UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LARISSA TESSARO

**Produção de emulsão dupla A/O/A rica em extrato de folha de pitangueira (*Eugenia uniflora*
L.) para aplicação em filmes ativos de gelatina e/ou quitosana**

Pirassununga

2020

LARISSA TESSARO

Produção de emulsão dupla A/O/A rica em extrato de folha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) para aplicação em filmes ativos de gelatina e/ou quitosana

(versão corrigida)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

Coorientadora: Profa. Dra. Milena Martelli Tosi

Pirassununga

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T338p Tessaro, Larissa
Produção de emulsão dupla A/O/A rica em extrato de folha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) para aplicação em filmes ativos de gelatina e/ou ... / Larissa Tessaro ; orientador Paulo José do Amaral Sobral ; coorientadora Milena Martelli Tosi. -- Pirassununga, 2020.
151 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Emulsão água/óleo/água. 2. Extrato vegetal. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Filmes ativos. I. Amaral Sobral, Paulo José do, orient. II. Martelli Tosi, Milena , coorient. III. Título.

Dedico aos meus pais, Elen e Paulo, que sempre apoiaram minhas decisões e me incentivaram tanto. Obrigada por vibrarem comigo, eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral, por me receber tão bem no seu grupo de pesquisa e me confiar um projeto tão importante. Obrigada pela dedicação, disponibilidade, conhecimentos compartilhados e paciência. O senhor me inspira;

À minha coorientadora, Profa. Milena Martelli Tosi, por todos os ensinamentos proporcionados desde a minha graduação, por acreditar em mim, me incentivar e me ajudar tanto. Você me convidou para participar do seu grupo de pesquisa em 2013 e, naquele dia, mudou minha vida. Serei eternamente grata;

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), por toda ajuda, troca de experiências e momentos de descontração. Em especial, à Carla Giovana Luciano, que sempre me ajudou, me ensinou e se tornou uma amiga muito querida. Obrigada por compartilhar a sua vida comigo;

À especialista em laboratório, Ana Mônica Barbosa Quinta Bittante, que além de me auxiliar no desenvolvimento do meu projeto, me aconselhou tantas vezes sobre a vida. Você é muito especial;

Ao especialista em laboratório, Rodrigo Vinícius Lourenço, pelas análises realizadas;

A todos os técnicos e especialistas em laboratório que auxiliaram no desenvolvimento desta Dissertação;

À minha estagiária, Maria Fernanda Libório Martins, por toda dedicação, comprometimento e auxílio no desenvolvimento da Dissertação;

À Bianca Chierogato Maniglia, por tudo o que me ensinou e por ser inspiração;

À Profa. Dra. Ana Paula Ramos, do departamento de Química da FFCLRP-USP, por disponibilizar seu laboratório para as análises de diâmetro médio de gotas;

Aos meus amigos, que me incentivaram, me apoiaram, ouviram minhas lamentações e me descontraíram. Em especial, Letícia Stephanuto, Rafaele Silva, Otávio Couvre, Maiara Silvestrini e Natália Silva. Amo vocês;

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), pela oportunidade de desenvolver esta Dissertação;

À CAPES, pela concessão de bolsa para o desenvolvimento da minha Dissertação.

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas, e daí? Devemos ter perseverança e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.”

Marie Skłodowska Curie

RESUMO

TESSARO, L. **Produção de emulsão dupla A/O/A rica em extrato de folha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) para aplicação em filmes ativos de gelatina e/ou quitosana.** 2020. 151 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

O objetivo geral desta Dissertação foi produzir e caracterizar filmes ativos à base de gelatina e/ou quitosana incorporados com emulsão dupla água-em-óleo-em-água (A/O/A) contendo extrato hidroetanólico da folha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) na fase aquosa interna, como veículo de princípios ativos, além de caracterizar as emulsões água-em-óleo (A/O) e água-em-óleo-em-água (A/O/A) produzidas. A emulsão A/O/A foi produzida em duas etapas, sendo que a primeira etapa consistiu na produção das emulsões A/O e a segunda etapa consistiu na produção das emulsões A/O/A, variando as proporções de fases e concentrações dos emulsificantes (poliricinoleato de poliglicerol (PGPR) e Tween 80) em ambas as emulsões. As emulsões A/O e A/O/A foram caracterizadas em relação ao diâmetro de gotas e estabilidade física. As emulsões A/O e A/O/A com melhores propriedades foram ainda caracterizadas em relação ao comportamento reológico, sendo que a emulsão A/O/A ótima foi também caracterizada em relação às atividades antioxidante e antimicrobiana, juntamente com o EHFP. Os filmes ativos foram produzidos usando gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana como biopolímeros, e a emulsão A/O/A, e foram caracterizados em relação às suas principais propriedades físicas, e em relação às atividades antioxidantes e antimicrobianas. As emulsões A/O se apresentaram com diâmetro médio de gotas nanométrico, baixa polidispersão, distribuições mono e bimodal, e elevada estabilidade física, com a emulsão A/O 20/80 com 3 g PGPR/100 g óleo a escolhida como emulsão A/O ótima, apresentando comportamento reológico de fluido newtoniano. As emulsões A/O/A apresentaram distribuição de diâmetro médio de gotas trimodal, com populações de gotas de diâmetro nanométrico, submicrométrico e micrométrico, mas com diâmetro médio de gotas submicrométrico e elevada polidispersão. A emulsão A/O/A 40/60 com 3 g/Tween 80/100 g água foi escolhida como ótima, apresentando comportamento reológico de fluido pseudoplástico. Além disso, a emulsão A/O/A foi capaz de manter a atividade antioxidante e antimicrobiana do EHFP. A solubilidade, a permeabilidade ao vapor de água, o ângulo de contato, o brilho e a barreira à transmissão da luz UV/Visível diminuíram em todos os filmes ativos pela incorporação da emulsão A/O/A, ao passo que a opacidade aumentou e a intensidade dos picos de difração dos filmes à base de quitosana e

blenda gelatina/quitosana foi afetada. A rigidez e resistência dos filmes à base de gelatina ou quitosana aumentaram com a adição da emulsão A/O/A, ao passo que diminuíram para o filme à base de blenda gelatina/quitosana. Além disso, a presença da emulsão A/O/A só diminuiu a temperatura de transição vítrea do filme à base de quitosana, não afetando os demais. Os filmes ativos apresentaram aumento na atividade antioxidante devido à incorporação da emulsão A/O/A, mas não ocorreu a formação de halos de inibição contra as bactérias testadas, apenas inibição do crescimento na região de contato com os filmes à base de quitosana e blenda gelatina/quitosana. A emulsão A/O/A mostrou-se um sistema eficaz no encapsulamento do EHFP, sendo possível realizar a incorporação dela em filmes ativos à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana, cujas propriedades foram afetadas, no geral, de maneira positiva.

Palavras-chave: Emulsão água/óleo/água; extrato vegetal; atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, filmes ativos, biopolímeros

ABSTRACT

TESSARO, L. **Production of W/O/W double emulsion rich in pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) leaf extract for application in active gelatin and/or chitosan films.** 2020. 151 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

The general objective of this Dissertation was to produce and characterize active films based on gelatin and/or chitosan incorporated with water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsion containing pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) leaf hydroethanolic extract leaf in the internal aqueous phase as a vehicle of active ingredients, in addition to characterizing the water-in-oil (W/O) and water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions. The W/O/W emulsion was produced in two steps, the first step being the production of W/O emulsions and the second step the production of W/O/W emulsions, varying of the ratio phases and concentrations of the emulsifiers (Polyglycerol polyricinoleate and Tween 80) in both emulsions. W/O and W/O/W emulsions were characterized in relation to the average droplet diameter and physical stability. The W/O and W/O/W emulsions with the best properties were characterized in relation to the rheological behavior, and the optimal W/O/W emulsion was also characterized in relation to antioxidant and antimicrobial activities, together with PLHE. The active films were produced using gelatin, chitosan or gelatin/chitosan blend as biopolymers, and the W/O/W emulsions, and were characterized in relation to their main physical properties, and in relation to antioxidant and antimicrobial activities. The W/O emulsions had a nanometer mean droplet diameter, low polydispersity, mono and bimodal distributions, and high physical stability, with the W/O emulsion 20/80 with 3 g PGPR/100 g oil as the best W/O emulsion, presenting rheological behavior of Newtonian fluid. The W/O/W emulsions had a trimodal mean droplet diameter distribution, with nanometer, submicrometer and micrometer droplet populations, but with submicrometer average droplet diameter and high polydispersity. W/O/W emulsion 40/60 with 3 g/Tween 80/100 g water was chosen as optimal, showing rheological behavior of pseudoplastic fluid. In addition, the emulsion W/O/W was able to maintain the antioxidant and antimicrobial activity of PLHE. Solubility, water vapor permeability, contact angle, gloss and barrier to UV/Visible light transmission decreased in all active films by incorporation of the W/O/W emulsion, while opacity increased and the intensity of the diffraction peaks of the chitosan and gelatin/chitosan blend films was affected. The stiffness and strength of gelatin or

chitosan based films increased with the addition of the W/O/W emulsion, while decreasing for gelatin/chitosan blend film. In addition, the presence of emulsion W/O/W only decreased the glass transition temperature of the chitosan-based film, not affecting the others. Although little, the active films showed antioxidant activity due to the incorporation of the emulsion W/O/W, but there was no formation of inhibition halos against the tested bacteria, only growth inhibition in the contact region with the chitosan and gelatin/chitosan blend based films. The emulsion W/O/W proved to be an effective system for encapsulating the PLHE, being possible to incorporate it in active films based on gelatin, chitosan and gelatin/chitosan blend, whose properties were generally positively affected.

Keywords: W/O/W emulsion; plant extract; antioxidant activity; antimicrobial activity, active film; biopolymers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biopolímeros de interesse na produção de filmes biopoliméricos	29
Figura 2 - Diagrama do mecanismo de formação de filmes de gelatina e suas interações	31
Figura 3 - Estrutura química da quitina e quitosana.....	32
Figura 4 - Fotografia da pitanga e folhas de pitangueira.....	39
Figura 5 - Micrografia típica de uma emulsão dupla A/O/A.....	41
Figura 6 - Representação esquemática dos principais mecanismos de desestabilização de emulsões duplas	44
Figura 7 - Principais tipos de emulsificantes utilizados para estabilizar emulsões.....	45
Figura 8 - Imagens das etapas de produção do EHFP	49
Figura 9 - Fluxograma do preparo da emulsão dupla A/O/A.....	53
Figura 10 - Halos de inibição do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP), do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira diluído para a mesma concentração da emulsão (ED), e da emulsão dupla ótima (A/O/A) contra as bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella ssp</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	69
Figura 11 - Aspecto visual das emulsões A/O produzidas a (A) 10000 rpm, (B) 15000 rpm, (C) 20000 rpm e (D) 24000 rpm	73
Figura 12 - Aspecto visual das emulsões A/O produzidas com diferentes proporções de fases (10/90, 20/80 e 30/70) e diferentes concentrações de PGPR (3 e 5 g/100 g óleo)	74
Figura 13 - Distribuição do diâmetro médio de gotas das emulsões A/O preparadas com diferentes proporções de fases. A, B) 10/90; C, D) 20/80; E, F) 30/70 e diferentes concentrações de PGPR. A, C, E) 3 g/100 g óleo; B, D, F) 5 g/100 g óleo	76
Figura 14 - Perfis de transmissão da emulsão A/O ótima a (A) 20 °C, (B) 40 °C e (C) 60 °C	79
Figura 15 - Curva de fluxo da emulsão A/O ótima, a 25 °C	80

Figura 16 - Aspecto visual da emulsão A/O ótima	81
Figura 17 - Aspecto visual das emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases. 1, 2, 3) 20/80; 4, 5, 6) 30/70; 7, 8, 9) 40/60; e diferentes concentrações de Tween 80. 1, 4, 7) 3 g/100 g água; 2, 5, 8) 5 g/100 g água; 3, 6, 9) 8 g/100 g água	83
Figura 18 - Distribuição do diâmetro médio de gotas das emulsões A/O/O preparadas com diferentes proporções de fases. A) 20/80; B, C, D) 30/70; E, F, G) 40/60 e diferentes concentrações de Tween 80. A, B, E) 3 g/100 g água; C, F) 5 g/100 g água; D, G) 8 g/100 g água.....	86
Figura 19 - Perfis de transmissão da emulsão A/O/A ótima a (A) 20 °C, (B) 40 °C e 60 ° C.	90
Figura 20 - Comportamento reológico da emulsão A/O/A ótima, a 25 °C. (A) Curva de fluxo. (B) Viscosidade em função da taxa de cisalhamento	92
Figura 21 - Aspecto visual da emulsão A/O/A ótima	93
Figura 22 - Microscopias da emulsão A/O/A ótima. (A e B) corante Rodamina B, (C) corante calcoflúor e (D) corante <i>Fast green</i>	98
Figura 23 - Aspecto visual dos filmes a base de gelatina. (A) 0,25; (B) 0,50; (C) 0,75 e (D) 1,00 g de EHFP _{bs} na emulsão A/O/A/100 g gelatina.....	99
Figura 24 - Aspecto visual dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), com (E) e sem (C) emulsão A/O/A	100
Figura 25 - Imagens representativas da microestrutura dos filmes (topografia em 3D e topografia em 2D) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A	104
Figura 26 - Imagens representativas da microestrutura dos filmes (imagem de fases) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A	105

Figura 27 - Imagens representativas da microestrutura dos filmes (superfície e seção transversal) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A	107
Figura 28 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A	109
Figura 29 - Espectros de difração de raios-X dos filmes de (GC) gelatina, (GE) gelatina com emulsão A/O/A, (QC) quitosana, (QE) quitosana com emulsão A/O/A, (GQC) blenda gelatina/quitosana, (GQE) blenda gelatina/quitosana com emulsão A/O/A.....	112
Figura 30 - Espectros UV/Vis dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A	124
Figura 31 - Termogramas dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A: linhas contínuas – 1ª varredura, linhas pontilhadas – 2ª varredura.....	127
Figura 32 - Halos de inibição dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A contra as bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella ssp</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de aplicação de embalagens ativas para o uso na indústria de alimentos	34
Tabela 2 - Estudos recentes relacionados com a adição de aditivos naturais para produção de filmes ativos.....	35
Tabela 3 - Potenciais aplicações de emulsões duplas do tipo A/O/A.....	43
Tabela 4 - Exemplos de diferentes métodos de emulsificação para produção de emulsões tipo A/O/A	47
Tabela 5 - Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP) pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS ^{•+} e DPPH, compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) e poder de redução do íon férrico FRAP	67
Tabela 6 - Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP) contra diferentes bactérias, baseada no halo de inibição (cm).....	70
Tabela 7 - Parâmetros de cor e pH do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP)	71
Tabela 8 – Índice de instabilidade das emulsões A/O produzidas em diferentes intensidades de agitação	72
Tabela 9 - Diâmetro médio de gota (μm) e Índice de polidispersão (PDI) das emulsões A/O produzidas com diferentes proporções de fases (10/90, 20/80 e 30/70) e diferentes concentrações de PGPR (3 e 5 g/100 g óleo)*	75
Tabela 10 - Índice de instabilidade das emulsões A/O preparadas com diferentes proporções de fase (10/90, 20/80 e 30/70) e diferentes concentrações de PGPR (3 e 5 g/100 g óleo) a 20, 40 e 60 °C.....	78
Tabela 11 - Parâmetros de cor, pH, densidade (ρ) e índice de refração (IR) da emulsão A/O ótima	82

Tabela 12 - Diâmetro médio de gota (μm) das emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água).....	84
Tabela 13 - Índice de polidispersão (PDI) das emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água).....	85
Tabela 14 - Potencial ζ das emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água)	87
Tabela 15 - Índice de instabilidade das emulsões A/O/A preparadas com diferentes proporções de fase (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água) a 20, 40 e 60 °C.....	89
Tabela 16 - Parâmetros de cor, pH, densidade (ρ) e índice de refração (IR) da emulsão A/O/A ótima	93
Tabela 17 - Atividade antioxidante do EHFP pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS ^{•+} e DPPH, compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) e poder de redução do íon férrico FRAP*	95
Tabela 18 - Atividade antimicrobiana da emulsão A/O/A ótima e do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira diluído (ED) contra diferentes bactérias, baseada no halo de inibição (cm)	97
Tabela 19 - Espessura dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A	101
Tabela 20 - Umidade e solubilidade dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*	102

Tabela 21 - Rugosidade média dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A	106
Tabela 22 - Bandas espectrais específicas e suas funções obtidas por espectroscopia de infravermelho com transformada em Fourier para os filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A **	110
Tabela 23 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e ângulo de contato ($\hat{A}C$) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*	113
Tabela 24 - Tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) dos filmes à base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*	116
Tabela 25 - Força máxima na perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), com (E) e sem (C) emulsão A/O/A*	118
Tabela 26 - Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A**	120
Tabela 27 - Opacidade dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*	122
Tabela 28 - Brilho dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*	123
Tabela 29 - Temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e entalpia de fusão dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*	128

Tabela 30 - Compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) e atividade antioxidante dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A determinada por três métodos (ABTS ⁺⁺ , DPPH e FRAP)*	130
---	-----

Tabela 31 - Inibição dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A contra as bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella ssp</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	133
---	-----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

A/O = Emulsão água-em-óleo

A/O/A = Emulsão dupla água-em-óleo-em-água

Abs = Absorbancia

ABTS⁺ = 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico

ÂC = Ângulo de contato

AFM = Microscopia de força atômica

ANOVA = Análise de variância simples

AOAC = *Association of Official Analytical Chemistry*

Ar: Anel aromático

ASTM = *American Society for Testing and Materials*

BHA = Butil hidroanisol

BHI = *Brain Heart Infusion*

BHT = Butil hidroxitolueno

C⁻ = Controle negativo

C* = Croma

C⁺ = Controle positivo

CS =Caseinato de sódio

DP = Deformação na perfuração

DPPH = 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DRX = Difração de raios X

DSC = Calorimetria diferencial de varredura

E. coli = Escherichia coli

EC₅₀ = Concentração efetiva equivalente a 50% da absorbância do DPPH

ED = Extrato hidroetanólico de folha de pitangueira diluído

EHFP = Extrato hidroetanólico de folha de pitangueira

EHFP_{bs} = Extrato hidroetanólico de folha de pitangueira em base seca

ER = Elongação na ruptura

FCR = compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu

FeSO₄ = sulfato de ferroso

FP = Força máxima de perfuração

FRAP = *Ferric reducing ability of plasma*

FTIR = Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GAE = Equivalente ácido gálico

GC = filme à base de gelatina

GE = filme à base de gelatina incorporado com emulsão A/O/A

GQC = Filme à base de blenda gelatina/quitosana

GQE = Filme à base de blenda gelatina/quitosana incorporado com emulsão A/O/A

H* = Ângulo hue

IA% = Porcentagem de inibição da absorbância

IR = Índice de refração

ME = Módulo elástico

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

NCCLS = *National Committee of Clinical Laboratory Standards*

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

PDI = Índice de polidispersão

PG = Propil galato

PGPR = Polirricinoleato de poliglicerol

Potencial ζ = Potencial zeta

PVA = Permeabilidade ao vapor de água

QC = Filme à base de quitosana

QE = Filme à base de quitosana incorporado com emulsão A/O/A

R_a = Rugosidade média

S = Solubilidade

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

Samonella = *Salmonella* ssp

SF = Solução filmogênica

TE = Equivalente trolox

T_g = Temperatura de transição vítrea

T_m = Temperatura de fusão

TPTZ = 2,4,6-Tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina

TR = Tensão na ruptura

Trolox = Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

TSB = *Tryptic Soy Broth*

Tween 20 = Monooleato de Polioxietileno Sobirano 20

Tween 80 = Monooleato de Polioxietileno Sobirano 80

U = Umidade

UFC/mL = Unidades formadoras de colônia por mililitro

UR = Umidade relativa

USP = Universidade de São Paulo

UV = Ultravioleta

Vis = Visível

δ : Dobramento

ΔH_m = Entalpia de fusão

v: Estiramento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVOS E HIPÓTESE	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
2.3 HIPÓTESE	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
3.1 FILMES BIOPOLIMÉRICOS	28
3.1.1 Filmes à base de gelatina	29
3.1.2 Filmes à base de quitosana	31
3.1.3 Filmes à base de blendas gelatina/quitosana	33
3.2 FILMES ATIVOS	33
3.2.1 Agentes antioxidantes	36
3.2.2 Agentes antimicrobianos	37
3.2.3 <i>Eugenia uniflora</i> L.	39
3.3 EMULSÕES	40
3.3.1 Emulsões duplas	41
3.3.2 Emulsificantes	43
3.3.3 Métodos de emulsificação	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 MATERIAL	48
4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE FOLHA DE PITANGUEIRA (EHFP)	48
4.2.1 Produção do EHFP	48
4.2.2 Atividade antioxidante do EHFP	49
4.2.2.1 Determinação dos compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR)	49
4.2.2.2 Método de captura do radical livre ABTS ^{•+}	50
4.2.2.3 Método de captura do radical livre (DPPH)	50
4.2.2.4 Método de redução do íon férrico (FRAP)	51
4.2.3 Atividade antimicrobiana do EHFP	51

