstructures by polysorbate–chitosan association". *Colloid Surface A.* **418**: 29, 2013.

PRAKASH, A.; BASKARAN, R.; PARAMASIVAM, N. & VADIVEL, V. "Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review". *Food Res. Int.* **111**: 509, 2018.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H. & MCCLEMENTS, D. J. "Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on  $\beta$ -carotene bioaccessibility". *Food Chem.*, **135 (3)**: 1440, 2012.

QIAN, C. & MCCLEMENTS, D. J. "Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size". *Food Hydrocolloids*. **25** (5): 1000, 2011.

QING, Y.; SABO, R.; ZHU, J. Y.; AGARWAL, U.; CAI, Z. & WU, Y. "A comparative study of cellulose nanofibrils disintegrated via multiple processing approaches". *Carbohydr Polym.* **97**: 226, 2013.

QUINTAVALLA, S. & VICINI, L. "Antimicrobial food packaging in meat industry". *Meat Sci.* **62** (3): 373, 2002.

RAO, J. & MCCLEMENTS, D. J. "Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability". *Food Hydrocolloids*. **29**: 326, 2012a.

RAO, J. & MCCLEMENTS, D. J. "Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Influence of composition and preparation method". *J. Agric. Food Chem.* **59**: 5026, 2011.

RAO, J. & MCCLEMENTS, D. J. "Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions". *Food Chem.*, **134** (2): 749, 2012b.

RASHID, K. I. "Antimicrobial Activity of Rosemary ( *Rosmarinus Officinalis* L .) Leaf Essential Oils Against Three Bacterial Species Al- Mustansiriya J. Sci. **21**: 1, 2010.

REN, G.; SUN, Z.; WANG, Z.; ZHENG, X.; XU, Z. & SUN, D. "Nanoemulsion formation by the phase inversion temperature method using polyoxypropylene surfactants". *J. Colloid Interface Sci.*, **540**: 177, 2019.

RHIM, J.-W.; PARK, H.-M. & HA, C.-S. "Bio-nanocomposites for food packaging applications". *Prog. Polym. Sci.* **38** (10): 1629, 2013.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; MELO, N. R. d. & SANCHES-SILVA, A. "Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends". *Trends Food Sci. Tech.* **61**: 132, 2017.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M. & SANCHES-SILVA, A. "Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging". *Curr. Opin. Food Sci.* **14**: 78, 2017.

RODRÍGUEZ, M.; OSÉS, J.; ZIANI, K. & MATÉ, J. I. "Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films". *Food Res. Int.* **39** (8): 840, 2006.

SAJJADI, S. "Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: On the nature of inversion". *Langmuir*. **22**: 5597, 2006.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R. & MARTÍN-BELLOSO, O. "Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils". *Food Hydrocolloids*. **43**: 547, 2015.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R. & MARTÍN-BELLOSO, O.. "Physicochemical Characterization of Lemongrass Essential Oil-Alginate Nanoemulsions: Effect of Ultrasound Processing Parameters". *Food Bioprocess Tech.* **6**: 2439, 2013a.

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

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R. & MARTÍN-BELLOSO, O. "Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions". *Food Control*. **37**: 292, 2014.

SALVIA-TRUJILLO, L.; SOLIVA-FORTUNY, R.; ROJAS-GRA, M. A.; MCCLEMENTS, D. J. & MART, O. "Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review." *Ann. Rev. Food Sci. Tech.* **8**: 439-466, 2017 .

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBANEZ, E.; SENORANS, F. J. & REGLERO, G. "Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L . Essential Oil Obtained via Supercritical Fluid Extraction". *J. Food Prot.*, **68**: 790, 2005.

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.; FERRARI, G.; VU, K. D.; DONSI, F.; SALMIERI, S. & LACROIX, M. "Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on green beans". *Food Control*. **50**: 215, 2015.

SEYDIM, A. C. & SARIKUS, G. "Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils". *Food Res. Int.* **39**: 639, 2006.

SHIN, S.-H.; KIM, S.-J.; LEE, S.-H.; PARK, K.-M. & HAN, J. "Apple Peel and Carboxymethylcellulose-Based Nanocomposite Films Containing Different Nanoclays". *J. Food Sci.*, **79**: E342, 2014.

SHIT, S. C. & SHAH, P. M. "Edible Polymers: Challenges and Opportunities". *J.Polym.* **2014**: 1, 2014.