4.2.4 Cor e pH	52
4.3 PRODUÇÃO DA EMULSÃO ÁGUA-EM-ÓLEO-EM-ÁGUA (A/O/A)	52
4.3.1 Emulsão água-em-óleo (A/O).....	53
4.3.2 Emulsão água-em-óleo-em-água (A/O/A)	54
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES ÁGUA EM ÓLEO (A/O) E ÁGUA-E-ÓLEO-EM-ÁGUA (A/O/A).....	55
4.4.1 Diâmetro médio, distribuição de diâmetro médio de gotas e polidispersão.....	55
4.4.2 Estabilidade Física.....	56
4.4.3 Potencial ζ	56
4.4.4 Comportamento Reológico.....	56
4.4.5 Cor e pH	57
4.4.6 Densidade e Índice de refração.....	57
4.4.7 Atividade antioxidante da emulsão A/O/A ótima	57
4.4.7.1 Determinação dos compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR).....	57
4.4.7.2 Método de captura do radical livre ABTS ^{•+}	57
4.4.7.3 Método de captura do radical livre DPPH.....	58
4.4.7.4 Método de poder de redução do íon férrico FRAP	58
4.4.8 Atividade antimicrobiana da emulsão A/O/A ótima	58
4.4.9 Microscopia confocal da emulsão água-em-óleo-em-água (A/O/A) ótima.....	59
4.5 PRODUÇÃO DOS FILMES ATIVOS	59
4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS	60
4.6.1 Espessura	60
4.6.2 Umidade	60
4.6.3 Solubilidade em água.....	61
4.6.4 Microestrutura	61
4.6.4.1 Microscopia de força atômica (AFM)	61
4.6.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	61
4.6.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	62
4.6.6 Difração de raios-X (DRX)	62
4.6.7 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	62

4.6.8 Ângulo de contato da gota de água (ÂC)	63
4.6.9 Propriedades mecânicas.....	63
4.6.9.1 <i>Teste de tração axial</i>	63
4.6.9.2 <i>Teste de perfuração</i>	63
4.6.10 Propriedades óticas e de superfície.....	64
4.6.10.1 <i>Cor</i>	64
4.6.10.2 <i>Opacidade</i>	64
4.6.10.3 <i>Brilho</i>	64
4.6.11 Propriedades de barreira à luz UV/Visível	65
4.6.12 Calorimetria diferencial de varredura.....	65
4.6.13 Atividade Antioxidante	65
4.6.14 Atividade Antimicrobiana	66
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE FOLHA DE PITANGUEIRA (EHFP).....	66
5.1.1 Atividade antioxidante.....	66
5.1.2 Atividade antimicrobiana	68
5.1.3 Cor e pH	71
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES ÁGUA-EM-ÓLEO (A/O) PRODUZIDAS COM DIFERENTES INTENSIDADES DE AGITAÇÃO NO HOMOGENEIZADOR ULTRA-AGITAÇÃO: ESTABILIDADE FÍSICA.....	72
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES ÁGUA-EM-ÓLEO (A/O) PRODUZIDAS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE FASES E CONCENTRAÇÕES DE EMULFISICANTE	74
5.3.1 Aspecto visual	74
5.3.2 Diâmetro médio, distribuição de diâmetro médio de gotas e polidispersão	74
5.3.3 Estabilidade física.....	77
5.3.4 Comportamento reológico	80
5.3.5 Cor	81
5.3.6 pH, índice de refração e densidade	82

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES ÁGUA-EM-ÓLEO-EM-ÁGUA (A/O/A).....	83
5.4.1 Aspecto visual	83
5.4.2 Diâmetro médio, distribuição de diâmetro médio de gotas e polidispersão	84
5.4.3 Potencial ζ	87
5.4.4 Estabilidade física.....	88
5.4.5 Comportamento reológico	91
5.4.6 Cor	92
5.4.7 pH, índice de refração e densidade	94
5.4.8 Atividade antioxidante.....	95
5.4.9 Atividade Antimicrobiana	96
5.4.10 Morfologia da emulsão A/O/A ótima.....	97
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS	98
5.5.1 Aspecto visual	98
5.5.2 Espessura	101
5.5.3 Umidade	101
5.5.4 Solubilidade em água.....	102
5.5.5 Microestrutura	103
5.5.5.1 Microscopia de força atômica (AFM).....	103
5.5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	106
5.5.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	108
5.5.7 Difração de raios-X (DRX)	111
5.5.8 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	113
5.5.9 Ângulo de contato da gota de água.....	114
5.5.10 Propriedades mecânicas.....	115
5.5.10.1 Teste de tração uniaxial	115
5.5.10.2 Teste de perfuração	117
5.5.11 Propriedades ópticas e de superfície.....	119
5.5.11.1 Cor.....	119
5.5.11.2 Opacidade.....	121
5.5.11.3 Brilho.....	122
5.5.12 Propriedades de barreira à luz UV/Visível	124

5.5.13 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	125
5.5.14 Atividade antioxidante.....	129
5.5.15 Atividade antimicrobiana	132
6 CONCLUSÕES.....	134
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	136
REFERÊNCIAS	136

1 INTRODUÇÃO

Emulsões são suspensões coloidais de líquidos imiscíveis, onde um líquido encontra-se disperso no outro na forma de pequenas gotas, utilizando-se emulsificantes como agentes tensoativos para promover a diminuição da tensão interfacial entre os líquidos e aumentar a estabilidade do sistema (CUNHA et al., 2014). Uma emulsão dupla é, de maneira simplificada, “uma emulsão de uma emulsão”, segundo Muschiolik e Dickinson (2017). Há dois principais tipos de emulsões duplas: emulsões água/óleo/água (A/O/A) e emulsões óleo/água/óleo (O/A/O) (CUNHA et al., 2014). A existência de duas fases aquosas separadas por uma fase lipídica, no primeiro tipo de emulsão, permite que a fase aquosa interna seja potencialmente utilizada como compartimento para encapsulação e liberação controlada de compostos ativos hidrossolúveis (SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012), além de ajudar a proteger esses agentes ativos do oxigênio, das variações de pH e luz (LAMBA; SATHISH; SABIKHI, 2015; MUSCHIOLIK; DICKINSON, 2017).

As emulsões duplas têm sido aplicadas na área farmacêutica, para liberação controlada e aumento na biodisponibilidade de fármacos (QI; WANG; ZHU, 2011; VLAIA et al., 2009), na microencapsulação de componentes ativos (DE MOURA et al., 2018; SHADDEL et al., 2018), e na área alimentícia, para produção de alimentos enriquecidos com objetivo de controlar a liberação de nutrientes e probióticos (GIROUX et al., 2013) e no desenvolvimento de alimentos com menor teor de gordura (TEKIN; SAHIN; SUMNU, 2017). Entretanto, estudos envolvendo o uso de emulsões duplas para produção de filmes ativos, com o objetivo de controlar a liberação e prolongar a ação dos compostos ativos, com potencial uso na conservação de alimentos, são escassos (LIU et al., 2013; MURILLO-MARTÍNEZ et al., 2011), constituindo assim, a originalidade dessa dissertação.

A *Eugenia uniflora* L., planta popularmente conhecida no Brasil como pitangueira, pertence à família Myrtaceae. Ela possui folhas cujo chá apresenta algumas propriedades medicinais (AURICCHIO; BACCHI, 2003) e potencial antioxidante pouco estudado até recentemente (LORENZO et al., 2018; VARGAS et al., 2016). Extratos hidroetanólicos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) aplicados na conservação de carne bovina apresentaram boas atividades antioxidante e antimicrobiana contra as bactérias gram positivas e gram negativas testadas, além de terem apresentado melhor atividade antimicrobiana contra bactérias psicotróficas comparados aos extratos de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (VARGAS, 2015). Desta forma, o extrato de folhas de pitangueira tem

potencial aplicação como aditivo na produção de filmes ativos devido à sua ação antimicrobiana e antioxidante.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESE

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta dissertação foi produzir filmes ativos à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana incorporados com emulsão dupla água-em-óleo-em-água (A/O/A) contendo extrato hidroetanólico da folha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) na fase aquosa interna e avaliar o efeito da incorporação da emulsão A/O/A nas propriedades mecânicas, funcionais e ativas dos filmes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar a emulsão primária (A/O), contendo o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP), além de estudar o efeito da concentração de emulsificante e proporção das fases aquosa e lipídica, sobre o tamanho das gotas e da estabilidade da emulsão;
- Produzir e caracterizar a emulsão dupla (A/O/A), variando a concentração de emulsificante e proporção da emulsão primária e fase aquosa externa, buscando-se formulação ideal com menor diâmetro médio de gotas e maior estabilidade;
- Caracterizar a emulsão A/O/A ótima e o EHFP em relação à atividade antioxidante e atividade antimicrobiana;
- Produzir e caracterizar filmes ativos à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana e estudar o efeito da adição da emulsão A/O/A sobre as propriedades físicas, funcionais e atividades antioxidante e antimicrobiana dos filmes ativos.

2.3 HIPÓTESE

A hipótese dessa Dissertação foi que a produção da emulsão A/O/A contendo extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP) na fase aquosa interna, iria proteger o EHFP do oxigênio, das variações de pH e luz, mantendo assim sua atividade antioxidante e

antimicrobiana. Além disso, considerou-se que a adição da emulsão A/O/A em soluções filmogênicas de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana, seria capaz de produzir filmes ativos com melhores propriedades ativas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FILMES BIOPOLIMÉRICOS

Filmes biopoliméricos são materiais finos produzidos a partir de biopolímeros provenientes de fontes naturais e renováveis e que possuem a vantagem de se degradarem em condições ambientais, devido à ação microbiana que, através de processos de compostagem, gera compostos naturais de decomposição, como água, dióxido de carbono e biomassa (CHIELLINI; SOLARO, 1996; HANANI; ROOS; KERRY, 2014). Desta forma, os filmes a base de biopolímeros podem ser utilizados estrategicamente para substituição parcial de plásticos produzidos com polímeros sintéticos, que não se degradam, e que contribuem para a poluição ambiental e representam um sério problema ecológico (BOURTOOM, 2008; MANIGLIA et al., 2017; THARANATHAN, 2003).

Em escala de laboratório, os filmes a base de biopolímeros são produzidos, geralmente, pelo método *casting*, no qual uma solução filmogênica formada pela dispersão do(s) biopolímero(s) em um, ou mais, solventes e adição de componentes para melhorar a flexibilidade do material, como o plastificante, é depositada em moldes e submetida à secagem em estufa (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992; MANIGLIA, 2017). Uma potencial aplicação desses materiais é no setor de embalagens, como por exemplo, embalagens para alimentos e para bens de consumo rotineiros (THARANATHAN, 2003). Além disso, algumas matrizes filmogênicas são capazes de atuarem como veículos de compostos ativos e aditivos, como antioxidantes, *flavours*, pigmentos e agentes antimicrobianos (SALGADO et al., 2015), produzindo assim filmes para embalagens ativas.

Diversos biopolímeros podem ser utilizados para a produção da matriz filmogênica (Figura 1), e a escolha deste depende de alguns fatores, como a estabilidade antimicrobiana, solubilidade, transparência, molhabilidade, coesão, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e gases, aceitação sensorial, custo e disponibilidade (HANANI; ROOS; KERRY, 2014; VIEIRA et al., 2011). Os filmes podem ser produzidos com um único biopolímero, com

blendas naturais, onde o material de origem já possui mais de um biopolímero (ex: farinhas), ou com blendas produzidas por mistura de diferentes biopolímeros (MANIGLIA, 2017).

Figura 1 - Biopolímeros de interesse na produção de filmes biopoliméricos

Fonte: Adaptado de Hanani, Roos e Kerry (2014)

3.1.1 Filmes à base de gelatina

A gelatina é uma mistura de polipeptídios obtida a partir da hidrólise do colágeno (GOMEZ-GUILLEN et al., 2011; NELSON; COX, 2014). O colágeno é a proteína estrutural mais abundante encontrada em vertebrados e invertebrados, correspondendo a aproximadamente 30% das proteínas totais de um animal (POPPE, 1997; LIU et al., 2015), e está presente em tecidos conectivos como tendões, cartilagens e matriz orgânica dos ossos (NELSON; COX, 2014). A gelatina tipo A é obtida por hidrólise ácida do colágeno, enquanto a gelatina tipo B obtida por hidrólise alcalina (IMESON; POPPE, 1997). As gelatinas comerciais mais utilizadas são as extraídas da pele e ossos de bovinos e suínos, entretanto, pesquisas envolvendo a utilização de gelatina extraída da pele e cartilagens de peixes, e da pele e ossos de aves tem aumentado nos últimos anos (HANANI; ROOS; KERRY, 2014).

A gelatina tem a capacidade de formar soluções coloidais com a água, sendo portanto um hidrocoloide, altamente utilizado na indústria de alimentos devido à sua multifuncionalidade (SCHRIEBER; GAREIS, 2007). A gelatina também possui propriedades distintas que podem ser divididas em dois grupos: (i) propriedades relacionadas com a gelificação, como formação de géis, texturização, espessante e interação com a água, e (ii) propriedades relacionadas ao efeito de superfície da gelatina, como formação e estabilização de emulsões e espumas e a formação de filmes (RAMOS et al., 2016; SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

Embalagens e coberturas à base de gelatina têm sido relatadas com potencial aplicação para proteção, preservação e aumento da vida útil de alguns alimentos. Entretanto, o caráter hidrofílico e higroscópico da gelatina faz com que a matriz filmogênica de embalagens e coberturas inchem ou se dissolvam ao entrarem em contato com alimentos de umidade elevada (RAMOS et al., 2016). A incorporação de algumas substâncias, como agentes reticulantes, agentes de reforço e/ou aditivos com poder antioxidante e antimicrobiano, é utilizada para melhorar as propriedades das matrizes à base de gelatina, além de aumentar a vida de prateleira dos alimentos (BENJAKUL; NAGARAJAN; PRODPRAN, 2016; LIU et al., 2015). Além disso, a mistura da gelatina com outros biopolímeros pode ser uma estratégia para melhorar as propriedades dos filmes obtidos, quando comparados aos filmes de gelatina pura (GÓMEZ-ESTACA et al., 2011a). A estrutura e composição molecular da gelatina permite a reticulação da matriz filmogênica quando certos aditivos (ex.: glutaraldeído, genipina, glioxal, transglutaminase) são incorporados nela (BENJAKUL; NAGARAJAN; PRODPRAN, 2016) (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama do mecanismo de formação de filmes de gelatina e suas interações

Fonte: Adaptado de Benjakul, Nagarajan e Prodpran (2016)

3.1.2 Filmes à base de quitosana

A quitosana é um polissacarídeo obtido pela desacetilação da quitina (Figura 3), que, geralmente, é realizada por tratamento alcalino (AGULLÓ et al., 2003; ELSABEE; ABDU, 2013; SHEPHERD; READER; FALSHAW, 1997). A quitina é um homopolissacarídeo linear, branco, duro e inelástico, que atua como elemento estrutural em exoesqueletos de animais, como caranguejos, camarões, lagostas e insetos, e também na parede celular de fungos, como o cogumelo (DUTTA; RAVIKUMAR; DUTTA, 2002; NELSON; COX, 2014), cuja maior parte da extração é destinada a obtenção de quitosana (BAUTISTA-BAÑOS; ROMANAZZI; JIMÉNEZ-APARICIO, 2016).

As unidades desacetiladas da quitosana estão organizadas, e permitem que ela seja solúvel em meio ácido, através da ionização dos grupos amino (BAUTISTA-BAÑOS; ROMANAZZI; JIMÉNEZ-APARICIO, 2016). Dependendo do tipo do ácido empregado para

solubilização da quitosana, há a formação de um complexo que combina as propriedades da quitosana e do ácido (MUXIKA et al., 2017).

Figura 3 - Estrutura química da quitina e quitosana

Fonte: Adaptado de Muxika et al. (2017)

A quitosana têm sido aplicada em diversos estudos, tais como, sobre liberação de medicamentos, tratamento de água, membranas, hidrogéis, medicina, adesivos, antioxidantes e embalagens de alimentos (HONARKAR; BARIKANI, 2009). A quitosana tem potencial aplicação no desenvolvimento de filmes biopoliméricos devido às suas propriedades únicas, tais como a biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade, além de ser obtida de fontes renováveis e apresentar naturalmente poder antimicrobiano (BARIKANI et al., 2014; VAN DEN BROEK et al., 2015). Os filmes produzidos com quitosana podem ser utilizados como película de recobrimento de alimentos, ou serem aplicados diretamente sobre o produtos, como coberturas, para aumentar a segurança dos alimentos e o prazo de validade (VAN DEN BROEK et al., 2015), visto que esses filmes têm apresentado elevada atividade antimicrobiana (LECETA et al., 2013, 2015).

Além disso, filmes à base de quitosana apresentam elevada resistência, mas alta permeabilidade ao vapor d'água (BONILLA et al., 2018; KAYA et al., 2018a). Para se produzir filmes ativos de quitosana, diversos aditivos têm sido incorporados à matriz filmogênica, como extrato de folha de murta (SILVA-WEISS et al., 2013), óleos essenciais de manjerição e tomilho (BONILLA et al., 2012), extrato da fruta e óleo da semente de *Berberis crataegina* (KAYA et al., 2018a), entre outros. Blendas de quitosana e outros biopolímeros também têm sido estudadas, visando melhorar algumas propriedades físicas dos filmes, como a umidade, permeabilidade ao vapor de água e resistência (VAN DEN BROEK et al., 2015).

3.1.3 Filmes à base de blendas gelatina/quitosana

A elaboração de filmes a base de blenda de gelatina-quitosana (FAKHREDDIN et al., 2013; JRIDI et al., 2014) e a incorporação de aditivos à essas blendas, tais como óleos essenciais de eugenol e gengibre (BONILLA et al., 2018), extratos etanólicos de alecrim, canela, boldo-do-chile e guaraná (BONILLA; SOBRAL, 2016), óleos essenciais de cravo-da-índia, cipreste, erva-doce, lavanda, erva-da-cruz, pinheiro e alecrim (GÓMEZ-ESTACA et al., 2010), ácido cítrico (URANGA et al., 2019, RAMZIIA et al., 2018), nanoemulsões carregadas com óleo de canola incorporado com cinamaldeído e α -tocoferol (PÉREZ CÓRDOBA; SOBRAL, 2017), tem sido reportadas nos últimos anos.

Bonilla e Sobral (2016) relataram que a incorporação de extratos hidroetanólico de alecrim, canela, boldo-do-chile e guaraná em filmes de gelatina-quitosana, aumentaram significativamente a atividade antioxidante dos filmes, além de apresentarem atividade antimicrobiana considerável, sem afetar negativamente as propriedades físico-químicas. De acordo com Gómez-Estaca et al. (2010), a adição de óleo essencial de cravo-da-índia em filmes gelatina-quitosana, que foram aplicados em peixes refrigerados, retardou e até mesmo inibiu o crescimento de microrganismos patógenos e a ocorrência de nitrogênio volátil total.

Segundo Taravel e Domard (1995), ocorrem interações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre a gelatina e a quitosana, visto que a quitosana é um polieletrólito. Essas interações explicam a alta compatibilidade entre ambos os biopolímeros (QIAO et al., 2017a), reportada através de análise térmica e microestrutural (BONILLA; SOBRAL, 2016; JRIDI et al., 2014), análise de Difração de Raios-X (PEREDA et al., 2011) e de Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (BONILLA; SOBRAL, 2016; PEREDA et al., 2011). Esses filmes produzidos foram, portanto, mecanicamente mais resistentes e menos permeáveis quando comparados aos filmes provenientes dos polímeros puros (FAKHREDDIN et al., 2013).

3.2 FILMES ATIVOS

Segundo a legislação para embalagens de alimentos da União Europeia (European Commission, 2004), “os materiais ativos podem incorporar deliberadamente substâncias que se destinam a ser liberadas para os alimentos ou absorver substâncias dos alimentos”. Portanto, filmes ativos podem ser utilizados na produção de embalagens ativas, que podem desempenhar

um papel importante na extensão da vida de prateleira dos alimentos, interagindo com o produto ou com o espaço entre a embalagem e o produto (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002, SANCHES-SILVA et al., 2014).

As embalagens flexíveis ativas são produzidas com filmes ativos, que por sua vez, foram ativados pela incorporação de aditivos que lhes conferem uma variedade de atividades, o que permite aumentar o poder de conservação do sistema de embalagem (RESTUCCIA et al., 2010), através do retardo de processos de degradação dos alimentos, como por exemplo o crescimento microbiano e a oxidação lipídica (LORENZO; BATLLE; GÓMEZ, 2014). Alguns aditivos de embalagens ativas possuem capacidade de absorver, eliminar ou liberar oxigênio, dióxido de carbono, umidade e aromas, liberar antioxidantes, conservantes e antimicrobianos, além de controlar a temperatura (RESTUCCIA et al., 2010) (Tabela 1).

Tabela 1 - Exemplos de aplicação de embalagens ativas para o uso na indústria de alimentos

Propriedades absorventes /eliminadoras	Oxigênio, dióxido de carbono, etileno, aromas, luz UV
Propriedades de liberação/emissão	Etanol, dióxido de carbono, antioxidantes, conservantes, dióxido de enxofre, aromas, pesticidas
Propriedade de remoção	Catalisando a remoção de componentes alimentares: lactose, colesterol
Controle de temperatura	Materiais isolantes, embalagens com auto aquecimento e auto resfriamento, susceptíveis de micro-ondas e modificadores, embalagens sensíveis a temperatura
Controle microbiano e de qualidade	Superfície de materiais de embalagem tratadas com UV

Fonte: Adaptado de Restuccia et al. (2010)

Aditivos naturais provenientes de fontes renováveis têm mostrado potencial aplicação para produção de embalagens ativas, principalmente devido a demanda dos consumidores, que estão cada vez mais buscando alimentos com a menor quantidade de aditivos artificiais possível, visto que alguns desses são prejudiciais à saúde (LORENZO et al., 2014; SANCHES-SILVA et al., 2014). Na Tabela 2 estão apresentados estudos recentes relacionados com a produção de filmes ativos contendo aditivos naturais, bem como as atividades apresentadas por esses filmes.

Tabela 2 - Estudos recentes relacionados com a adição de aditivos naturais para produção de filmes ativos

Matriz filmogênica	Aditivos naturais	Propriedades ativas	Referências
Alginato	Extrato de chá verde e de semente de uva	Antioxidante antiviral	e Fabra et al. (2018)
Amido de mandioca	Extrato de alecrim	Antioxidante	Piñeros-Hernandez et al. (2017)
Blenda gelatina-quitosana	Extratos etanólicos de alecrim, canela, boldo-do-chile e guaraná	Antioxidante antimicrobiana	e Bonilla e Sobral (2016)
Gelatina	Extrato etanólico de cúrcuma	Antioxidante	Bitencourt et al. (2014)
Gelatina	Óleos essenciais de gengibre e eugenol	Antioxidante	Bonilla et al. (2018)
Gelatina	Rutina nanoemulsionada	Antioxidante	Dammak et al. (2017)
Isolado de proteína de soja	Extrato de mirtilho	Antioxidante	Zhang et al. (2010)
Mucilagem de semente de marmelo	Óleos essenciais de orégano e tomilho	Antioxidante antimicrobiana	e Jouki et al. (2014)
Proteína de soro de leite	Extrato de alecrim	Antioxidante antimicrobiana	e Andrade et al. (2018)
Quitosana	Óleo essencial de <i>Zataria multiflora</i> Boiss	Antioxidante antimicrobiana	e Moradi et al. (2012)
Quitosana	Extrato da fruta e óleo da semente de <i>Berberis crataegina</i>	Antioxidante antimicrobiana	e Kaya et al. (2018)

Fonte: autoria própria

Além da atividade antioxidante dos filmes de gelatina com adição de extrato etanólico de cúrcuma (Tabela 2), Bitencourt et al. (2014) reportaram, por exemplo, que houve aumento

na tensão à ruptura, diminuição da permeabilidade ao vapor d'água e melhoramento das propriedades de barreira à luz visível e ultravioleta dos filmes. Dammak et al. (2017a) publicaram recentemente, que a incorporação de rutina nanoemulsionada em filmes de gelatina melhorou suas propriedades mecânicas, aumentando significativamente a resistência dos filmes ao estresse mecânico, e da atividade antioxidante (DAMMAK et al., 2017).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas para incorporação de aditivos provenientes de fontes naturais na produção desses filmes, incluindo a adição direta de extratos e óleos essenciais na solução filmogênica (BITENCOURT et al., 2014; JOUKI et al., 2014; KANATT; CHAWLA, 2018) e a adição desses componentes encapsulados em emulsões e nano emulsões (DAMMAK et al., 2017; PÉREZ-CÓRDOBA et al., 2017). A utilização de aditivos emulsionados tem-se mostrado vantajosa no sentido de proteger os componentes antioxidantes e antimicrobianos, além de controlar e prolongar a liberação deles em embalagens ativas.

3.2.1 Agentes antioxidantes

Os agentes antioxidantes podem ser definidos como substâncias que são capazes de prevenir ou retardar a oxidação de compostos dos alimentos, pela inibição de radicais livres ou propagação dos mesmos, e podem ser utilizados para prevenir a oxidação em alimentos (AZIZ; KARBOUNE, 2016). Reações químicas e bioquímicas são responsáveis por uma série de alterações sensoriais e de segurança nos alimentos, sendo a oxidação uma das principais reações que ocorre nos alimentos (FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L., 2010; YANG et al., 2018). Os lipídeos, notadamente os ácidos graxos insaturados, são as moléculas mais susceptíveis a sofrerem oxidação nos alimentos, ocasionando alterações indesejadas no sabor, odor e textura, podendo inclusive comprometer a segurança do alimento pela produção de substâncias tóxicas (ORTEGA-RAMIREZ et al., 2014; YANG et al., 2018).

Geralmente os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, sendo que os primeiros são compostos por enzimas e/ou cofatores enzimáticos, enquanto os antioxidantes não enzimáticos podem ser obtidos sinteticamente ou de fontes naturais (AUGUSTYNIAK et al., 2010). Existem diversas classes de antioxidantes não enzimáticos, entretanto os polifenóis, como por exemplo, os ácidos fenólicos e flavonoides, são a maior classe encontrada (BUNACIU et al., 2016).

Os antioxidantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos, tais como BHA (butil hidroanisol), BHT (butil hidroxitoloueno) e PG (propil galato), possuem estrutura fenólica,

que permite a doação de um elétron para um radical livre de outra molécula, interrompendo o mecanismo de oxidação, além de serem capazes de estabilizarem o radical formado na própria estrutura fenólica (BREWER, 2011). Entretanto, esses antioxidantes (BHT, BHA e PG) têm sido considerados com potencial carcinogênico (ITO; FUKUSHIMA; TSUDA, 1985). Neste sentido, a utilização de antioxidantes provenientes de fontes naturais tem sido estudada para substituir ou diminuir a utilização de antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia.

As principais fontes de antioxidantes naturais são as frutas, plantas medicinais e aromáticas, especiarias, entre outras plantas (AUGUSTYNIAK et al., 2010). Esses tecidos vivos estão sob constante estresse oxidativo de radicais livres, e por esta razão, desenvolveram sistemas antioxidantes para combater os radicais livres, incluindo substâncias como carotenoides, flavonoides, ácidos fenólicos e α -tocoferóis (BREWER, 2011). Um exemplo de especiaria comumente utilizada na culinária e que possui alta atividade antioxidante são as folhas de alecrim (YANG et al., 2018). O extrato hidroetanólico de folhas de alecrim possui elevada quantidade de ativos antioxidantes, como diterpenos fenólicos, flavonoides e ácidos fenólicos (HO et al., 2000).

Outros exemplos de plantas que estão sendo estudadas para avaliação do potencial antioxidante são extrato de tomilho (MORITA et al., 2017), extrato de folhas de hibisco (ZHEN et al., 2016), extrato de diferentes espécies de salvia (ZENGIN et al., 2018), óleo essencial de capim-limão (ANGGRAENI et al., 2018), óleo essencial de folha e rizoma de cúrcuma (JENA et al., 2017), entre muitos outros. Recentemente, em uma nova abordagem, outras plantas que não especiarias, tem também sido estudadas. Nesse contexto, folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) tem sido estudadas sobre suas propriedades ativas, e seu extrato aquoso e hidroetanólico tem sido relatado como potencial antioxidante (LORENZO et al., 2018; VARGAS et al., 2016).

3.2.2 Agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos são substâncias que possuem propriedades antimicrobianas, contendo componentes que inibem ou retardam o crescimento de microrganismos quando em contato com o alimento (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; DURAN et al., 2016; KIM et al., 2008). O crescimento de microrganismos é uma das principais causas de deterioração em alimentos, através de mudanças sensoriais e produção de toxinas nos mesmos (NEGI, 2012). Além disso, a maioria das doenças transmitidas via alimento são causadas pela ingestão de

alimentos contendo microrganismos patogênicos, e, portanto, a segurança dos alimentos é umas das maiores preocupações dos consumidores, órgãos regulamentadores e indústria de alimentos (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; NEGI, 2012; PISOSCHI et al., 2018).

Diversas técnicas não convencionais estão sendo desenvolvidas para garantir a segurança microbiológica dos alimentos, visto que os métodos tradicionais podem causar efeitos sensoriais e perdas nutricionais indesejadas, como o processamento térmico, que mantém o alimento em temperaturas que variam de 60 e 100 °C durante vários segundos a vários minutos (PISOSCHI et al., 2018; TIWARI et al., 2009). Além disso, alguns conservantes comumente utilizados, como nitratos, benzoatos, sulfitos, sorbatos e formaldeídos estão sendo associados a problemas de saúde, além de perdas nutricionais (RAI et al., 2016; SULTANA et al., 2014).

Óleos essenciais e extratos de plantas, inteiras ou partes dela, são excelentes fontes de agentes antimicrobianos naturais e possuem potencial aplicação em alimentos pra aumentar a segurança microbiológica e substituir, ou agir em sinergismo, com os métodos tradicionais de conservação de alimentos (HINTZ; MATTHEWS; DI, 2015; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). Entretanto, o mecanismo de ação antimicrobiana e a relação estrutura-função dos compostos provenientes de fontes botânicas são pouco elucidados (GYAWALI; IBRAHIM, 2014). Sabe-se que os polifenóis, como flavonoides e ácidos fenólicos, presentes em extratos e óleos essenciais de plantas, têm desempenhado papel importante na prevenção de crescimento de microrganismos (DAGLIA, 2012). Além dos polifenóis, compostos encontrados nas plantas, como quinonas, saponinas, taninos, terpenóides e alcaloides, também podem atuar como agentes antimicrobianos (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Os compostos fenólicos e terpenóides agem alterando a permeabilidade das membranas celulares dos microrganismos, pois interagem com as proteínas presentes nas membranas e ocasionam assim a perda de biomoléculas do interior das células, além de afetarem processos como o transporte de elétrons, síntese proteica, absorção de nutrientes e atividade enzimática (PISOSCHI et al., 2018). Os fenóis e flavonoides também são capazes de quelar metais, bem como os alcaloides afetam o material genético dos microrganismos (NEGI, 2012). Alguns peptídeos, que são derivados de proteínas produzidos por plantas, também tem sido relatados como bons agentes antimicrobianos, podendo ser extraídos de folhas, caules, raízes sementes e flores (RAI et al., 2016).

Óleo essencial de canela e extrato etanólico de ruibarbo (HAN et al., 2014), extrato de casca de manga (KANATT; CHAWLA, 2018), extrato de romã e de semente de uva (DURAN

et al., 2016), óleo essencial de orégano (JOUKI et al., 2014) e óleo essencial de alecrim (SIROCCHI et al., 2017) são exemplos de extratos e óleos essenciais de plantas, frutas ou especiarias, e que apresentam ação contra uma série de microrganismos, retardando ou inibindo o crescimento destes. De plantas não convencionais, o extrato aquoso de folha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L), apresentou propriedades antimicrobianas contra as bactérias gram positivas, gram negativas e psicotróficas testadas em carne bovina (VARGAS, 2015).

3.2.3 *Eugenia uniflora* L.

A *Eugenia uniflora* L., popularmente conhecida no Brasil como pitangueira (Figura 4), é uma planta arbórea da família Myrtaceae e é amplamente encontrada no Brasil e em alguns países da América do Sul (DOS SANTOS et al., 2018), e seu fruto, comestível, é comumente chamado de pitanga ou cereja brasileira (RATTMANN et al., 2012). Atualmente, a pitangueira tem sido cultivada na América Central, Caribe, áreas tropicais do Estados Unidos, sul da África, Israel e alguns países do mediterrâneo (MARTINEZ-CORREA et al., 2010).

Figura 4 - Fotografia da pitanga e folhas de pitangueira

Fonte: autoria própria

O chá das folhas de pitangueira é utilizado na medicina popular, principalmente no auxílio de tratamento de doenças como hipertensão, gota, diabetes e problemas estomacais (AURICCHIO; BACCHI, 2003). O extrato hidroetanólico das folhas de pitangueira não é

considerado citotóxico ou genotóxico, e provavelmente, a ação terapêutica do chá das folhas na medicina popular está relacionada com a elevada atividade antioxidante encontrada no extrato das folhas (DA CUNHA et al., 2016). Na indústria de produtos cosméticos no Brasil, o óleo essencial de folhas de pitangueira é utilizado para produção de xampus, condicionadores, produtos faciais e corporais e perfumes, devido ao seu efeito adstringente associado ao seu aroma agradável (AMORIM et al., 2009).

Em relação a aplicação em alimentos, Vargas (2015) e Vargas et al. (2016), relataram que o extrato aquoso de folhas de pitangueira apresentou elevada atividade antioxidante e atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas, gram negativas e psicotróficas, quando testado em carne bovina. A ação antimicrobiana e antioxidante do extrato das folhas de pitangueira é relacionada aos diversos componentes que podem ser encontrados na folha, como flavonoides, terpenóides, taninos, antraquinonas e cineol (AMORIM et al., 2009). Desta forma, estudos relacionados com a aplicação de extrato de folhas de pitangueira como aditivo natural para a indústria de alimento, em substituição ou redução aos antioxidantes e antimicrobianos sintéticos, são promissores.

3.3 EMULSÕES

Emulsões simples são sistemas formados por dois líquidos imiscíveis, onde um líquido encontra-se disperso no outro na forma de gotas. Em geral, as emulsões podem ser do tipo óleo-em-água (O/A), sendo o óleo a fase dispersa, ou descontínua, e a água a fase dispersante, ou contínua, e água-em-óleo (A/O), onde a água é a fase dispersa e o óleo a fase contínua. Estes sistemas são termodinamicamente instáveis, podendo ocorrer processos de desestabilização como floculação, “creaming”, coalescência e inversão de fases (GUTIÉRREZ et al., 2008; KALE; DEORE, 2016; SCHICK, 1987).

Uma das formas de produzir emulsões é por meio da homogeneização de dois líquidos imiscíveis com a presença de um emulsificante, que diminui a tensão interfacial entre ambas as fases (KALE; DEORE, 2016). Os emulsificantes são moléculas anfifílicas que, durante a homogeneização, adsorvem na interface da fase dispersa e da fase dispersante, reduzindo as forças repulsivas através da formação de uma camada interfacial (GUZEY; MCCLEMENTS, 2006; MORAIS, 2013).

As emulsões podem ser aplicadas em alimentos, cosméticos, medicamentos, tintas, na agricultura, entre outras áreas. Além disso, as emulsões têm sido utilizadas para encapsulação

de substâncias ativas, visando a proteção desses componentes e controle da taxa de sua liberação (DAMMAK; SOBRAL, 2017; MORAES-LOVISON, 2017; SCHICK, 1987). Compostos ativos encapsulados através da formação de emulsões têm sido utilizados para produção de filmes ativos (DAMMAK et al., 2017; PÉREZ-CÓRDOBA; SOBRAL, 2017).

3.3.1 Emulsões duplas

Além das emulsões do tipo água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A), existem emulsões mais complexas conhecidas como emulsões duplas. Nesses sistemas, coexistem emulsões com morfologia A/O e O/A, ou seja, as emulsões duplas são emulsões de emulsões (DICKINSON, 2011; GARTI; BISPERINK, 1998; MUSCHLIOLIK; DICKINSON, 2017). Os dois principais tipos de emulsões duplas são água-em-óleo-em-água (A/O/A) (Figura 5), onde as fases aquosas interna e externa são separadas por uma fase lipídica, e óleo-em-água-em-óleo (O/A/O), na qual a fase aquosa separa as fases lipídicas interna e externa (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Figura 5 - Micrografia típica de uma emulsão dupla A/O/A

Fonte: Adaptado de Florence & Whitehill (1982)

As emulsões duplas são geralmente preparadas por emulsificação em duas etapas. Para a produção de uma emulsão dupla do tipo A/O/A, a primeira etapa consiste na produção de uma emulsão primária (A/O), utilizando um emulsificante predominantemente hidrofóbico, visto

que a fase contínua é a fase lipídica. Posteriormente, a primeira emulsão formada é dispersa em uma fase aquosa dispersante, contendo emulsificante predominantemente hidrofílico (FLORENCE; WHITEHILL, 1982; GARTI, 1997; SCHUCH et al., 2013).

Existem muitos estudos envolvendo a aplicação de emulsões duplas (Tabela 3). Entretanto, a aplicação de interesse nesta dissertação envolve sua capacidade de encapsular e proteger compostos sensíveis ao oxigênio, variações de pH e luz, como no caso de compostos ativos, nutrientes e alguns fármacos, por exemplo (GIROUX et al., 2013; MUSCHLIOLIK; DICKINSON, 2017). Não se encontrou trabalhos sobre a aplicação de emulsões duplas na tecnologia de filmes ativos. E continuando assim, isso constituirá na originalidade desta dissertação.

Além de encapsular e proteger os componentes ativos, nutricionais e fármacos, a emulsão dupla pode atuar como um sistema de liberação controlada dessas substâncias, visto que os componentes encapsulados na fase interna devem transpor duas outras fases para serem liberados, prolongando assim a ação dos compostos encapsulados (FLORENCE; WHITEHILL, 1982). Segundo Qi, Wang e Zhu (2011), a encapsulação do fármaco Pidotimod com emulsão dupla aumentou a biodisponibilidade do mesmo quando testado em ratos, em relação ao fármaco não encapsulado (QI; WANG; ZHU, 2011). Kaimainen et al. (2015) relataram que o pigmento betalaína foi eficientemente encapsulado pela emulsão dupla A/O/A, obtendo maior estabilidade do bioativo e promovendo uma liberação controlada no intestino.

Embora as emulsões duplas estejam sendo amplamente aplicadas para encapsulação de compostos ativos e fármacos (Tabela 3), estudos envolvendo a produção de emulsão dupla contendo compostos ativos encapsulados para aplicação em filmes ativos são escassos.