SITONIA, K.; SARTORI, T. & MENEGALLI, F. C. "Films and edible coatings containing antioxidants – a review Filmes e coberturas comestíveis contendo antioxidantes – uma revisão". *Braz. J. Food Tech.* **17**(2): 98, 2014.

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

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. & PRODPRAN, T. "Characteristics and antioxidant activity of leaf essential oil-incorporated fish gelatin films as affected by surfactants". *Int. J. Food Sci. Tech.* **48**: 2143, 2013a.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. & PRODPRAN, T. "Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils". *J. Food Eng.* **117**: 350, 2013b.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. & PRODPRAN, T. "Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils". *Food Chem.*, **134**: 1571, 2012.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. & PRODPRAN, T. "Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants". *Food Hydrocolloids.* **41**: 33, 2014.

ULUATA, S.; DECKER, E. A. & MCCLEMENTS, D. J. "Optimization of Nanoemulsion Fabrication Using Microfluidization: Role of Surfactant Concentration on Formation and Stability". *Food Biophy.* **11**: 52, 2016.

VALDES, A.; MELLINAS, A. C.; RAMOS, M.; BURGOS, N.; JIMENEZ, A. & GARRIGOS, M. C. "Use of herbs, spices and their bioactive compounds in active food packaging". *Rsc Advances.* **5**: 40324, 2015.

VITHANAGE, C. R.; GRIMSON, M. J.; WILLS, P. R.; HARRISON, P. & SMITH, B. G. "RHEOLOGICAL AND STRUCTURAL PROPERTIES OF HIGH-METHOXYL ESTERIFIED, LOW-METHOXYL ESTERIFIED AND LOW-METHOXYL AMIDATED PECTIN GELS". *Journal of Texture Stud.* **41** (6): 899, 2010.

VITHANI, K.; JANNIN, V.; POUTON, C. W. & BOYD, B. J. "Colloidal aspects of dispersion and digestion of self-dispersing lipid-based formulations for poorly water-soluble drugs". *Adv. Drug Deliver. Rev.* **142**: 16-34, 2019.

VITORAZI, L.; SEKAR, S.; FRESNAIS, J.; LOH, W.; CHAPEL, J. & BERRET, J. "Soft Matter Evidence of a two-step process and pathway". *Soft Matter.* **10**: 9496, 2014.

WANG, W.; WU, N.; ZU, Y. G. & FU, Y. J. " Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L . essential oil compared to its main components". *Food Chem.* **108**: 1019, 2008.

WANG, X.; SUN, X.; LIU, H.; LI, M. & MA, Z. "Barrier and mechanical properties of carrot puree films". *Food Bioprod. Process.* **89**: 149, 2011.

WOOSTER, T. J.; GOLDING, M. & SANGUANSRI, P. "Ripening Stability". *Langmuir : the ACS J. Surface Colloid.* **24**: 12758, 2008.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J. & MAO, L. "Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions". *Food Res. Int.* **41**: 61, 2008.

ZHENG, Y.; ELI, W. & LI, G. "FTIR study of Tween80/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate/toluene microemulsions". *Colloid Polym. Sci.* **287** (7): 871, 2009.