Tabela 3 - Potenciais aplicações de emulsões duplas do tipo A/O/A

Aplicação	Referências
Proteger e controlar a liberação de compostos fenólicos provenientes do extrato da folha de oliveira, encapsulado na fase aquosa interna	Mohammadi et al. (2016)
Encapsular, na fase aquosa interna, extrato de semente de uva rico em procianidina	Berendsen, Güelle Ferrando (2015)
Encapsular, na fase aquosa interna, alta concentração de resveratrol	Matos et al. (2018)
Encapsular a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA) na fase aquosa interna	Martinez et al. (2017)
Encapsular insulina na fase aquosa interna, para preservar a estabilidade, controlar a atividade biológica e controlar a liberação da droga	Mutaliyeva et al. (2017)
Encapsular o corante betalaína na fase aquosa interna e controlar a liberação do corante no intestino <i>in vitro</i>	Kaimainen et al. (2015)
Encapsular antocianinas provenientes do extrato de hibisco na fase aquosa interna e promover maior estabilidade do ativo em relação às mudanças de temperatura	De Moura et al. (2018)
Encapsular o fármaco Pidotimod na fase aquosa interna e aumentar a biodisponibilidade do mesmo em ratos	Qi, Wang e Zhu (2011)

Fonte: autoria própria

3.3.2 Emulsificantes

Os emulsificantes são moléculas anfifílicas que se adsorvem na interface das fases de uma emulsão, diminuindo a tensão interfacial entre elas e aumentando a estabilidade das emulsões. A utilização de emulsificantes é essencial para a produção de emulsões duplas, pois, embora o seu desenvolvimento potencialmente interessante para encapsulação de compostos,

um dos problemas que podem limitar a sua ação é a sua instabilidade inerente. Para as emulsões do tipo A/O/A, os principais mecanismos de desestabilização incluem a coalescência de fases aquosa interna, separação gravitacional ou de fases e floculação (Figura 6) (DICKINSON, 2011; OPAWALE; BURGESS, 1998).

Figura 6 - Representação esquemática dos principais mecanismos de desestabilização de emulsões duplas

Fonte: Adaptado de McClements e Jafari (2018).

Para produzir emulsões duplas, faz-se o uso de agentes emulsificantes apropriados nas diferentes fases da emulsão. Além de aumentar a estabilidade das emulsões, os emulsificantes também determinam a facilidade com que a emulsão é formada e as características do produto final (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). Alguns tipos de moléculas são comumente utilizados como emulsificantes, tais como tensoativos de baixo peso molecular, fosfolípídeos, proteínas e polissacarídeos (Figura 7).

Figura 7 - Principais tipos de emulsificantes utilizados para estabilizar emulsões

Fonte: Adaptado de McClements e Jafari (2018)

No caso de emulsões duplas do tipo A/O/A, um emulsificante predominantemente hidrofóbico dissolvido na fase lipídica é utilizado para a primeira etapa de emulsificação (A/O), ou seja, emulsificantes que possuam valores de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) baixos (1 a 9), pois a fase contínua e em maior proporção é a fase lipídica (MUSCHIOLIK; DICKINSON, 2017). Um emulsificante hidrofóbico amplamente utilizado e demonstrado elevada eficiência para estabilizar emulsões do tipo A/O é o Polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) (DICKINSON, 2011). O PGPR é um emulsificante oligomérico, não iônico, produzido pela esterificação de ácidos graxos de óleo de mamona com poliglicerol, e é comumente usado na produção de chocolate (FRAJ et al., 2017).

Para a segunda etapa de emulsificação, ou seja, a dispersão da primeira emulsão (A/O) na fase aquosa externa, utiliza-se um emulsificante predominantemente hidrofílico disperso na fase aquosa externa. Estes emulsificantes possuem altos valores de HLB (11 a 20), visto que a fase dispersante é a água (MUSCHIOLIK; DICKINSON, 2017). O Monooleato de Polioxietileno Sobitano (Tween 80), é um emulsificante hidrofílico não iônico que pode, rapidamente e efetivamente, reduzir a tensão interfacial entre as duas fases da emulsão (GOMES; COSTA; CUNHA, 2018). A combinação de emulsificantes PGPR e Tween 80 para

produção de emulsões duplas tem sido relatada como adequada e eficiente (MUSCHIOLIK; DICKINSON, 2017).

3.3.3 Métodos de emulsificação

Alguns dos métodos de emulsificação envolvem o cisalhamento de alta velocidade (principalmente o equipamento rotor-estator), a homogeneização de alta pressão e o homogeneizador ultrassônico, dentre outros (MUSCHIOLIK; DICKINSON, 2017) (Tabela 4). A emulsificação de uma emulsão dupla do tipo A/O/A consiste em dois passos: a preparação da primeira emulsão (A/O), dispersando a fase aquosa interna na fase lipídica, em determinada proporção. Em seguida, a segunda etapa consiste na dispersão da primeira emulsão na fase aquosa externa (A/O/A). A segunda etapa da emulsificação é crítica, visto que condições de alto cisalhamento podem romper as gotículas aquosas internas, e portanto, as condições dessa etapa devem ser mais brandas quando comparadas a primeira etapa de emulsificação (SOUILEM et al., 2014).

Os diferentes tipos de homogeneizadores podem ser utilizados sozinhos em conjunto com outros (Tabela 4). Leong et al. (2018) compararam o diâmetro médio de gotas e estabilidade de emulsões duplas produzidas utilizando homogeneizador ultrassônico e homogeneizador de alta pressão na segunda etapa de emulsificação. Ambos os tratamentos produziram gotas estatisticamente similares, entretanto, as emulsões produzidas com homogeneizador ultrassônico apresentaram maior eficiência de encapsulamento e maior estabilidade (LEONG et al., 2018).

O ultrassom é geralmente definido como som em frequências acima de 16 kHz (LEONG; MARTIN; ASHOKKUMAR, 2017). A homogeneização por ultrassom ocorre com a aplicação de um campo sonoro na amostra, que produz ondas interfaciais que se tornam instáveis a medida que se propagam através do fluido, resultando na erupção da fase dispersa na fase contínua em forma de gotas médias a grandes (THOMPSON; DORAISWAMY, 1999). Posteriormente, a cavitação acústica produz cisalhamento extremo e quebrando as gotículas inicialmente formadas em gotículas de tamanhos menores (LEONG; MARTIN; ASHOKKUMAR, 2017; THOMPSON; DORAISWAMY, 1999). A homogeneização por ultrassom é uma tecnologia versátil e eficaz, além de ser relativamente simples de operar.

Tabela 4 - Exemplos de diferentes métodos de emulsificação para produção de emulsões tipo A/O/A

Homogeneizadores 1ª etapa	Condições de operação 1ª etapa	Homogeneizadores 2ª etapa	Condições de operação 2ª etapa	Referências
Homogeneizador de alta velocidade	15000 rpm, 10 minutos	Homogeneizador de alta velocidade	5000 rpm, 2 minutos	Matos et al. (2018)
Homogeneizador ultra-agitação	12000 rpm, 5 minutos	Homogeneizador rotor-estator	4500 rpm, 5 minutos	Pimentel-Moral el al. (2018)
Homogeneizador ultra-agitação; homogeneizador de alta pressão	5000 rpm, 5 minutos; 140 MPa, 1 ciclo	Homogeneizador rotor-estator	5000 rpm, 5 minutos	Souilem et al. (2014)
Homogeneizador ultrassônico	20 kHz, 30% de amplitude, 10 W de potência, por 90 segundos	Homogeneizador ultrassônico ou homogeneizador rotor-estator e homogeneizador de alta pressão	20 kHz, 20% de amplitude, 6 W de potência, 90 segundos; 4500 rpm, 2 minutos e 30 a 20 MPa, 1 ciclo	Leong et al. (2018)
Homogeneizador ultrassônico	20 kHz, 40% de amplitude, 90 a 150 segundos	Homogeneizador ultrassônico	20 kHz, 20% de amplitude, 15 a 120 segundos	Leong et al. (2016)

Fonte: autoria própria

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L) (verdes e com aspecto homogêneo) foram coletadas ao longo dos experimentos (abril/2018 e setembro/2019) na cidade de Pirassununga, Brasil, no Campus da Universidade de São Paulo (USP), e foram utilizadas para produção do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP), que foi utilizado como fase aquosa interna da emulsão A/O/A.

Óleo de soja foi comprado da Cargill (PR, Brasil). O emulsificante GRINDSTED® PGPR foi doado pela DuPont (SP, Brasil). O caseinato de sódio (> 90% pureza) foi doado pela Fonterra (Auckland, Nova Zelândia). O emulsificante Polisorbato 80 (Tween 80), a quitosana de peso molecular médio (grau de desacetilação de 75-85% e viscosidade de 200-800 Cps), a gelatina bovina tipo B e os reagentes ácido gálico, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ABTS⁺ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico), Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), TPTZ (2,4,6-Tri-(2-Piridil)-1,3,5-Triazina) foram comprados da Sigma-Aldrich (SP, Brasil). Os reagentes Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio e persulfato de potássio foram comprados da Merck. O glicerol e o álcool etílico foram comprados da marca Synth (SP, Brasil). O corante Rodamina b foi comprado da marca Dinâmica (SP, Brasil). Para as análises microbiológicas de bactérias, os caldos *Tryptic Soy Broth* (TSB) e *Brain Heart Infusion* (BHI) foram comprados da Acumedia® (SP, Brasil), além do ágar *Mueller Hinton* comprado Dfco™ (SP, Brasil). As cepas utilizadas para as análises microbiológicas foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Salmonella ssp* (ATCC 13076).

4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE FOLHA DE PITANGUEIRA (EHFP)

4.2.1 Produção do EHFP

As folhas de pitangueira foram colhidas, selecionadas e lavadas com água corrente e hipoclorito de sódio. Posteriormente, foram submetidas a secagem em estufa de circulação

forçada à 42 °C por 72 horas (MA035/5, Marconi, Brasil) (GARMUS et al., 2014). As folhas secas foram trituradas com um liquidificador comercial, peneiradas em peneira de 48 *mesh* para uniformização do tamanho das partículas e armazenadas protegidas da luz e sob refrigeração, até a produção do extrato (VARGAS, 2015).

Para produção do EHFP (Figura 8), o pó da folha de pitangueira foi dispersado em etanol 60% (6:4 etanol:água), na proporção de 1 g de pó da folha/10 mL da solução hidroetanólica. A dispersão foi submetida a ultrassom (1440 DA, Odontobras, Brasil) por 40 minutos a 25 °C e, posteriormente, aquecida a 80 °C em agitador magnético com aquecimento (AA – 2050, Gehaka, Brasil), na ausência de luz, por 30 minutos. Em seguida, a dispersão foi filtrada em papel filtro (Whatman, nº1) e concentrada em um evaporador rotativo (TE211, Tecnal, Brasil). O EHFP rotoevaporado foi liofilizado (Powerdry LL300, THERMO-HETO, Brasil) e armazenado na ausência de luz e sob refrigeração (LORENZO et al., 2018). Para a produção da emulsão A/O/A, o EHFP liofilizado foi ressuspensionado em água deionizada, na proporção de 1g de EHFP/10 mL de água deionizada. A solução obtida foi armazenada em ausência de luz e sob refrigeração, por no máximo 24 horas antes da produção das emulsões.

Figura 8 - Imagens das etapas de produção do EHFP

Fonte: autoria própria

4.2.2 Atividade antioxidante do EHFP

4.2.2.1 Determinação dos compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR)

Os compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) foram determinados segundo a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Inicialmente, foram misturados 0,5 mL do EHFP adequadamente diluído em água

(1000 vezes) e 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v). Após 5 minutos, foram adicionados 2,0 mL de solução saturada de carbonato de sódio 7% (m/v) e, então, as amostras foram armazenadas em repouso durante 2 horas, protegidas da luz. Após o repouso, a absorbância foi lida em espectrofotômetro Lambda 35 UV/Visível zerado com água (Lambda 25 UV/Vis, Perkin Elmer, EUA), em 760 nm. A curva padrão foi construída com padrões de ácido gálico e o resultado obtido foi expresso em mg Equivalente ácido gálico (GAE)/g de EHFP em base seca.

4.2.2.2 Método de captura do radical livre ABTS^{•+}

Para o método de captura do radical livre ABTS^{•+} (RE et al., 1999), inicialmente preparou-se a solução de ABTS (solução de ABTS^{•+} 7 mM com solução de persulfato de potássio 2,45 mM), que ficou reagindo por 16 horas em ausência de luz. Após o período de reação, diluiu-se a solução de ABTS em etanol (100 vezes) e corrigiu-se a absorbância em espectrofotômetro Lambda 35 UV/Visível zerado com etanol (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), à 734 nm, para $0,65 \pm 0,05$. As amostras foram preparadas reagindo 30 µL do EHFP previamente diluído em etanol (400 vezes) com 3 mL da solução de ABTS^{•+}. Os brancos foram preparados substituindo-se a solução de ABTS por etanol. Após 6 minutos de reação, as amostras foram lidas no espectrofotômetro (734 nm) e os resultados foram calculados com a auxílio de uma curva padrão, que foi estabelecida com reagente Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido-carboxílico). Os resultados foram expressos em mg Equivalente trolox (TE)/g de EHFP em base seca (RE et al., 1999).

4.2.2.3 Método de captura do radical livre (DPPH)

Para o ensaio de DPPH, utilizou-se a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações. Inicialmente, preparou-se a solução etanólica contendo os radicais DPPH (60 µM), que teve a absorbância lida em espectrofotômetro Lambda 35 UV/Visível zerado com etanol (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), à 515 nm, e corrigida para $0,75 \pm 0,05$. Em seguida, preparou-se 5 diluições do EHFP em etanol (50, 100, 150, 200 e 150 vezes), em triplicata. Reagiu-se 90 µL de cada diluição do EHFP com 3,9 mL de solução de DPPH. Para os brancos, substituiu-se a solução de DPPH por etanol. Após 12 minutos de reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (515 nm). A

atividade antioxidante foi expressa em EC₅₀, através de uma curva linear que determina a quantidade de agente ativo (ug/mL) necessária para reduzir 50% da absorbância inicial efetiva do radical livre DPPH.

4.2.2.4 Método de redução do íon férrico (FRAP)

Para determinar a atividade antioxidante do EHFP pelo método de redução do íon férrico (FRAP), utilizou-se a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), modificada por Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000). O reagente FRAP foi preparado pela reação entre o TPTZ (2,4,6-Tri-(2-Piridil)-1,3,5-Triazina) 10 mM (2,5 mL), cloreto férrico 20 mM (2,5 mL) e tampão acetato 0,3 M com pH 3,6 (25 mL). Para preparar as amostras, o EHFP foi previamente diluído em água destilada (500 vezes), e então, reagiu-se 90 µL do EHFP com 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. As amostras foram colocadas em banho-maria, à 37°C, protegidas da luz, por 30 minutos. Após o tempo de reação, realizou-se a leitura absorbância das amostras em espectrofotômetro (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), em 595 nm, com o equipamento zerado com o reagente FRAP. A curva padrão foi preparada com padrões de sulfato férrico (FeSO₄) e Trolox (TE) (250 a 2000 µmol) e os resultados expressos em µmol FeSO₄ ou TE/g filme em base seca.

4.2.3 Atividade antimicrobiana do EHFP

A determinação da atividade antimicrobiana do EHFP foi realizada pelo teste de sensibilidade à difusão em disco, segundo o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS 2000), utilizando as cepas *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (ATCC 15442), *Salmonella ssp* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC 25923). As culturas de *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus* foram regeneradas em caldo BHI (*Brain heart infusion*), e a cultura de *P. aeruginosa* foi regenerada em caldo TSB (*Tryptic soy broth*), e então incubadas a 37 °C durante 24 horas. As cepas foram padronizadas a 0,5 na escala Mac Farland (0,08 a 0,10 de absorbância – 1 x 10⁶ UFC/mL) em espectrofotômetro em 625 nm. Placas de ágar Mueller Hinton foram inoculadas com as suspensões de bactérias, cobrindo toda a superfície. Em seguida, 15 µL de EHFP e de água deionizada (controle negativo) foram pipetados em discos de papel de 6 mm de diâmetro, que posteriormente foram colocados na superfície da placa, juntamente com um disco de

mesmo diâmetro contendo cloranfenicol 2,5 mg/mL (controle positivo). A placa foi então incubada a 37°C por 24 horas. Os halos de inibição (cm) foram observados e considerados como a atividade antimicrobiana. A análise foi realizada em triplicata, para cada bactéria.

4.2.4 Cor e pH

A cor do EHFP foi determinada com um colorímetro (MiniScan EZ 4500L Hunter Associates Laboratory, EUA), com ângulo de observação de 10°, iluminante D₆₅ e escala de cor CIELab. O EHFP foi colocado em um porta amostras de quartzo, com nível com altura de 1 cm, para leitura com o equipamento invertido. Os parâmetros de cor [L*, coeficiente de luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco); a*, variando do tom vermelho ao verde; e b*, variando do tom amarelo ao azul] foram determinados diretamente pelo aparelho, e o Anglo Hue (H*) e o Croma (C*) foram calculados com as Equações 1 e 2, respectivamente (PATEIRO et al., 2014).

$$H^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

O pH do EHFP foi determinado com um pHmetro (PG1400, Ind. e Com. Eletrônica Gehaka Ltda., São Paulo, Brasil), em triplicata.

4.3 PRODUÇÃO DA EMULSÃO ÁGUA-EM-ÓLEO-EM-ÁGUA (A/O/A)

A produção da emulsão A/O/A foi realizada em duas etapas (Figura 9): na primeira etapa, foi produzida a emulsão primária (A/O), sendo que a fração aquosa foi o EHFP, preparado como descrito em 4.2.1, e na segunda etapa, a emulsão A/O ótima foi dispersada em fase aquosa, para formação da emulsão A/O/A (FLORENCE; WHITEHILL, 1982). As emulsões A/O e A/O/A foram produzidas em triplicata.

Figura 9 - Fluxograma do preparo da emulsão dupla A/O/A

Fonte: autoria própria

4.3.1 Emulsão água-em-óleo (A/O)

As condições para produção das emulsões A/O foram determinadas baseando-se em estudos prévios, com algumas modificações (KHALID et al., 2013; LEONG et al., 2018; SOULEM et al., 2014). Para se determinar a melhor condição de operação do homogeneizador ultra-agitação (UltraTurrax® IKA T25, Labortechnik, Alemanha), produziu-se uma emulsão A/O com 20/80 de proporção de fases e 3 g PGPR/100 g óleo de soja. A fase aquosa foi adicionada lentamente na fase lipídica e homogeneizada a 10000, 15000, 20000 e 24000 rpm, durante 5 minutos, em banho de gelo. Determinou-se, através da estabilidade física, que a

melhor intensidade de agitação para homogeneização da emulsão A/O foi 15000 rpm. Em seguida, as demais emulsões A/O foram produzidas nas mesmas condições citadas acima e, após homogeneização em homogeneizador ultra-agitação, foram submetidas ao homogeneizador ultrassônico de frequência e potência fixas (20 kHz e 550 W, respectivamente) (Sonifier SFX 550, Branson), com amplitude de 30% e 3 ciclos de 30 segundos, em banho de gelo (LEONG et al., 2018).

Nesta parte do estudo, as emulsões A/O foram produzidas utilizando-se o EHFP como fase aquosa (A) e óleo de soja como a fase lipídica (O), nas razões de 10/90, 20/80 e 30/70 (m/m). Como emulsificante, foi utilizado o PGPR, que foi dissolvido previamente no óleo de soja nas concentrações de 3 e 5 g/100 g óleo de soja, sob agitação magnética, à temperatura ambiente. As emulsões A/O foram armazenadas sob refrigeração, e em ausência de luz, até a realização das caracterizações.

As emulsões A/O foram caracterizadas em relação à estabilidade física e determinação de distribuição e diâmetro médio de gotas e polidispersão. A emulsão A/O que apresentou menores valores de diâmetro médio de gotas, distribuição monomodal de diâmetro médio de gotas e menor índice de polidispersão (PDI), e maior estabilidade física foi escolhida para a produção da emulsão A/O/A.

4.3.2 Emulsão água-em-óleo-em-água (A/O/A)

As condições de preparo das emulsões A/O/A foram determinadas de acordo com metodologia descrita por Giroux et al. (2013); Khalid et al. (2013); Leong et al. (2018); Matos et al. (2018), com algumas modificações. As emulsões A/O/A foram preparadas dispersando-se a emulsão A/O ótima na fase aquosa externa (A), nas razões 20/80, 30/70 e 40/60 (m/m). A fase aquosa externa consistiu em água contendo Tween 80, nas concentrações de 3, 5 e 8 g/100 g água e caseinato de sódio (CS) (0,5 g/100 g água), previamente dissolvidos sob agitação magnética por 30 minutos em temperatura ambiente. Então, a emulsão A/O ótima foi adicionada lentamente na fase aquosa externa e mantidas sob agitação magnética, à 1000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, as emulsões A/O/A foram homogeneizadas em homogeneizador ultrassônico de frequência e potência fixas (20 kHz e 550 W, respectivamente) (Sonifier SFX 550, Branson), com amplitude de 20% e 3 ciclos de 40 segundos, em banho de gelo. As emulsões A/O/A foram armazenadas sob refrigeração, e em ausência de luz, até a realização das caracterizações.

As emulsões A/O/A foram caracterizadas em relação a estabilidade física, determinação de distribuição e diâmetro médio de gotas e polidispersão e potencial zeta, para fins de escolha da emulsão A/O/A ótima para aplicação nos filmes ativos. A escolha da emulsão A/O/A ótima foi similar à escolha da emulsão A/O ótima, descrita acima. A emulsão A/O/A ótima foi ainda caracterizada para determinação de propriedades reológicas, densidade, cor, pH, índice de refração, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES ÁGUA EM ÓLEO (A/O) E ÁGUA-E-ÓLEO-EM-ÁGUA (A/O/A)

4.4.1 Diâmetro médio, distribuição de diâmetro médio de gotas e polidispersão

A distribuição do diâmetro médio de gotas, o diâmetro médio das gotas e a polidispersão das emulsões A/O e A/O/A foram analisados, em triplicata, por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando um dimensionador de partículas de dispersão de luz, no equipamento ZetaSizer Nano SZ (Malvern Instruments, Reino Unido), com sensibilidade de 6 a 6000 nm, a 25 °C.

As emulsões A/O foram diluídas 100 vezes em clorofórmio, de acordo com Souilem et al. (2014), com algumas modificações. Neste caso, a fase dispersante foi o clorofórmio (viscosidade de 0,542 mPa.s e índice de refração de 1,444), e a fase dispersa o EHFP, com as mesmas condições da água (índice de refração de 1,333). Por outro lado, as emulsões A/O/A foram diluídas 800 vezes em água destilada, sendo a água a fase dispersante (viscosidade de 0,894 mPa.s e índice de refração de 1,333) e a emulsão A/O ótima a fase dispersa (índice de refração 1,640).

O diâmetro médio de gotas (média acumulativa) das emulsões foi calculado com o software do equipamento, através da Equação de Stokes-Einstein (diâmetro hidrodinâmico) (Equação 3) e da função de correlação da intensidade de luz espalhada (Equação 4).

$$D(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (3)$$

$$G(\tau) = \exp\left(-D\left(\frac{4\pi n}{\lambda} \sin \theta/2\right)^2 \tau\right) \quad (4)$$

Sendo $D(H,)$ o diâmetro hidrodinâmico; D , o coeficiente de difusão translacional; K , a constante de Boltzmann's; T , a temperatura; η , a viscosidade (Equação 3), e $G(\tau)$, a função de correlação; θ , ângulo de espalhamento; n , o índice de refração; λ , o comprimento de onda e t , o incremento de tempo (Equação 4).

A distribuição por volume do diâmetro médio de gotas e o índice de polidispersão (PDI) foram calculados e fornecidos pelo software do equipamento.

4.4.2 Estabilidade Física

A estabilidade física das emulsões A/O e A/O/A foi analisada usando-se uma fotocentrífuga analítica de multi amostras (LUMiSizer, L.U.M. GmbH, Berlin, Alemanha), cujos parâmetros foram: comprimento de onda de 865 nm, 1,8 mL de amostra, 2325xg, tempo de 3600 s, intervalo de tempo de 10 s, a diferentes temperaturas: 20, 40 e 60 °C. Os resultados foram obtidos utilizando-se o software do equipamento e expressos como índice de instabilidade, em escala arbitrária que varia de 0 a 1, de acordo com a porcentagem de transmissão de luz através da amostra.

4.4.3 Potencial ζ

O potencial ζ das emulsões A/O/A foi determinado no equipamento ZetaSizer Nano SZ (Malvern Instruments, Reino Unido) acoplado de uma célula de imersão ZEN 1020, a 25 °C. As emulsões A/O/A foram diluídas 800 vezes em água e a análise realizada em triplicata. Os valores de potencial ζ (mV) foram determinados utilizando-se o software do equipamento.

4.4.4 Comportamento Reológico

As propriedades reológicas das emulsões A/O e A/O/A ótimas foram analisadas com um reômetro AR 2000 (TA Instruments, West Sussex, UK), a 25°C, em triplicata. Para a emulsão A/O ótima, utilizou-se a geometria cone-placa (diâmetro = 60 mm, ângulo = 2° e gap = 2 mm), enquanto que para as análises da emulsão A/O/A ótima, a geometria usada foi a de cilindros concêntricos (raio interno = 16 mm, raio externo = 17,5 mm, altura = 53 mm e gap = 2 mm). As medidas de fluxo em estado estacionário foram analisadas com taxas de

cisalhamento variando de 0 a 200 s⁻¹. A análise do comportamento das curvas de tensão versus taxa de deformação, bem como a determinação da viscosidade, foi realizada usando-se o software do equipamento.

4.4.5 Cor e pH

A cor e o pH das emulsões A/O e A/O/A ótimas foram determinadas de acordo com a metodologia descrita em 4.2.4.

4.4.6 Densidade e Índice de refração

A densidade das emulsões A/O e A/O/A ótimas foi determinada com um densímetro digital DMA 4500 (Anton Paar GmbH, Graz, Áustria), em triplicata. O índice de refração foi determinado utilizando-se um refratômetro Abbe.

4.4.7 Atividade antioxidante da emulsão A/O/A ótima

4.4.7.1 Determinação dos compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR)

A determinação dos compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) da emulsão A/O/A foi realizada em triplicata, de acordo com a metodologia previamente descrita na seção 4.2.2.1. A emulsão A/O/A foi diluída em etanol (50 vezes) e deixada sob agitação durante 24 horas, em ausência de luz, à 50 rpm, para extração dos compostos ativos encapsulados. O resultado obtido foi expresso em mg Equivalente ácido gálico (GAE)/g de emulsão A/O/A ou EHFP na emulsão A/O/A em base seca.

4.4.7.2 Método de captura do radical livre ABTS^{•+}

Para a análise da atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre ABTS^{•+}, utilizou-se a metodologia descrita em 4.2.2.2. A emulsão A/O/A foi diluída em etanol (50 vezes) e deixada sob agitação durante 24 horas, em ausência de luz, à 50 rpm, para extração

dos compostos ativos encapsulados. O resultado obtido foi expresso em mg Equivalente Trolox (TE)/g de emulsão A/O/A ou EHFP na emulsão A/O/A em base seca.

4.4.7.3 Método de captura do radical livre DPPH

A metodologia utilizada para determinação da atividade antioxidante da emulsão A/O/A ótima pelo método de captura do radical livre DPPH foi a mesma descrita na seção 4.2.2.3. A emulsão A/O/A foi diluída em etanol (50 vezes) e deixada sob agitação durante 24 horas, em ausência de luz, à 50 rpm, para extração dos compostos ativos encapsulados. O resultado obtido expresso em porcentagem de inibição da absorbância (%IA), calculado de acordo com a Equação 5, onde $IA\%$ é a porcentagem de inibição da absorbância da amostra, Abs_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH (controle) e $Abs_{amostra}$ a absorbância da amostra descontada da absorbância do respectivo branco.

$$IA(\%) = \left[\frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{amostra})}{Abs_{DPPH}} \right] \times 100 \quad (5)$$

4.4.7.4 Método de poder de redução do íon férrico FRAP

A metodologia descrita na seção 4.2.2.4 foi utilizada para determinação do poder de redução do íon férrico FRAP da emulsão A/O/A. A emulsão A/O/A foi diluída em etanol (50 vezes) e deixada sob agitação durante 24 horas, em ausência de luz, à 50 rpm, para extração dos compostos ativos encapsulados. O resultado obtido foi expresso em $\mu\text{mol FeSO}_4$ ou $\mu\text{mol Trolox (TE)}$ /g de emulsão A/O/A ou EHFP na emulsão A/O/A em base seca.

4.4.8 Atividade antimicrobiana da emulsão A/O/A ótima

A determinação da atividade antimicrobiana da emulsão A/O/A foi realizada de acordo com metodologia descrita na seção 4.2.3, para as bactérias citadas, pipetando-se 15 μL de amostra de emulsão A/O/A em papel de disco, que foi colocado na superfície da placa contendo ágar Mueller Hinton e as respectivas bactérias. A atividade antimicrobiana da emulsão A/O/A foi expressa em função do halo de inibição (cm).

4.4.9 Microscopia confocal da emulsão água-em-óleo-em-água (A/O/A) ótima

A morfologia da emulsão A/O/A ótima foi qualitativamente analisada usando-se um Microscópio Laser confocal Leica SP5, com objetiva de 63x (abertura 1,4, imersão em óleo). Para a análise, a emulsão A/O/A foi preparada com a adição de 1% (m/v) de corante Rodamina B no EHFP, ou adição de 0,1% (v/v) de corante calcoflúor ou *fast green* na fase aquosa externa. Para a amostra que continha rodamina B, foi realizada excitação com laser HeNe em 543 nm, e detecção de 570 a 640 nm. Para a amostra que continha o calcoflúor, foi realizada excitação com laser de Diodo em 405 nm e detecção de 427 a 481 nm. E, para a amostra que continha *fast green*, foi realizada excitação com laser de Diodo em 633 nm e detecção de 655 a 675 nm. As micrografias foram obtidas pelo software do equipamento.

4.5 PRODUÇÃO DOS FILMES ATIVOS

Os filmes ativos foram produzidos pelo método *casting* (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992), que consistiu na secagem de soluções filmogênicas (SF) a base de gelatina bovina tipo B, quitosana de peso molecular médio ou blenda (70/30) de gelatina/quitosana. Foram produzidos filmes ativados pela adição da emulsão A/O/A ótima contendo EHFP. Filmes sem a emulsão A/O/A foram produzidos para controle.

Para o preparo de todos os filmes, inicialmente foi necessária a solubilização do biopolímero. Assim, a gelatina (4 g gelatina/100g de SF) foi hidratada com água destilada durante 30 minutos e solubilizada a 55 °C por 10 minutos. Em separado, a quitosana (1 g quitosana/100 g SF) foi dispersa em solução de ácido acético 1% (v/v), sob agitação magnética por 12 horas, para completa solubilização, à temperatura ambiente. Especificamente para o preparo de filmes a base de blendas, a gelatina solubilizada e a quitosana dissolvida em ácido acético foram misturadas convenientemente para obtenção de blendas com 70/30 de gelatina/quitosana (2 g biopolímeros/100 g SF). Com os biopolímeros dissolvidos, o glicerol (25 g glicerol/100 g biopolímero) foi adicionado, sob agitação magnética.

Em seguida, para testar a concentração máxima de emulsão A/O/A que as matrizes incorporaram, adicionou-se, gota a gota, em solução filmogênica de gelatina, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 g de EHFP em base seca (EHFP_{bs}) na emulsão A/O/A/100 g gelatina, sob agitação magnética, durante 30 minutos. A concentração escolhida foi de 0,25 g EHFP_{bs} na emulsão

A/O/A/100 g biopolímero, que foi adicionada gota a gota em cada solução filmogênica. No caso dos filmes controles, a emulsão A/O/A foi substituída por água.

Assim, foram estudados os seguintes tratamentos:

- 1 - Gelatina (GC)
- 2 - Quitosana (QC)
- 3 - Blenda gelatina/quitosana (GQC)
- 4 - Gelatina + emulsão A/O/A (GE)
- 5 - Quitosana + emulsão A/O/A (QE)
- 6 - Blenda gelatina/quitosana + emulsão A/O/A (GQE)

As soluções filmogênicas foram aplicadas em placa de petri (12 cm x 12 cm) (1,25 g de biopolímero/placa) e desidratadas em estufa com circulação de ar (Marconi MA-037, São Paulo, Brasil) a 30 °C por 24 horas. Após secagem, os filmes foram armazenados em ambiente com umidade controlada (58% UR) durante 7 dias (ASTM, 2002).

Especificamente para as análises por microscopias eletrônica de varredura e de força atômica, e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, as amostras foram condicionadas sobre sílica gel, durante 7 dias.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS

4.6.1 Espessura

A espessura dos filmes foi medida em dez pontos aleatórios, usando-se um micrômetro digital (0,001 mm, Mitutoyo) (SOBRAL, 2000).

4.6.2 Umidade

A umidade dos filmes foi determinada gravimetricamente, por secagem dos filmes a 105 °C, durante 24 horas (SOBRAL et al., 2001).

4.6.3 Solubilidade em água

Os filmes foram cortados em círculos de diâmetro de 2 cm, adicionados em 50 mL de água destilada e colocados para agitação (25 rpm) em mesa agitadora orbital (MA-141, Marconi), a 25 °C, durante 24 horas. Após o tempo de agitação, a parte dos filmes não solubilizada foi submetida a secagem em estufa a 105 °C, durante 24 horas (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). A solubilidade dos filmes em água foi calculada com a Equação 6:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{m_{si} - m_{sf}}{m_{si}} * 100 \quad (6)$$

Sendo m_{si} e m_{sf} , o peso inicial e final dos filmes (em matéria seca), respectivamente.

4.6.4 Microestrutura

4.6.4.1 Microscopia de força atômica (AFM)

Os filmes foram analisados no modo semi-contato, utilizando-se um microscópio de força atômica (NT-MDT, Rússia), com uma frequência de ressonância de 240 kHz, força de contato de 11,8 N/m, e velocidade de varredura de 0,3 Hz. Os filmes foram analisados em posições aleatórias com áreas de 20 µm x 20 µm. A rugosidade média (R_a , em nm) foi calculada com o software do equipamento (Nova Px 3.2.5 Rev 1266 software).

4.6.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície de secagem dos filmes foi estudada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (TM-3000, HITACHI, Japão). O filme foi aplicado sobre fita de carbono e analisada sem nenhum preparo (FLAKER et al., 2015). As amostras também foram criofraturadas após congelamento em nitrogênio líquido, para observação da estrutura interna. As micrografias foram feitas em posições aleatórias, empregando uma voltagem de 15 kV.

4.6.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas usando-se um espectrofotômetro (Spectrum-One, Perkin–Elmer, EUA), e com um acessório UATR (“Universal Attenuator Total Reflectance”), que permite a análise do material sem nenhum preparo (BERGO; MORAES; SOBRAL, 2012). Foram realizadas 20 varreduras na faixa espectral de 650 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de varredura foram analisados com o programa FTIR Spectrum Software (Perkin-Elmer).

4.6.6 Difração de raios-X (DRX)

O espectro de raios-X dos filmes foi obtido utilizando-se um difratômetro de raios-X (Rigaku Miniflex 600, Japão), operando a 40 kV e 15 mA (radiação $\text{CuK}\beta$, $\lambda = 0,15405 \text{ nm}$). O espectro foi obtido a uma temperatura de 25 °C, e para uma faixa de ângulos entre $2\theta = 2^\circ$ até 70° , com velocidade de varredura de 2 °/min.

4.6.7 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada de acordo com ASTM E96, com modificações (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). Amostras circulares foram fixadas em células de permeação de alumínio, contendo sílica gel (UR = 0%; pressão de vapor de 0 Pa). As células de permeação foram colocadas em dessecadores contendo água destilada (UR = 100%; pressão de vapor de 3,1691 kPa), mantidas a 25 °C. O ganho de massa nas células de permeação foi registrado por intervalos de 24 horas, durante 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) nos filmes foi calculada com a Equação 7:

$$PVA = \frac{\Delta G}{\Delta T} \left(\frac{d}{A \Delta P} \right) \quad (7)$$

Sendo $\Delta G/\Delta T$, a taxa de ganho de água na célula de permeação, no tempo (g/h), A , é a área de permeação (32,17 cm^2), d , é a espessura do filme ativo (mm), e ΔP , a diferença de pressão de vapor entre as superfícies dos filmes (3,1691 kPa).

4.6.8 Ângulo de contato da gota de água (ÂC)

Determinou-se o ângulo de contato (ÂC) da água nas superfícies de secagem, ou seja, que ficou em contato com o ar de secagem, utilizando-se um tensiômetro ótico (Optical tensiometer, Finlândia). Os filmes foram fixados no suporte do equipamento e uma gota de água mili-Q foi colocada sobre a amostra, utilizando-se uma seringa de precisão. As imagens foram obtidas a cada segundo, por um período de 60 segundos. O tempo escolhido para obtenção dos valores de ÂC foi 15 segundos (VALENCIA, 2017). O ângulo formado entre a superfície e a tangente da gota da água foi determinado utilizando-se o software do equipamento.

4.6.9 Propriedades mecânicas

4.6.9.1 *Teste de tração axial*

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas por ensaios de tração utilizando-se um texturômetro TA.XT2i (TA Instruments, NC, EUA), de acordo com ASTM D882-02. Os filmes foram cortados com um comprimento útil de 5 cm, e largura de 1,5 cm. Esses testes foram realizados com uma velocidade de separação de 1 mm/s. A tensão na ruptura (TR, em MPa), e a elongação na ruptura (ER, em %) foram obtidas diretamente das curvas de tensão em função da deformação, utilizando o software do equipamento (Exponent Lite Express, v4,0,13,0). O módulo elástico (ME, em MPa) foi obtido pelo cálculo da inclinação da proporção linear da curva.

4.6.9.2 *Teste de perfuração*

O teste de perfuração dos filmes foi realizado de acordo com a norma ASTM F1306, utilizando um texturômetro TA.XT2i (TA Instruments, NC, EUA). As amostras de filmes foram cortadas em círculos, fixadas em uma célula de 15 mm de raio e perfuradas por uma probe de 3 mm de diâmetro, com uma velocidade de 1 mm/s (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). A força máxima de perfuração (FP, em N) obtida da curva de força em função do deslocamento da probe, utilizando o software do equipamento (Exponent Lite Express,

v4,0,13,0). A deformação na perfuração (DP, em %) foi calculada com a Equação 8, sendo l_0 , o comprimento inicial do filme (raio da célula de 15 mm) e D , o deslocamento da probe na perfuração (mm).

$$DP (\%) = \frac{\sqrt{(D^2 + l_0^2)} - l_0}{l_0} \times 100 \quad (8)$$

4.6.10 Propriedades óticas e de superfície

4.6.10.1 Cor

A cor dos filmes foi determinada conforme a norma ASTM D2244 (SOBRAL et al., 2001), utilizando-se o mesmo equipamento descrito em 3.4.4. Nessas análises, os filmes foram aplicados numa placa branca padrão. A diferença de cor (ΔE^*) foi calculada como:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (9)$$

Sendo $\Delta L^* = L^*$ da amostra - L^* do padrão (93,79); $\Delta a^* = a^*$ da amostra - a^* do padrão branco (-1,00); e $\Delta b^* = b^*$ da amostra - b^* do padrão branco (1,75)

4.6.10.2 Opacidade

A opacidade (Y) foi determinada no mesmo equipamento descrito acima (SOBRAL, 2000). O valor de $Y = (\frac{Y_p}{Y_b})$ foi calculado como a relação da opacidade da amostra colocada sobre uma superfície padrão negra (Y_p), e padrão branca (Y_b), respectivamente.

4.6.10.3 Brilho

O brilho dos filmes foi determinado nos ângulos de 20° e 60°, utilizando-se um Glossímetro NGL 20/60, segundo a ASTM D2457 (VILLALOBOS et al., 2005). Foram realizadas 10 medições em lugares aleatórios na superfície de secagem dos filmes, sendo registrado como unidades de brilho GU.