## APÊNDICE A

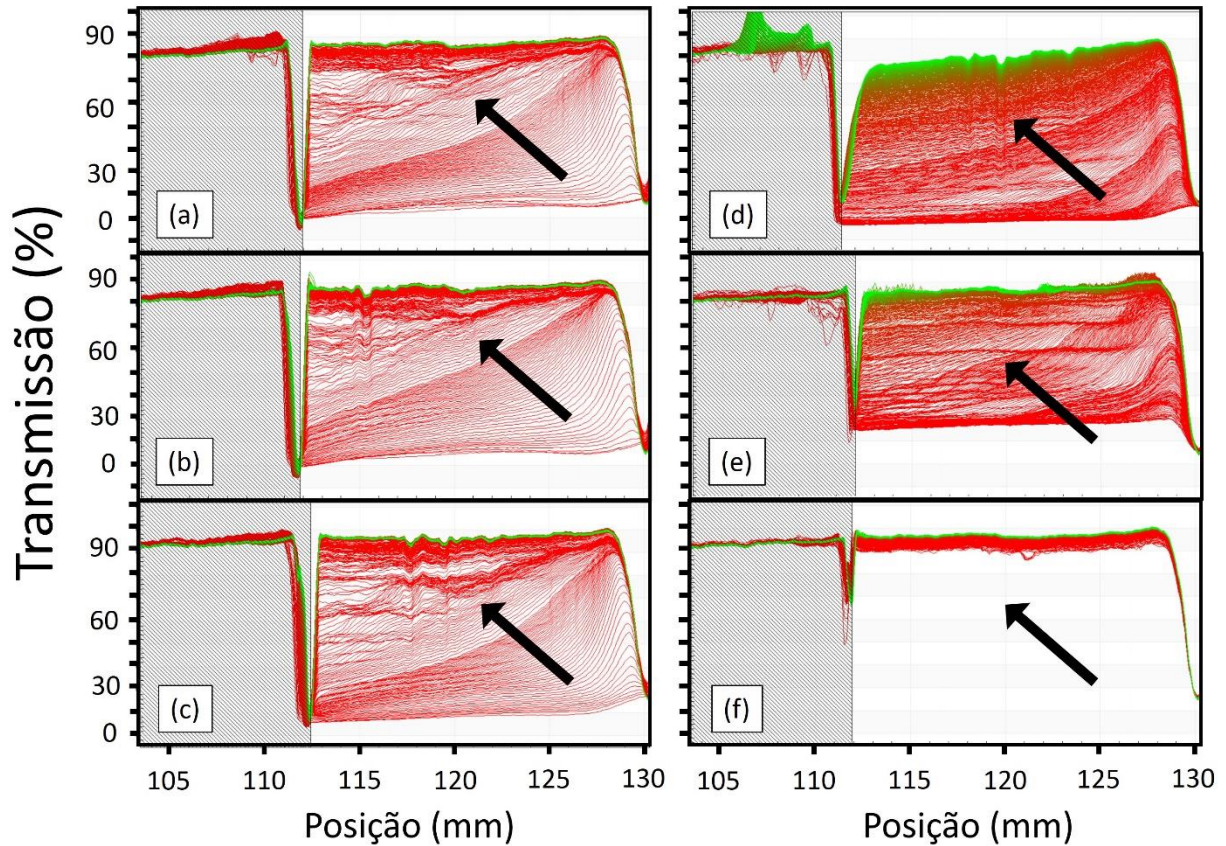


FIGURA A. 1: Curvas de transmissão/tempo em relação a posição para NE/alecrim obtidas por inversão catatrófica de fase tipo 1 (surfactante dissolvido em água): (a) RSO 0,5; (b) RSO 1,0; (c) RSO 2,0; inversão catatrófica de fase tipo 2 (surfactante dissolvido em OE): (d) RSO 0,5; (e) RSO 1,0 (f) RSO 2,0. Setas indicam o sentido de movimento das partículas. RSO é a sigla para razão mássica surfactante/óleo essencial