4.6.11 Propriedades de barreira à luz UV/Visível

As propriedades de barreira à luz UV/visível dos filmes foram determinadas de acordo com Fang et al. (2002), utilizando-se um espectrofotômetro UV/Visível (Lambda 35, Perkin Elmer) com comprimento de onda variando de 200 a 800 nm. Para essa análise, os filmes foram cortados em tiras de 10 cm de comprimento e 1,0 cm de largura e colocados no lugar da cubeta, de forma que o feixe de luz atravessasse o filme, sendo que o local da cubeta do branco foi mantido vazio. A barreira ao UV/luz visível foi analisada qualitativamente interpretando-se o espectro de transmitância dos filmes.

4.6.12 Calorimetria diferencial de varredura

As propriedades térmicas dos filmes foram determinadas com um calorímetro diferencial de varredura (DSC TA2010, TA Instruments). Os filmes foram colocados em cápsulas de alumínio que foram seladas hermeticamente. As curvas calorimétricas foram obtidas em uma faixa de temperatura entre -150 e 150 °C, com taxa de aquecimento de 5 °C/min, e em corrida dupla, sempre após resfriamento usando nitrogênio líquido, e em atmosfera inerte (45 mL/minuto de N₂) (SOBRAL; HABITANTE, 2001; GONTARD; RING, 1996). A temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e a entalpia de fusão (ΔH , área sob a curva do pico de fusão) foram determinadas diretamente das curvas térmicas, usando o programa “Universal Analysis V1.7F” (TA Instruments).

4.6.13 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes ativos foi determinada em relação aos compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR), método de captura do radical livre ABTS^{•+}, método de captura do radical livre DPPH[•] e pelo método de poder de redução do íon férrico FRAP, conforme metodologias descritas nas seções 4.2.2.1, 4.2.2.2, 4.2.2.3 e 4.2.2.4, respectivamente.

Para extração dos compostos ativos dos filmes, 0,1 g de filme cortado em pequenos pedaços foram misturados com 10 mL de solução hidroetanólica (etanol:água 1:1), de acordo com Pérez-Córdoba (2018), e agitados em ausência de luz durante 24 horas, a 50 rpm. Após a agitação, a alíquota necessária para cada método foi retirada do sobrenadante. Para o método

ABTS^{•+}, o resultado foi expresso em mg TE/g de filme em base seca; para o método DPPH[•], o resultado foi expresso em % inibição da absorbância (Equação 3, seção 4.4.7.3) e para o FCR, o resultado foi expresso em mg GAE/g de filme em base seca, e para o método FRAP, o resultado foi expresso em $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ de filme em base seca.

4.6.14 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos filmes ativos foi determinada por teste de sensibilidade a difusão em disco, segundo metodologia descrita na seção 4.2.3, sendo que neste caso, os discos de 6 mm de diâmetro foram retirados dos próprios filmes ativos. A bactéria *E. coli* não foi testada, pois o EHFP não apresentou atividade antimicrobiana contra esta bactéria.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Todos dados experimentais foram submetidos à análise de variância. Os resultados das caracterizações das emulsões A/O e A/O/A, bem como os resultados de caracterização dos filmes, foram analisados para determinação de diferenças significativas entre as médias, utilizando análises *two-way*. Essas análises foram realizadas com o teste de Tukey, com nível de probabilidade de 5%, com auxílio do software *Statistica 7*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE FOLHA DE PITANGUEIRA (EHFP)

5.1.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do EHFP foi determinada por diferentes métodos (Tabela 5). A capacidade do EHFP de reduzir o radical ABTS^{•+} a ABTS foi de 542 ± 21 mg TE/g EHFP em base seca, valor similar ao valor reportado por Vargas et al. (2019) para o extrato hidroetanólico produzido nas mesmas condições (571 mg TE/g extrato em base seca), e maior

do que os valores encontrados por Oliveira (2017) e Schumacher et al. (2015) para extratos aquosos de folha de pitangueira (77,2 a 80,9 e 8,95 mg TE/g extrato, respectivamente).

O resultado da análise de captura do radical livre DPPH· foi expresso como EC₅₀, ou seja, concentração mínima (mg/mL) do EHFP necessária para inibir 50% da quantidade de radical livre DPPH. O valor de EC₅₀ presente na amostra foi de $1,1 \pm 0,0$ mg/mL foi menor do que os valores encontrados por Vargas (2015) e Oliveira (2017) para extratos aquosos de folha de pitangueira (1,5 e 2,5-2,7 mg/mL, respectivamente), o que significa que o EHFP possui maior atividade antioxidante quando comparado a esses extratos aquosos. O valor de EC₅₀ do EHFP foi menor do que os valores relatados por Garmus et al. (2014) e Martinez-Correa et al. (2011) para extratos produzidos com fluídos supercríticos de CO₂, etanol e água, com valores aproximadamente de 200 µg/mL (cerca de 0,2 mg/mL).

Tabela 5 - Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP) pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS^{•+} e DPPH, compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) e poder de redução do íon férrico FRAP

Método	EHFP*
ABTS^{•+} (mg TE/g EHFP)	542,0 ± 21,0
DPPH· EC₅₀ (mg/mL)	1,1 ± 0,0
FCR (mg GAE/g EHFP)	250,5 ± 18,2
FRAP (µmol FeSO₄/g EHFP)	7607 ± 635
FRAP (µmol TE/g EHFP)	2878 ± 291

*valores apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Fonte: autoria própria

Os compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR), determinados mediante a redução do reagente Folin-Ciocalteu, foi de $250,5 \pm 18,2$ mg GAE/g EHFP em base seca. O valor obtido foi maior do que os valores reportados por Canabarro et al. (2019) para extratos produzidos com fluído supercrítico de CO₂ (12 a 15 mg GAE/g extrato em base seca), e por Schumacher et al. (2015) para extratos aquoso e etanólico de folha de pitangueira (73,3 e 44,8 mg GAE/g extrato em base seca). Entretanto, o resultado obtido nesta dissertação está em conformidade com a faixa de valores previamente reportados por Garmus et al. (2014) e Martinez-Correa et al. (2011) para extratos produzidos com solventes supercríticos de CO₂,

etanol e água (32,7 a 240,5 e 51 a 504 mg GAE/g extrato em base seca, respectivamente). Lorenzo et al. (2018) identificaram resultado similar para extrato hidroetanólico produzido nas mesmas condições desta dissertação (229,2 mg GAE/g extrato em base seca). Por fim, o EHFP apresentou maior valor de FCR quando comparado com extratos etanólicos de alecrim, boldo, canela e guaraná (115, 108, 172 e 139 mg GAE/g extrato em base seca, respectivamente) (BONILLA; SOBRAL, 2017b), demonstrando-se assim, o potencial da pitangueira como fonte de princípios bioativos.

Estudos envolvendo a avaliação da atividade antioxidante de extratos de folhas de pitangueira pelo método de poder de redução do reagente FRAP são escassos. A capacidade redutora do EHFP em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} foi de $7707 \pm \mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ de EHFP em base seca, ou $2878 \mu\text{mol TE/g}$ EHFP em base seca, valor muito superior aos valores encontrados por Schumacher et al. (2015) para extratos aquoso e etanólico de folhas de pitangueira ($95,0$ e $64,2 \mu\text{mol FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O/g}$ de extrato em base seca, respectivamente). O EHFP também apresentou maior capacidade redutora de Fe^{3+} a Fe^{2+} quando comparado a extrato hidroetanólico de folha de Moringa oleífera ($1293,5 \mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ de extrato em base seca) (OLDONI et al., 2019),

A diferença na atividade antioxidante entre diferentes extratos de folha de pitangueira pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos de diferentes polaridades nas folhas de pitangueira (MARTINEZ-CORREA et al., 2011), além de outros fatores como local de cultivo da planta, estação de colheita, condições climáticas e maturação das folhas de pitangueira, dentre outros (LORENZO et al., 2018).

5.1.2 Atividade antimicrobiana

O EHFP apresentou atividade antimicrobiana, expressa em cm de halo de inibição para o teste de sensibilidade à difusão em disco, contra as bactérias *P. aeruginosa*, *Salmonella* e *S. aureus*, entretanto não apresentou halo de inibição contra a bactéria *E. coli* (Figura 10). O halo de inibição apresentada pelo EHFP contra o crescimento das bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* ($2,2 \pm 0,0$ cm e $2,1 \pm 0,1$ cm, respectivamente) foi significativamente maior do que o halo de inibição contra o crescimento da bactéria *Salmonella* ($1,8 \pm 0,1$ cm), de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Diferença significativa entre o halo de inibição do cloranfenicol com concentração $2,5$ mg/mL (controle positivo) também foi observada entre as diferentes bactérias, sendo que o

maior halo de inibição ocorreu contra as bactérias *P. aeruginosa* ($4,0 \pm 0,1$ cm) e *Salmonella* ($3,9 \pm 0,2$ cm), sem diferença significativa entre as médias.

Figura 10 - Halos de inibição do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP), do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira diluído para a mesma concentração da emulsão (ED), e da emulsão dupla ótima (A/O/A) contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella ssp* e *Staphylococcus aureus*

* Controle positivo (C+): cloranfenicol (2,5 mg/mL); controle negativo (C-): água destilada

Fonte: autoria própria

Também não houve diferenças significativas entre as médias de halo de inibição para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* ($3,4 \pm 0,1$ cm e $3,3 \pm 0,1$ cm, respectivamente). Para todas as bactérias testadas, a halo de inibição do controle positivo foi significativamente maior do que a halo de inibição do EHFP ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP) contra diferentes bactérias, baseada no halo de inibição (cm)

Bactéria	Cepa	Halo de inibição (cm)	
		EHFP	Controle +*
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	$0,0 \pm 0,0^{cB}$	$3,3 \pm 0,1^{bA}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	$2,2 \pm 0,0^{aB}$	$4,0 \pm 0,1^{aA}$
<i>Salmonella ssp</i>	ATCC 13076	$1,8 \pm 0,1^{bB}$	$3,9 \pm 0,2^{aA}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	$2,1 \pm 0,1^{aB}$	$3,4 \pm 0,1^{bA}$

*Controle positivo: cloranfenicol (2,5 mg/mL). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: autoria própria

Lorenzo et al. (2018) determinaram resultados similares para o EHFP contra as mesmas bactérias testadas, entretanto o EHFP também apresentou halo de inibição para a bactéria *E. coli*. Bonilla e Sobral (2016) identificaram halo de inibição de extratos etanólico de guaraná, boldo, alecrim e canela contra bactéria *S. aureus*, mas nenhum dos extratos apresentou inibição contra o crescimento da bactéria *E. coli*. Estudos relataram que bactérias gram-positivas são mais sensíveis à ação do óleo essencial proveniente da folha de pitangueira quando comparadas às bactérias gram-negativas, como no caso da *E. coli* (VICTORIA et al., 2012)

A ação antimicrobiana de extratos provenientes de plantas está relacionada com a presença de metabólitos secundários, tais como os ácidos fenólicos, quininas, flavonoides, taninos e terpenoides, visto que alguns destes metabólitos secundários fornecem ação protetiva às plantas contra microrganismos, insetos e herbívoros (LAI; ROY, 2012). Os compostos fenólicos, que são um dos componentes majoritários presentes nos extratos de folha de pitangueira (BEZERRA et al., 2018), são os principais responsáveis pela ação antimicrobiana de extratos naturais, devido à presença de hidroxilas (-OH) (DARSHAN; DORESWAMY, 2004), que podem interagir com a membrana celular do microrganismo e rompe-la (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

5.1.3 Cor e pH

O valor de luminosidade (L^*) do EHFP, que varia do preto (0) ao branco (100), foi de $17,0 \pm 0,2$, ao passo que o valor de a^* , que varia do verde ($-a^*$) ao vermelho ($+a^*$), foi positivo ($20,4 \pm 1,5$), e o valor do parâmetro b^* , que varia do azul ($-b^*$) ao amarelo ($+b^*$), foi também positivo, com valor de $22,5 \pm 2,0$ (Tabela 7). Além disso, o valor do croma (C^*) foi de $30,4 \pm 1,1$ e o valor do ângulo Hue (H^*) foi $0,8 \pm 0,0$.

Tabela 7 - Parâmetros de cor e pH do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP)

Parâmetro	EHFP**
L^*	$17,0 \pm 1,2$
a^*	$20,4 \pm 1,5$
b^*	$22,5 \pm 2,0$
ΔE^*	$81,3 \pm 0,9$
C^*	$30,4 \pm 1,1$
H^*	$0,8 \pm 0,0$
pH	$4,12 \pm 0,02$

**valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Fonte: autoria própria

O valor de L^* relativamente baixo e mais próximo de zero indica que o EHFP apresenta tonalidade mais escura, com coloração avermelhada (a^* positivo) e amarelada (b^* positivo). Os valores dos parâmetros L^* , a^* e b^* estão em conformidade com o aspecto visual do EHFP (Figura 8), cuja coloração é acastanhada. O valor do croma (C^*) representa a saturação da amostra (C^*), que foi relativamente alta e bem perceptível aos olhos humanos. Já o H^* é um atributo qualitativo de cor, considerando-se os ângulos 0° , 90° , 180° e 270° como as cores vermelha, amarela, verde e azul, respectivamente. O valor $0,8 \pm 0,0$ confirma a tonalidade vermelho-amarelada do EHFP.

Vargas (2015) produziu extrato aquoso de folha de pitangueira e encontrou valores dos parâmetros L^* , a^* e b^* semelhantes aos encontrados para o EHFP (31,9, 12,9 e 43,8, respectivamente), com o extrato aquoso sendo mais claro e mais amarelado do que o EHFP. Oliveira (2017), trabalhando com extrato aquoso de folha de pitangueira extraído em 3 temperaturas, também determinou valores próximos de L^* (26 a 34), a^* (14 a 17) e b^* (36 a 52),

cujos extratos aquosos apresentaram-se relativamente mais claros, menos avermelhados e mais amarelados do que o EHFP. Isto indica que, as condições de extração (solvente e temperatura, por exemplo) afetam a cor do extrato obtido, possivelmente pelas diferentes concentrações de compostos e diferentes compostos que são extraídos.

O pH do EHFP foi de $4,12 \pm 0,02$, próximo ao valor de pH determinado por Vargas (2015) para extrato aquoso de folha de pitangueira (4,53), e mais baixo do que os valores de pH determinados por Oliveira (2017), para extratos aquosos de folha de pitangueira extraídos em diferentes temperaturas (6,4 a 6,9).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES ÁGUA-EM-ÓLEO (A/O) PRODUZIDAS COM DIFERENTES INTENSIDADES DE AGITAÇÃO NO HOMOGENEIZADOR ULTRA-AGITAÇÃO: ESTABILIDADE FÍSICA

Após o processo de homogeneização das emulsões primárias (A/O) produzidas com proporção de fases de 20/80, concentração de PGPR de 3 g/100 g óleo e diferentes intensidades de agitação no homogeneizador ultra-agitação (10000, 15000, 20000 e 24000 rpm), notou-se que, para todas as intensidades de agitação, o índice de instabilidade foi baixo, indicando que os sistemas formados foram altamente estáveis, apesar de haver diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Índice de instabilidade das emulsões A/O produzidas em diferentes intensidades de agitação

Intensidade de agitação (rpm)	Índice de instabilidade*
10000	$0,038 \pm 0,003^a$
15000	$0,025 \pm 0,001^b$
20000	$0,014 \pm 0,002^c$
24000	$0,017 \pm 0,002^c$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

As emulsões A/O produzidas nas maiores intensidades de agitação, 20000 e 24000 rpm, foram as mais estáveis de acordo com a análise estatística. Entretanto, ambas apresentaram coloração acinzentada, diferentemente das demais emulsões, que apresentaram coloração amarelada (Figura 11). Além disso, a emulsão produzida em 24000 rpm apresentou uma parcela não homogênea. Estas alterações estão relacionadas possivelmente ao elevado aquecimento proveniente da potência do homogeneizador. Portanto, considerou-se que a melhor condição testada para operar o homogeneizador ultra-agitação foi a de 15000 rpm de intensidade de agitação.

Figura 11 - Aspecto visual das emulsões A/O produzidas a (A) 10000 rpm, (B) 15000 rpm, (C) 20000 rpm e (D) 24000 rpm

Fonte: autoria própria

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES ÁGUA-EM-ÓLEO (A/O) PRODUZIDAS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE FASES E CONCENTRAÇÕES DE EMULFISICANTE

5.3.1 Aspecto visual

O aspecto visual das emulsões A/O produzidas com diferentes proporções de fases (10/90, 20/80 e 30/70) e diferentes concentrações de PGPR (3 e 5 g/100 g óleo) pode ser visto na Figura 12. A cor castanha do EHFP, além da cor natural levemente amarelada do óleo de soja, confere às emulsões primárias A/O coloração amarelada de aspecto leitoso e opaco, típico da maioria das emulsões, devido espalhamento de luz consequência dos diferentes índices de refração da fase dispersa e da fase dispersante. Todas as emulsões A/O apresentaram aparência homogênea, sem separação de fases visível.

Figura 12 - Aspecto visual das emulsões A/O produzidas com diferentes proporções de fases (10/90, 20/80 e 30/70) e diferentes concentrações de PGPR (3 e 5 g/100 g óleo)

Fonte: autoria própria

5.3.2 Diâmetro médio, distribuição de diâmetro médio de gotas e polidispersão

O diâmetro das gotas da fase dispersa é um parâmetro que influencia na estabilidade das emulsões formadas. Um menor tamanho de diâmetro médio de gota e maior uniformidade na distribuição de tamanho (menor índice de polidispersão (PDI)), conferem às emulsões maior estabilidade, retardando o processo de sedimentação de emulsões A/O, devido à menor tendência à coalescência e ao amadurecimento de Ostwald (FRAJ et al., 2017).

O diâmetro médio de gota de todas as emulsões A/O foi sub-micrométrico, variando de 0,208 a 0,286 μm , e o PDI entre 0,157 e 0,312, corroborando com a observação que os sistemas formados são homogêneos (Tabela 9). Velderrain-Rodríguez et al. (2019) relataram diâmetro médio de gota para emulsões A/O produzidas com extrato de casca de manga e óleo de milho com 5% de PGPR variando de 0,360 a 0,840 μm , valores maiores do que os determinados nesta dissertação. De Moura et al. (2019) também relataram diâmetro médio de gota maior (0,5 μm) para emulsão A/O produzida com extrato de hibisco e óleo de colza com 4% de PGPR. Estudos prévios atribuíram o pequeno diâmetro médio de gotas, menor polidispersão e maior estabilidade de emulsões A/O ao uso do emulsificante PGPR, considerado eficaz na estabilização de emulsões desse tipo (FRAJ et al., 2017; MÁRQUEZ et al., 2010; SU et al., 2006; TEPSONGKROH et al., 2015a).

Tabela 9 - Diâmetro médio de gota (μm) e Índice de polidispersão (PDI) das emulsões A/O produzidas com diferentes proporções de fases (10/90, 20/80 e 30/70) e diferentes concentrações de PGPR (3 e 5 g/100 g óleo)*

Proporção	Diâmetro médio (μm)		PDI	
	3 g PGPR/ 100 g óleo	5 g PGPR/ 100 g óleo	3 g PGPR/ 100 g óleo	5 g PGPR/ 100 g óleo
10/90	0,224 $\pm$ 0,002 ^{bB}	0,230 $\pm$ 0,003 ^{bA}	0,178 $\pm$ 0,007 ^{bA}	0,169 $\pm$ 0,011 ^{bA}
20/80	0,208 $\pm$ 0,001 ^{cB}	0,215 $\pm$ 0,004 ^{cA}	0,157 $\pm$ 0,007 ^{bA}	0,169 $\pm$ 0,032 ^{bA}
30/70	0,286 $\pm$ 0,002 ^{aA}	0,268 $\pm$ 0,001 ^{aB}	0,312 $\pm$ 0,031 ^{aA}	0,233 $\pm$ 0,022 ^{aB}

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

A emulsão A/O com 20/80 de proporção de fases e com 3 g PGPR/100 g óleo apresentou, estatisticamente, menor diâmetro médio de gota ($0,208 \pm 0,001 \mu\text{m}$) e menor índice de PDI ($0,157 \pm 0,007$), segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Além disso, a distribuição do diâmetro médio de gotas por volume (%) dessa emulsão foi monomodal (Figura 13C). Fraj et al. (2017) relataram valores de diâmetro médio de gotas similares (0,146 a 0,260 μm) para emulsões A/O com proporção de fases 20/80 e concentração de PGPR de 1, 2 e 3 g/100 g óleo de coco.

Figura 13 - Distribuição do diâmetro médio de gotas das emulsões A/O preparadas com diferentes proporções de fases. A, B) 10/90; C, D) 20/80; E, F) 30/70 e diferentes concentrações de PGPR. A, C, E) 3 g/100 g óleo; B, D, F) 5 g/100 g óleo

Fonte: autoria própria

As emulsões A/O com 30/70 de proporção de fases e 3 e 5 g PGPR/100 g óleo apresentaram diâmetro médio de gota e PDI significativamente maior que as demais emulsões A/O ($p < 0,05$), além de distribuição de tamanho de partícula bimodal, com populações de gotas com tamanhos de 0,213 a 0,970 μm (Figura 13E,F). A emulsão A/O com 10/90 de proporção de fases e 3 g PGPR/100 g de óleo também apresentou distribuição bimodal de diâmetro médio de gotas (Figura 13A), com uma população de gotas com tamanho de 0,246 μm e outra com

5,04 μm . A distribuição bimodal dessas emulsões pode ser resultado da formação de micelas inversas de PGPR (MATOS et al., 2018b).

5.3.3 Estabilidade física

Os dados de índice de instabilidade das emulsões primárias A/O produzidas com três proporções de fase e duas concentrações de emulsificantes, foram determinados no equipamento LUMiSizer® (Tabela 10), em três temperaturas. Notou-se que, independentemente da formulação das emulsões A/O, os índices de instabilidade foram muito baixos (0,009 a 0,063) em todas temperaturas nas quais essa análise foi realizada, indicando que as emulsões formadas foram sistemas muito estáveis, mesmo em alta temperatura (60 °C). A elevada estabilidade das emulsões A/O pode estar associada principalmente a dois fatores: a viscosidade da fase lipídica e ao emulsificante PGPR. A utilização do emulsificante PGPR para estabilização de emulsões do tipo A/O têm sido relatada como altamente eficiente na literatura (DICKINSON, 2011; ILIĆ et al., 2017). Além disso, a adição de PGPR na fase lipídica tem sido relacionada ao aumento da viscosidade da mesma, aumentando a resistência da emulsão contra os processos de desestabilização (TEPSONGKROH et al., 2015a).

A 20 °C, as emulsões A/O com proporções 20/80 e 30/70 e com ambas concentrações de PGPR (3 e 5 g/100g óleo) não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$), entretanto apresentaram índice de instabilidade significativamente menor do que para as emulsões A/O com proporção de fases 10/90 e 3 e 5 g PGPR/100 g óleo. O aumento da concentração de PGPR não afetou significativamente o índice de instabilidade das emulsões A/O em nenhuma das proporções de fases. Os valores de índice de instabilidade na temperatura de 20 °C variaram de 0,009 a 0,020.

Nas análises a 40 °C, as emulsões A/O não apresentaram índice de instabilidade diferentes significativamente ($p < 0,05$), com valores variando de 0,026 a 0,022. O aumento da temperatura de 20 para 40 °C não afetou de maneira expressiva a estabilidade das emulsões. Já para a temperatura de 60 °C, as emulsões A/O com 3 g PGPR/100 g de óleo e proporções de fases com 20/80 e 30/70 apresentaram índice de instabilidade significativamente menor ($0,024 \pm 0,001$ e $0,029 \pm 0,001$, respectivamente) do que para a emulsão A/O com proporção de fases 10/90 ($0,063 \pm 0,006$). O aumento da concentração de PGPR de 3 para 5 g/100 g de óleo diminuiu significativamente o índice de instabilidade para a emulsão A/O com 10/90 de

proporção de fases ($0,037 \pm 0,002$), ao passo que aumentou significativamente o valor do índice de instabilidade para a emulsão 20/80 ($0,033 \pm 0,003$) ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Índice de instabilidade das emulsões A/O preparadas com diferentes proporções de fase (10/90, 20/80 e 30/70) e diferentes concentrações de PGPR (3 e 5 g/100 g óleo) a 20, 40 e 60 °C

Temperatura	Proporção	Índice de instabilidade*	
		3 g PGPR/100 g óleo	5 g PGPR/100 g óleo
20°C	10/90	$0,020 \pm 0,003^{aA}$	$0,017 \pm 0,002^{aA}$
	20/80	$0,009 \pm 0,001^{bA}$	$0,011 \pm 0,001^{bA}$
	30/70	$0,010 \pm 0,001^{bA}$	$0,013 \pm 0,002^{bA}$
40°C	10/90	$0,022 \pm 0,004^{aA}$	$0,021 \pm 0,003^{aA}$
	20/80	$0,016 \pm 0,001^{aA}$	$0,018 \pm 0,002^{aA}$
	30/70	$0,017 \pm 0,001^{aA}$	$0,019 \pm 0,001^{aA}$
60°C	10/90	$0,063 \pm 0,006^{aA}$	$0,037 \pm 0,002^{aB}$
	20/80	$0,024 \pm 0,001^{bB}$	$0,033 \pm 0,003^{aA}$
	30/70	$0,029 \pm 0,001^{bA}$	$0,031 \pm 0,003^{aA}$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

A emulsão A/O escolhida como ótima para a produção das emulsões duplas foi a emulsão com 20/80 de proporção de fases e com 3 g PGPR/100 g de óleo, visto que esta apresentou os menores valores de índice de instabilidade em todas as temperaturas, mesmo que não significativamente, além de menor diâmetro médio de gotas, menor PDI e distribuição de diâmetro médio de gotas monomodal, como mencionado anteriormente.

Os perfis de transmissão da emulsão A/O ótima durante as análises representaram a variação da densidade de cada fase da emulsão (Figura 14). A distribuição nas 3 temperaturas foi praticamente uniforme ao longo dos testes e as linhas de todos os perfis foram basicamente linhas horizontais retas, o que indicou alta concentração de gotas ao longo de todas as amostras (baixa transmissão, de no máximo 10%), e consequentemente, confirmam que este é um sistema muito estável. A pequena variação nos perfis de separação na posição 107 mm, com um

pequeno aumento na transmissão neste ponto, indicou que o processo de separação que ocorreu nas emulsões do tipo A/O foi a sedimentação, onde as gotas migraram para o fundo da cubeta e, o óleo que se separou, migrou para a superfície da cubeta, e pôde ser observado nas imagens das cubetas após a realização dos testes (Figura 14).

Figura 14 - Perfis de transmissão da emulsão A/O ótima a (A) 20 °C, (B) 40 °C e (C) 60 °C

Fonte: autoria própria

5.3.4 Comportamento reológico

As propriedades reológicas de uma emulsão fornecem informações importantes a respeito da formação, estabilidade e estrutura desses sistemas (WANYI et al., 2019). Observou-se que as emulsões apresentaram curvas de fluxo com comportamento Newtoniano (Figura 15). Desta forma, a viscosidade foi calculada por regressão linear com excelente ajuste do modelo newtoniano ($R^2 > 0,999$) (Equação 10):

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (10)$$

Onde τ é a tensão (mPa), η é a viscosidade (mPa.s) e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}).

Figura 15 - Curva de fluxo da emulsão A/O ótima, a 25 °C

Fonte: autoria própria

A viscosidade da emulsão A/O foi de $104,6 \pm 0,6$ mPa.s, valor muito superior à viscosidade da água pura (~ 1 mPa.s, ILIĆ et al., (2017)) e do óleo de soja (~ 60 mPa.s, ALMEIDA et al., (2013)), a 25 °C, o que indicou que a alta estabilidade da emulsão A/O pode estar relacionada à elevada viscosidade do sistema, que retardou os processos de desestabilização. De Moura et al. (2019) relataram comportamento reológico similar para emulsões do tipo A/O produzidas com extrato de hibisco como fase aquosa interna e óleo de colza e emulsificante PGPR como fase lipídica. Segundo Liu et al. (2016), emulsões A/O com menor proporção de fase aquosa dispersa e menor diâmetro médio de gotas se comportam como

fluido Newtoniano, apresentando valores de viscosidade maiores e que se aproximam do óleo. O aumento da proporção da fase aquosa dispersa e maiores tamanhos de gotas levam esses sistemas a comportamento não newtonianos (LIU et al., 2016).

5.3.5 Cor

A luminosidade (L^*), que varia do preto (0) ao branco (100), da emulsão A/O foi de $83,91 \pm 0,34$ (Tabela 11), valor elevado e mais próximo de 100, o que indicou que a emulsão A/O possuía tonalidade clara, que pode claramente ser observada visualmente (Figura 16). Essa tonalidade é característica de emulsões, que apresentam aspecto leitoso, cujas fases possuem índices de refração diferentes. O valor de a^* , que varia do verde ($-a^*$) ao vermelho ($+a^*$), foi positiva, mas próximo de zero ($0,26 \pm 0,03$), o que indicou que a emulsão A/O possui coloração ligeiramente avermelhada. Além disso, o valor do parâmetro b^* , que varia do azul ($-b^*$) ao amarelo ($+b^*$), foi de $15,58 \pm 0,46$, indicando que a emulsão A/O possuía coloração amarelada, e que foi facilmente notado.

Figura 16 - Aspecto visual da emulsão A/O ótima

Fonte: autoria própria

A coloração vermelho-amarelada da emulsão A/O está relacionada com a cor do EHFP, cujos valores (Tabela 7) de L^* (17,0), a^* (20,4) e b^* (22,5) caracterizam uma tonalidade mais escura, avermelhada e amarelada, com coloração perceptivelmente castanha, além da cor natural do óleo de soja, que é amarelada.

O valor do croma (C^*) está relacionado com a saturação das cores, e quanto maior o valor de C^* , maior a saturação e mais perceptível é aos humanos. O valor de C^* foi calculado como sendo $15,6 \pm 0,5$, valor próximo ao encontrado por De Moura et al. (2018) para emulsões A/O/A (16 a 25). Já o valor calculado do ângulo Hue (H^*) foi $1,6 \pm 0,0$, confirmando a tonalidade vermelho-amarelada das emulsões, valor mais alto do que relatado por De Moura et al. (2018) ($0,2$ aproximadamente), visto que estes autores encapsularam extrato de hibisco, cuja coloração é vermelha e é natural que o valor de H^* se aproxime de 0° , ao passo que o EHFP possui coloração castanha, além do óleo de soja, que possui coloração amarelada.

Tabela 11 - Parâmetros de cor, pH, densidade (ρ) e índice de refração (IR) da emulsão A/O ótima

Parâmetro	A/O*
L*	$83,9 \pm 0,3$
a*	$0,3 \pm 0,0$
b*	$15,6 \pm 0,5$
H*	$1,6 \pm 0,0$
C*	$15,6 \pm 0,5$
pH	$5,12 \pm 0,01$
ρ (g/cm³)	$0,937 \pm 0,000$
IR	$1,640 \pm 0,004$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

Fonte: autoria própria

5.3.6 pH, índice de refração e densidade

O pH da emulsão A/O foi de $5,12 \pm 0,01$ (Tabela 11), valor próximo ao reportado por Ali; Akhtar (2014) para emulsões A/O produzidas com óleo de parafina e extrato de folha de moringa (valores entre 4,9 e 5,5), e maior o que o pH (4,12) do EHFP (Tabela 7).

Em relação à densidade, que foi de $0,937 \pm 0,000$ g/cm³ (Tabela 11), notou-se que esta corresponde praticamente à densidade do óleo de soja puro (0,93 g/cm³), fato que pode ser explicado pela maior quantidade de óleo de soja presente na emulsão A/O (80%).

O índice de refração da emulsão A/O foi de $1,64 \pm 0,00$ (Tabela 11), valor maior do o índice de refração (1,366 a 25 °C) do EHFP (Tabela 7) e maior do que o índice de refração do óleo de soja (1,461 a 25 °C, determinado usando-se o refratômetro descrito em 4.4.6). Isto ocorre porque, quando duas fases de índices de refrações diferentes são emulsionadas (água e óleo, por exemplo), há a formação de um sistema opaco e com outro índice de refração, o que corrobora com a sugestão da boa dispersão das gotas na fase contínua.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES ÁGUA-EM-ÓLEO-EM-ÁGUA (A/O/A)

5.4.1 Aspecto visual

As emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases (20/80, 30/70, 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água) apresentaram coloração próxima ao branco, sem heterogeneidade e separação de fases aparente, com exceção das emulsões A/O/A 20/80 com 5 e 8 g Tween 80/100 g água, que se separaram imediatamente após o processo de homogeneização ultrassônica (Figura 17).

Figura 17 - Aspecto visual das emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases. 1, 2, 3) 20/80; 4, 5, 6) 30/70; 7, 8, 9) 40/60; e diferentes concentrações de Tween 80. 1, 4, 7) 3 g/100 g água; 2, 5, 8) 5 g/100 g água; 3, 6, 9) 8 g/100 g água

Fonte: autoria própria

Assim como ocorre para as emulsões A/O, o aspecto leitoso e opaco das emulsões A/O/A que permaneceram estáveis após homogeneização, é devido à diferença no índice de refração das fases (emulsão A/O e água).

5.4.2 Diâmetro médio, distribuição de diâmetro médio de gotas e polidispersão

O diâmetro médio de gotas das emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água), além de caseinato de sódio na concentração de 0,5 g/100 g água, foi sub-micrométrico, variando de 0,365 a 0,707 μm (Tabela 12). A emulsão produzida com proporção de fases 40/60 e 3 g Tween 80/100 g água apresentou diâmetro médio de gotas significativamente menor que todas as outras emulsões ($0,365 \pm 0,051 \mu\text{m}$), segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). O aumento da concentração de emulsificante ocasionou o aumento do diâmetro médio de gotas para as emulsões com proporção 40/60.

Tabela 12 - Diâmetro médio de gota (μm) das emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água)

Proporção	Diâmetro médio (μm)*		
	3 g Tween 80/ 100 g água	5 g Tween 80/ 100 g água	8 g Tween 80/ 100 g água
20/80	$0,572 \pm 0,084^a$	-	-
30/70	$0,545 \pm 0,050^{aA}$	$0,544 \pm 0,051^{bA}$	$0,601 \pm 0,060^{aA}$
40/60	$0,365 \pm 0,051^{bB}$	$0,707 \pm 0,052^{aA}$	$0,622 \pm 0,070^{aA}$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

Embora os valores de diâmetro médio de gotas das emulsões A/O/A tenham sido sub-micrométricos, o índice de polidispersão de todas as emulsões A/O/A foi elevado ($>0,7$) (Tabela 13), indicando heterogeneidade no diâmetro das gotas, como pode ser confirmado pelos gráficos de distribuição do diâmetro médio de gotas das amostras (Figura 18). De fato, o diâmetro médio de gotas obtido pelo software do equipamento pode não representar o diâmetro médio real, pois todas as amostras apresentaram distribuição trimodal, com populações de gotas com diâmetros nanométricas ($<0,2 \mu\text{m}$), sub-micrométricas ($<1,0 \mu\text{m}$) e micrométricas ($>1,0 \mu\text{m}$) (Figura 18), com maior população de gotas com diâmetros médios maiores que $4 \mu\text{m}$, com

exceção da emulsão produzida com 40/60 de proporção de fases e 3 g Tween 80/100 g água (Figura 18E), cuja maior população de gotas apresentou diâmetro de 0,756 μm (54%).

Tabela 13 - Índice de polidispersão (PDI) das emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água)

Proporção	PDI*		
	3 g Tween 80/ 100 g água	5 g Tween 80/ 100 g água	8 g Tween 80/ 100 g água
20/80	0,776 $\pm$ 0,075 ^a	-	-
30/70	0,776 $\pm$ 0,005 ^{aA}	0,779 $\pm$ 0,015 ^{aA}	0,801 $\pm$ 0,055 ^{aA}
40/60	0,768 $\pm$ 0,034 ^{aA}	0,806 $\pm$ 0,044 ^{aA}	0,816 $\pm$ 0,011 ^{aA}

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

Os resultados de diâmetro e de distribuição de diâmetros de gotas observados nesta dissertação estão de acordo com os resultados relatados por Surh et al. (2007), que observaram distribuição trimodal de diâmetro médio de gotas e diâmetro médio de 0,3 a 8 μm para emulsões A/O/A produzidas com proteína isolada de soro de leite na fase aquosa interna, óleo de milho e PGPR como fase lipídica e água e Tween 20 como fase aquosa externa. Já Tepsongkroh et al. (2015) encapsularam extrato de semente de manga na fase aquosa interna de emulsão A/O/A, contendo os emulsificantes PGPR e Tween 80 nas fases lipídica e aquosa externa, respectivamente, e relataram distribuição monomodal do diâmetro médio das gotas, com diâmetros variando de 3 a 7 μm . Kaimainen et al. (2015) determinaram distribuição bimodal de diâmetro médio de gotas para emulsão A/O/A contendo extrato de beterraba como fase aquosa interna, PGPR e biopolímeros como emulsificantes das fases lipídicas e aquosa externa, respectivamente, cujos picos apresentaram diâmetro médio de gotas de 0,312 μm e 6,6 μm (80%). Segundo Velderrain-Rodríguez et al. (2019), emulsões A/O/A produzidas com extrato de casca de manga, PGPR na fase lipídica e emulsificante Tween 80 apresentaram diâmetro médio de gotas de 3,68 μm .

Figura 18 - Distribuição do diâmetro médio de gotas das emulsões A/O/O preparadas com diferentes proporções de fases. A) 20/80; B, C, D) 30/70; E, F, G) 40/60 e diferentes concentrações de Tween 80. A, B, E) 3 g/100 g água; C, F) 5 g/100 g água; D, G) 8 g/100 g água

Fonte: autoria própria

Emulsões A/O/A com diâmetros médios de gotas predominantemente micrométricos e alta polidispersão são comuns, visto que esses sistemas são termodinamicamente mais instáveis quando comparados às emulsões simples. Maiores diâmetros de gotas nas emulsões A/O/A diminuem sua estabilidade e aumentam a velocidade de cremação (KAIMAINEN et al., 2015).

5.4.3 Potencial ζ

O potencial ζ é uma medida que pode ser relacionada com a estabilidade de dispersões, visto que identifica mudanças nas cargas elétricas das gotas, que influenciam a taxa de floculação (KALE; DEORE, 2016). Emulsões com valores absolutos de potencial ζ maiores do que 25 mV são consideradas estáveis (PIMENTEL-MORAL et al., 2018). As emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água), além de caseinato de sódio na concentração de 0,5 g/100 g água, apresentaram valores negativos de potencial ζ e, em módulo, acima de 30 mV (Tabela 14), sendo então consideradas estáveis. Apenas a emulsão A/O/A produzida com proporção 30/70 e 3 g Tween 80/100 g água apresentou potencial ζ significativamente mais negativo do que as demais emulsões A/O/A ($-37,4 \pm 0,5$ mV). As demais emulsões A/O/A não apresentaram diferença significativa entre as médias de potencial ζ , com valores variando de -34,7 a -30,0 mV.

Tabela 14 - Potencial ζ das emulsões A/O/A produzidas com diferentes proporções de fases (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água)

Proporção	Potencial ζ (mV)*		
	3 g Tween 80/ 100 g água	5 g Tween 80/ 100 g água	8 g Tween 80/ 100 g água
20/80	$-34,7 \pm 0,8^{ab}$	-	-
30/70	$-37,4 \pm 0,5^{bB}$	$-32,1 \pm 3,0^{aA}$	$-31,8 \pm 1,9^{aA}$
40/60	$-33,8 \pm 0,5^{aA}$	$-33,6 \pm 0,7^{aA}$	$-30,0 \pm 0,9^{aA}$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

Os valores negativos de potencial ζ estão possivelmente relacionados à presença do caseinato de sódio como emulsificante na fase aquosa externa, além do Tween 80. O caseinato de sódio possui ponto isoelétrico em pH aproximadamente 4,6 (FENG; LEE, 2016), abaixo do pH medido para a emulsão A/O/A ótima, que foi de 5,58, desta forma, a carga total das moléculas de caseinato de sódio seria negativa. Pimentel-Moral et al. (2018) formularam emulsões A/O/A com pH abaixo do ponto isoelétrico da proteína isolada de soro de leite (pH 4,5), que foi usada como emulsificante na fase aquosa externa e, portanto, relataram valores de potencial ζ positivos (21,9 a 37 mV).