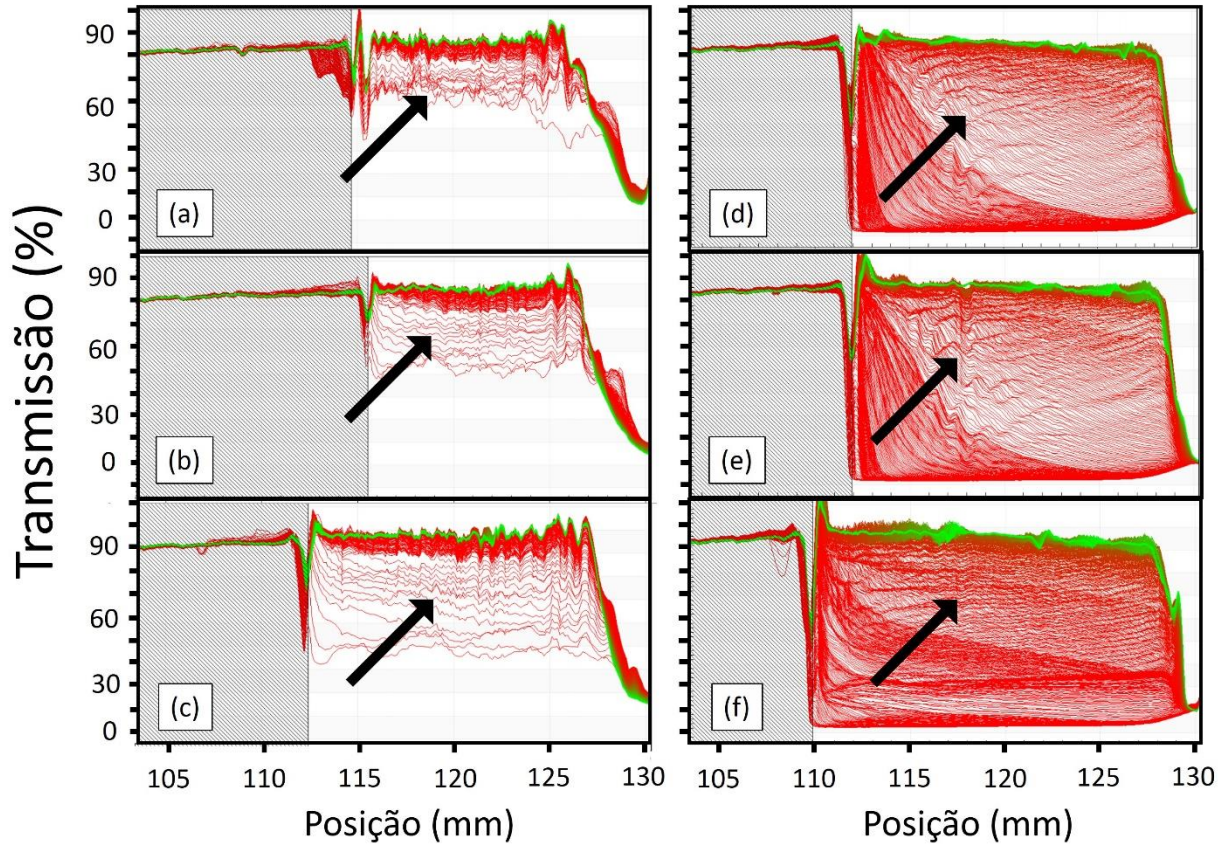


FIGURA A. 2: Curvas de transmissão/tempo em relação a posição para NE/alho obtidas por inversão catastrófica de fase tipo 1 (surfactante dissolvido em água): (a) RSO 0,5; (b) RSO 1,0; (c) RSO 2,0; inversão catastrófica de fase tipo 2 (surfactante dissolvido em OE): (d) RSO 0,5; (e) RSO 1,0 (f) RSO 2,0. Setas indicam o sentido de movimento das partículas. RSO é a sigla para razão mássica surfactante/óleo essencial

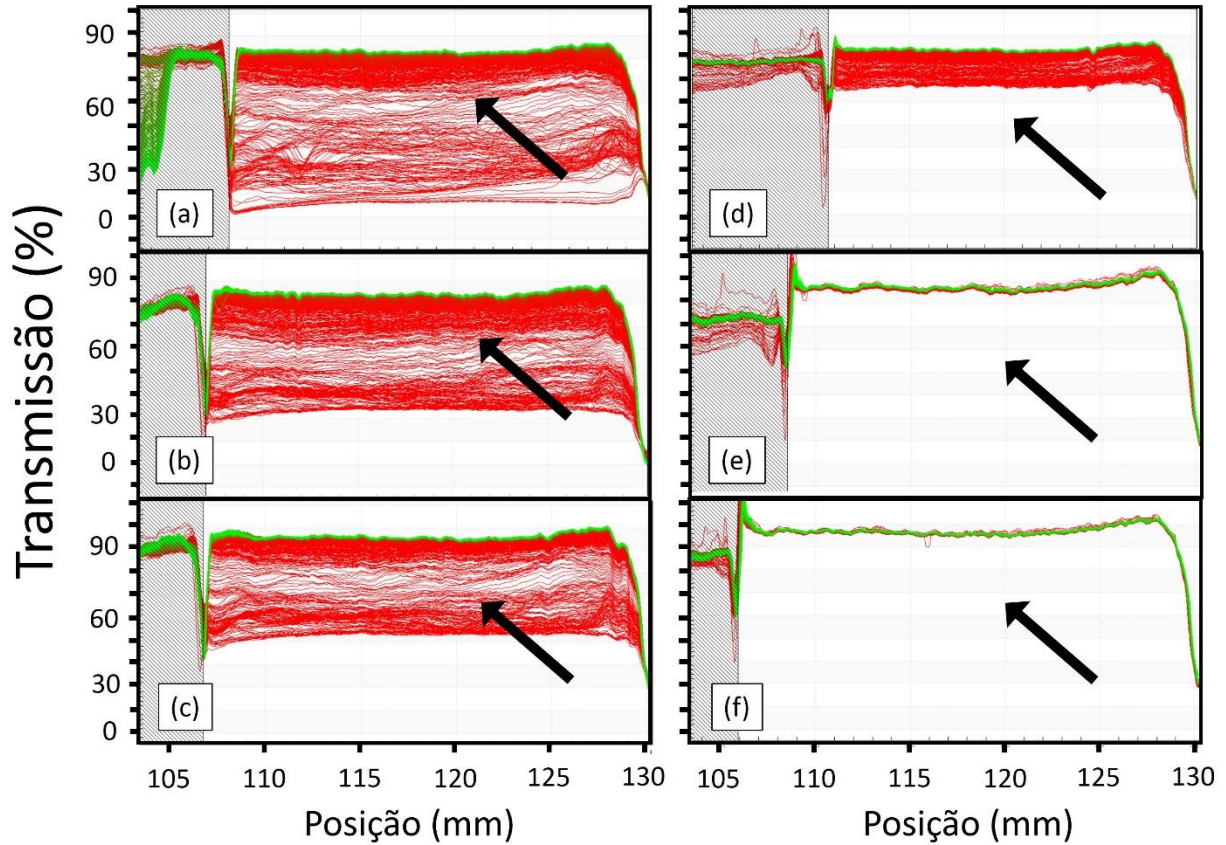


FIGURA A. 3: Cvas de transmissão/tempo em relação a posição para NE/alecrim obtidas por microfluidização: (a) RSO 0,5/zero ciclo; (b) RSO 0,5/3 ciclos; (c) RSO 0,5/10 ciclos; (d) RSO 2,0/zero ciclo; (e) RSO 2,0/3 ciclos; (f) RSO 2,0/10 ciclos. Setas indicam o sentido de movimento das partículas. RSO é a sigla para razão mássica surfactante/óleo essencial



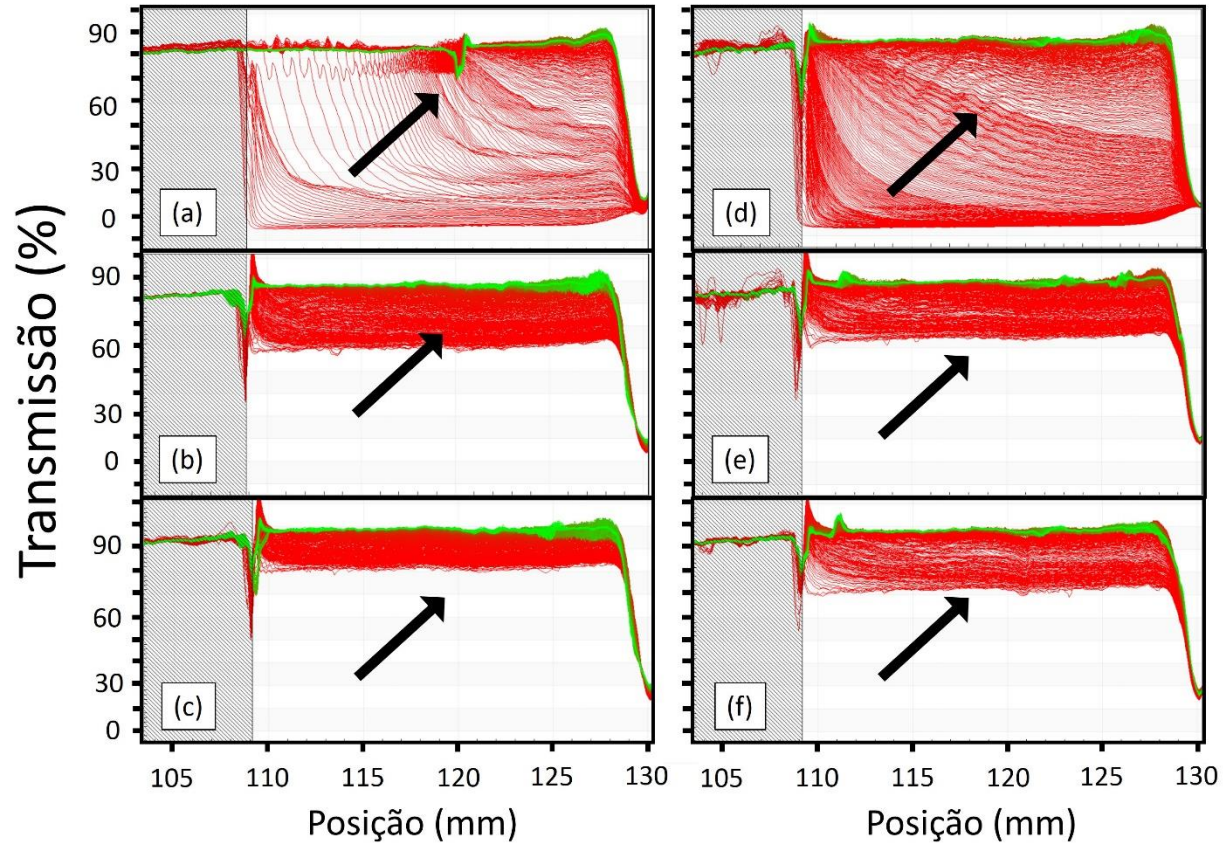


FIGURA A. 4: Curvas de transmissão/tempo em relação a posição para NE/alho obtidas por microfluidicação: (a) RSO 0,5/zero ciclo; (b) RSO 0,5/3 ciclos; (c) RSO 0,5/10 ciclos; (d) RSO 2,0/zero ciclo; (e) RSO 2,0/3 ciclos; (f) RSO 2,0/10 ciclos. Setas indicam o sentido de movimento das partículas. RSO é a sigla para razão mássica surfactante/óleo essencial

## APÊNDICE B

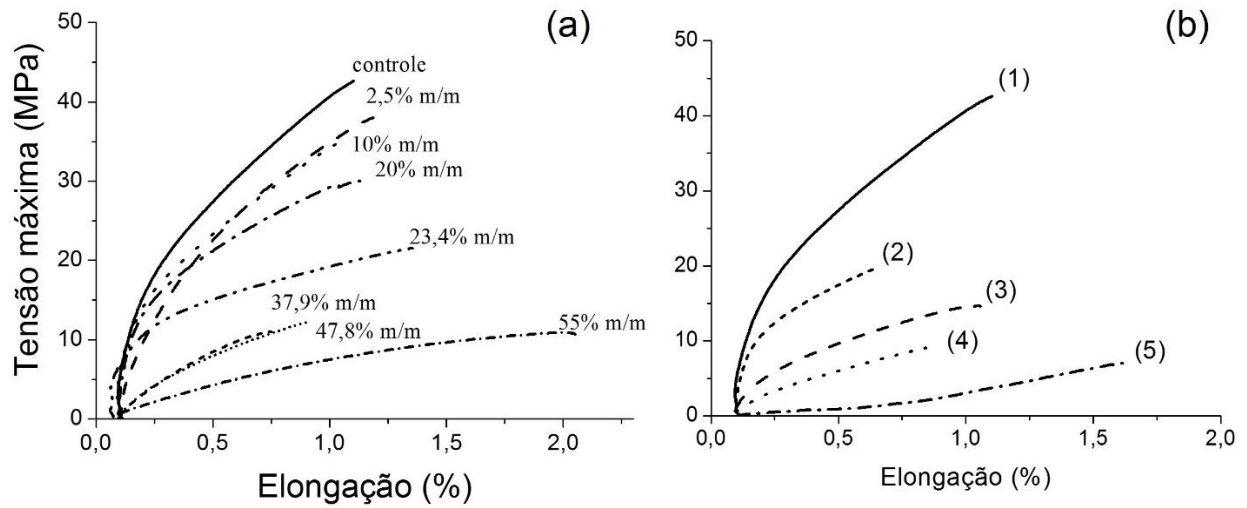


FIGURA B. 1: Curvas representativas de tensão-deformação obtidas pelo tracionamento uniaxial: (a) de filmes de pectina com diferentes concentrações de surfactante T80; (b) filmes de pectina: (1) controle; (1) com NE/alecrim RSO 0,5; (2) NE/alecrim RSO 1,0; (3) NE/alecrim RSO 2,0; (4) NE/alecrim RSO 1,5.