5.4.4 Estabilidade física

O aumento da temperatura de análise no equipamento LUMiSizer® afetou a estabilidade física das emulsões A/O/A produzidas com diferentes formulações (20/80, 30/70 e 40/60 de proporção de fases e 3, 5 e g Tween 80 g/100 g água) (Tabela 15). Os índices de instabilidade das emulsões A/O/A praticamente dobraram na temperatura de 60 °C, quando comparados a temperatura de 20 °C. A diminuição da estabilidade física das emulsões com o aumento da temperatura está relacionada com a redução da funcionalidade dos emulsificantes, que em temperaturas elevadas, podem sofrer despolimerização ou desdobramento das cadeias de biopolímeros (ex: caseinato de sódio) e desidratação dos grupos-cabeça de surfactantes (ex: tweens), ocasionando o aumento do diâmetro das gotas e, conseqüentemente, favorecendo os processos de desestabilização (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

Em todas as temperaturas, e para a menor concentração de Tween 80 (3 g/100 g água), a emulsão A/O/A com proporção de fases 20/80 apresentou índice de instabilidade significativamente maior do que os índices de instabilidade das emulsões 30/70 e 40/60, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$), ao passo que a emulsão A/O/A com 40/60 de proporção de fases apresentou índice de instabilidade significativamente menor, com exceção a 20 °C, onde o índice de instabilidade foi estatisticamente igual ao da emulsão produzida com 30/70 de proporção de fases. O aumento da concentração de Tween 80 não afetou o índice de instabilidade das emulsões A/O/A com 30/70 e 40/60 de proporção de fases, com exceção da emulsão 30/70, a 40 °C, cujos índices de instabilidade foram significativamente menores com o aumento da concentração de Tween 80.

Tabela 15 - Índice de instabilidade das emulsões A/O/A preparadas com diferentes proporções de fase (20/80, 30/70 e 40/60) e diferentes concentrações de Tween 80 (3, 5 e 8 g/100 g água) a 20, 40 e 60 °C

Temperatura	Proporção	Índice de instabilidade*		
		3 g Tween 80/100 g água	5 g Tween 80/100 g água	8 g Tween 80/100 g água
20°C	20/80	0,411 ± 0,021 ^a	-	-
	30/70	0,256 ± 0,021 ^{bA}	0,193 ± 0,028 ^{bA}	0,234 ± 0,035 ^{aA}
	40/60	0,239 ± 0,009 ^{bA}	0,271 ± 0,026 ^{aA}	0,211 ± 0,033 ^{aA}
40°C	20/80	0,557 ± 0,004 ^a	-	-
	30/70	0,436 ± 0,029 ^{bA}	0,332 ± 0,012 ^{aB}	0,342 ± 0,048 ^{aB}
	40/60	0,321 ± 0,011 ^{cA}	0,314 ± 0,014 ^{aA}	0,286 ± 0,021 ^{aA}
60°C	20/80	0,658 ± 0,021 ^a	-	-
	30/70	0,531 ± 0,056 ^{bA}	0,485 ± 0,049 ^{aA}	0,456 ± 0,031 ^{aA}
	40/60	0,426 ± 0,037 ^{cA}	0,425 ± 0,021 ^{aA}	0,454 ± 0,063 ^{aA}

*Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

As emulsões A/O/A apresentaram menores índices de instabilidade quando comparadas às emulsões A/O (Tabela 10), mas na mesma faixa de valores determinada por Pérez-Córdoba (2018) para emulsões O/A produzidas com óleo de canola, Span 60, cinamaldeído, σ -tocoferol e hexano como fase lipídica dispersa e água e Tween 20 como fase aquosa dispersante (0,1 a 0,7). Embora emulsões duplas sejam termodinamicamente mais instáveis do que emulsões simples, as emulsões A/O/A apresentaram boa estabilidade física, principalmente a 20 °C, que está relacionada com a combinação do Tween 80 e do caseinato de sódio como emulsificantes. Segundo McClements e Jafari (2018), a combinação de emulsificantes na fase aquosa externa, como surfactantes de cadeia curta (tweens) e biopolímeros, pode reduzir o tamanho das gotas e, desta forma, aumentar a estabilidade das emulsões. Outros estudos relataram a combinação de surfactantes e biopolímeros para a estabilização de emulsões A/O/A (KANOUNI; ROSANO; NAOULI, 2002; MATOS et al., 2018b; TEPSONGKROH et al., 2015a).

A emulsão com 40/60 de proporção de fases e 3 g Tween 80/100 g de água foi escolhida como emulsão A/O/A ótima, visto que apresentou maior estabilidade física em diferentes temperaturas e menor diâmetro médio de gotas. Os perfis de transmissão da emulsão A/O/A ótima, em diferentes temperaturas, podem ser vistos na Figura 19.

Figura 19 - Perfis de transmissão da emulsão A/O/A ótima a (A) 20 °C, (B) 40 °C e (C) 60 °C

Fonte: autoria própria

A posição dos perfis de transmissão próximos a 107 mm corresponde a parte superior da cubeta, ao passo que o fundo da cubeta corresponde a posição 130 mm (Figura 19). Nota-se que, em todas as temperaturas, os perfis apresentaram linhas transversais, com maior transmissão no fundo da cubeta, e menor transmissão no sentido superior da cubeta, o que indica que o processo de separação que ocorreu foi a cremação (“creaming”), onde a fase contendo as gotas migrou para cima (parte superior da cubeta), e a fase aquosa migrou para o fundo da cubeta. A 20 °C, os perfis de transmissão tenderam ao sentido vertical, com a fase cremosa correspondendo a aproximadamente 12 mm, ao passo que a 60 °C, os perfis de transmissão tenderam ao sentido horizontal, e a fase cremosa apresentando apenas 3 mm, o que indica maior separação e, conseqüentemente, menor estabilidade.

5.4.5 Comportamento reológico

A emulsão A/O/A ótima apresentou comportamento Não-Newtoniano (Figura 20), tipo pseudoplástico, ou seja, a viscosidade aparente dessa emulsão diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento, de maneira não linear (Figura 20B). Esse comportamento pode ser atribuído à deformação da estrutura que foi formada, pois a aplicação da tensão de cisalhamento causa alongamento na direção da deformação e ruptura da estrutura, ao passo que o aumento da taxa de cisalhamento deforma as gotas de emulsão A/O (YILDIRIM; SUMNU; SAHIN, 2017). Resultados similares já foram relatados para emulsões A/O/A (CARRILLO-NAVAS et al., 2012; DE MOURA et al., 2018; MATOS et al., 2018c; PAULA et al., 2018; YILDIRIM; SUMNU; SAHIN, 2017).

A equação da Lei da Potência (“Power law”), ou modelo de Ostwald-de-Waele (Equação 11), foi ajustado aos dados da curva de fluxo ($R^2 > 0,99$).

$$\sigma = K \dot{\gamma}^n \quad (11)$$

Onde σ , é a tensão de cisalhamento (Pa); K , é o índice de consistência (Pa.s^n); $\dot{\gamma}$, é a taxa de cisalhamento (s^{-1}) e n , é o índice de fluidez (adimensional). O índice de fluidez (n) da emulsão A/O/A ótima foi $0,90 \pm 0,03$, devido ao comportamento pseudoplástico da emulsão ($n < 1$), com índice de consistência (K) de $6,7 \pm 0,6 \text{ mPa.s}^n$.

A viscosidade aparente da emulsão A/O/A, em 100 s^{-1} , foi calculada como $4,02 \pm 0,26 \text{ mPa.s}$, valor baixo e próximo ao valor da água (1 mPa.s), indicando que a adição da emulsão A/O e emulsificantes praticamente não influenciou a viscosidade da fase contínua.

Figura 20 - Comportamento reológico da emulsão A/O/A ótima, a 25°C . (A) Curva de fluxo. (B) Viscosidade em função da taxa de cisalhamento

Fonte: autoria própria

5.4.6 Cor

A luminosidade (L^*) da emulsão A/O/A foi de $92,1 \pm 0,2$ (Tabela 16), e que está próximo de 100, caracterizando tonalidade clara (próxima ao branco) e que pode ser notada

visualmente (Figura 21). Em relação ao parâmetro a^* (verde ($-a^*$) ao vermelho ($+a^*$)), o valor encontrado para a emulsão A/O/A foi negativo ($-1,1 \pm 0,0$), mas próximo de zero, indicando que a emulsão A/O/A possuiu tonalidade ligeiramente esverdeada. O valor do parâmetro b^* (azul ($-b^*$) ao amarelo ($+b^*$)) da emulsão A/O/A foi positivo ($9,6 \pm 0,2$), visto que apresentou aspecto amarelado.

Tabela 16 - Parâmetros de cor, pH, densidade (ρ) e índice de refração (IR) da emulsão A/O/A ótima

Parâmetro	A/O*
L^*	$92,1 \pm 0,2$
a^*	$-1,1 \pm 0,0$
b^*	$9,6 \pm 0,2$
H^*	$1,5 \pm 0,0$
C^*	$9,6 \pm 0,2$
pH	$5,58 \pm 0,02$
ρ (g/cm ³)	$0,976 \pm 0,003$
IR	$1,647 \pm 0,001$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Fonte: autoria própria

Figura 21 - Aspecto visual da emulsão A/O/A ótima

Fonte: autoria própria

O valor de L^* da emulsão A/O/A foi superior ao valor de L^* da emulsão A/O ($83,9 \pm 0,34$), indicando que a emulsão A/O/A foi mais clara. O fato do parâmetro a^* da emulsão A/O/A ter sido negativo, e o parâmetro a^* da emulsão A/O ter sido positivo ($0,26 \pm 0,03$), não tem muita importância prática, uma vez que estão muito próximo de zero. O valor de b^* de ambas as emulsões A/O e A/O/A foram positivos, pois ambas foram amareladas, sendo o valor de b^* da emulsão A/O mais elevado ($15,6 \pm 0,5$), indicando que esta possuiu tonalidade amarelada.

De Moura et al. (2018) relataram menores valores de L^* para emulsões A/O/A ricas em extrato de hibisco (50 a 54), além disso os valores determinados de a^* e b^* foram positivos e maiores (cerca de 20 e 5, respectivamente), indicando que as emulsões eram mais avermelhadas e mais amareladas em comparação à emulsão A/O/A ótima desta dissertação.

O valor do croma (C^*) da emulsão A/O/A foi $9,6 \pm 0,2$, ao passo que o valor do ângulo Hue (H^*) foi $1,5 \pm 0,0$, confirmando uma tonalidade amarelada das emulsões, e apresentando valor mais baixo de C^* e maior de H^* quando comparados aos valores relatados por De Moura et al. (2018).

5.4.7 pH, índice de refração e densidade

O pH da emulsão A/O/A foi $5,58 \pm 0,02$ (Tabela 16), valor próximo ao reportado por Pérez-Córdoba (2018) para emulsões O/A (valores entre 5,4 e 6,0), que afirmou que para garantir a boa estabilidade de emulsões O/A, o pH deve estar acima de 4,0. Além disso, o pH da emulsão A/O/A foi maior do que de pH da emulsão A/O ($5,12 \pm 0,01$).

A densidade da emulsão A/O/A, $0,976 \pm 0,003 \text{ g/cm}^3$ (Tabela 16), também foi maior que a densidade da emulsão A/O ($0,937 \pm 0,000 \text{ g/cm}^3$), e muito próxima da densidade da água ($0,997 \text{ g/cm}^3$), devido à maior quantidade desse componente na emulsão, fato também observado por Pérez-Córdoba (2018) para emulsões O/A ($0,994$ a $0,997 \text{ g/cm}^3$).

O índice de refração da emulsão A/O/A, $1,647 \pm 0,001$ (Tabela 16), foi igual ao da emulsão A/O ($1,647 \pm 0,001$), valores esses, maiores que do índice de refração da água ($1,333$ à 25°C). O fato da emulsão A/O, que foi dispersa em água, na emulsão A/O/A, possuir um índice de refração diferente ao da água, causa maior opacidade na emulsão A/O/A, consequentemente, maior índice de refração.

5.4.8 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante da emulsão A/O/A ótima foi avaliada pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•], pelos compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) e poder de redução do íon férrico FRAP, e expressa por grama de emulsão A/O/A e por grama de EHFP em base seca (EHFP_{bs}) presente na emulsão A/O/A (Tabela 17).

Em relação aos resultados de FCR, os valores encontrados para a emulsão A/O/A foram de $1,8 \pm 0,2$ mg GAE/g A/O/A ou $244,7 \pm 21,5$ mg GAE/EHFP_{bs} na emulsão A/O/A. A atividade antioxidante da emulsão A/O/A, determinada pelo método de ABTS^{•+}, foi de $3,5 \pm 0,1$ mg TE/g emulsão A/O/A ou $482,0 \pm 12,2$ mg GAE/g EHFP_{bs} na emulsão A/O/A, além de uma porcentagem de inibição de absorbância do radical DPPH de $25,6 \pm 3,0\%$. Por fim, pelo método FRAP, a atividade antioxidante da emulsão A/O/A, utilizando FeSO₄ como padrão, foi de $57,4 \pm 2,5$ μmol FeSO₄/g emulsão A/O/A ou 7744 ± 249 μmol FeSO₄/g EHFP_{bs} na emulsão A/O/A, e utilizando o Trolox como padrão, foi de $15,9 \pm 0,9$ μmol TE/g emulsão A/O/A e 2176 ± 118 μmol TE/g EHFP_{bs} na emulsão A/O/A (Tabela 17).

Tabela 17 - Atividade antioxidante do EHFP pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•], compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) e poder de redução do íon férrico FRAP*

Método	Base de cálculo	
	Base emulsão A/O/A	Base EHFP _{bs} na emulsão A/O/A
ABTS^{•+} (mg TE/g amostra)	$3,5 \pm 0,1$	$482,0 \pm 12,2$
DPPH (%IA)	$25,6 \pm 3,0$	-
FCR (mg GAE/g amostra)	$1,8 \pm 0,2$	$244,7 \pm 21,5$
FRAP (μmol FeSO₄/g amostra)	$57,4 \pm 2,5$	7744 ± 249
FRAP (μmol TE/g amostra)	$15,9 \pm 0,9$	2176 ± 118

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3)

Fonte: autoria própria

Observou-se que a atividade antioxidante do EHFP foi mantida após o processo de emulsificação, pois os valores de atividade antioxidante por diferentes métodos, quando expressos em relação a quantidade de EHFP_{bs} presente na emulsão A/O/A, foram muito

próximos aos valores de atividade antioxidante determinados para o EHFP (Tabela 5). A pequena perda de atividade antioxidante do EHFP pode ser estar relacionada com o efeito da encapsulação, ou seja, extração parcial do ativo encapsulado, ou relacionada com eventuais perdas ao longo do processo de emulsificação, que envolve várias etapas, com muita aeração, inclusive.

De Moura et al. (2018) relataram que a encapsulação de extrato de hibisco em emulsão A/O/A manteve 60% dos compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu e 96,6% da atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH, em relação ao extrato de hibisco não encapsulado. Robert et al. (2019) determinaram a atividade antioxidante de emulsões A/O/A contendo extrato de folha de oliva como fase aquosa interna pelo método de poder de redução do íon férrico FRAP, e determinaram o valor de 2,38 a 2,74 $\mu\text{mol TE/g}$ de emulsão A/O/A, valor inferior ao encontrado nesta dissertação ($15,88 \pm 0,86 \mu\text{mol TE/g}$ de emulsão A/O/A).

5.4.9 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da emulsão A/O/A ótima, além da atividade antimicrobiana do EHFP diluído (ED) para a mesma concentração da emulsão A/O/A, foi avaliada pelo teste de difusão em disco, contra as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Salmonella* (Tabela 18), para fins de comparação e verificação do efeito da emulsificação. Assim como para o EHFP, o ED e a emulsão A/O/A não apresentaram halo de inibição contra a bactéria *E. coli*, entretanto, o ED apresentou halo de inibição contra as demais bactérias testadas (Figura 10), o que indica que a concentração do EHFP presente na emulsão A/O/A permite que este atue como agente antimicrobiano. Para as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*, os halos de inibição do ED foram visualmente e significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os halos de inibição da emulsão A/O/A (Tabela 18) ao passo que, para a bactéria *Salmonella*, não houve diferença visual e nem diferença significativa ($p > 0,05$) entre os halos de inibição do ED e da emulsão A/O/A.

Segundo Purwar, Verma e Batra (2019), para testes de difusão em disco, o halo de inibição é criado apenas quando o agente antimicrobiano difunde da amostra para o ágar, o que explica o menor halo de inibição da emulsão A/O/A em relação ao ED, visto que emulsões A/O/A podem atuar na liberação retardada dos compostos ativos encapsulados na fase aquosa interna (SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012). Estudos envolvendo a determinação da atividade antimicrobiana de emulsões A/O/A pelo método de difusão em disco são escassos.

Tabela 18 - Atividade antimicrobiana da emulsão A/O/A ótima e do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira diluído (ED) contra diferentes bactérias, baseada no halo de inibição (cm)

Bactéria	Cepa	Halo de inibição (cm)*		
		ED	A/O/A	Controle +**
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	0,0 ± 0,0 ^{cB}	0,0 ± 0,0 ^{bB}	3,3 ± 0,1 ^{bA}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	1,1 ± 0,2 ^{bB}	0,7 ± 0,1 ^{aC}	4,0 ± 0,1 ^{aA}
<i>Salmonella ssp</i>	ATCC 13076	0,8 ± 0,2 ^{bB}	0,6 ± 0,0 ^{aB}	3,9 ± 0,2 ^{aA}
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	1,3 ± 0,1 ^{aB}	0,7 ± 0,0 ^{aC}	3,4 ± 0,1 ^{bA}

*Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). ** Controle positivo: cloranfenicol (2,5 mg/mL). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

5.4.10 Morfologia da emulsão A/O/A ótima

As análises da emulsão A/O/A por microscopia laser confocal permitiram visualizar a estrutura dos compartimentos da emulsão A/O/A, ficando evidente a morfologia esférica das gotas (Figura 22). A adição do corante Rodamina B, solúvel em água, no EHFP, permitiu visualizar a presença do EHFP encapsulado nas gotas de óleo da emulsão A/O/A (Figura 22A), confirmadas na micrografia sem excitação laser (Figura 22B). Por outro lado, o corante *fast green*, adicionado na fase aquosa externa e que colore proteínas, permitiu visualizar o que seriam estruturas formadas pelo caseinato de sódio na interface das gotas de óleo e da fase aquosa externa (Figura 22D). É possível, também, observar as gotas de EHFP dispersas na gota de óleo de soja (Figura 22C) quando se adicionou o corante calcoflúor na fase aquosa externa. Não foi possível obter microscopias da emulsão A/O separadamente, devido à limitação da sensibilidade do microscópio confocal utilizado.

Figura 22 - Microscopias da emulsão A/O/A ótima. (A e B) corante Rodamina B, (C) corante calcoflúor e (D) corante *Fast green*

Fonte: autoria própria

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS

5.5.1 Aspecto visual

Exemplos de filmes produzidos nesta dissertação estão apresentados nas Figuras 23 e 24. Os filmes a base de gelatina (4 g/100 g solução filmogênica (SF)) incorporados com a

emulsão A/O/A em diferentes concentrações (0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 g EHFP_{bs} na emulsão A/O/A/100 g gelatina) apresentaram coloração homogênea, sem zonas quebradiças, e foram facilmente retirados das placas de Petri, entretanto, apresentaram separação da fase lipídica da emulsão A/O/A após o processo de secagem, que pôde ser vista na superfície filme/ar (Figura 23). A concentração de 0,25 g de EHFP_{bs} na emulsão A/O/A/100 g gelatina, que corresponde a 11 g óleo/100 g gelatina, foi a concentração com melhor incorporação na matriz filmogênica, com menor oleosidade visível e, portanto, essa concentração foi escolhida para a produção dos filmes a base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana.

Figura 23 - Aspecto visual dos filmes a base de gelatina. (A) 0,25; (B) 0,50; (C) 0,75 e (D) 1,00 g de EHFP_{bs} na emulsão A/O/A/100 g gelatina

Fonte: autoria própria

Figura 24 - Aspecto visual dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), com (E) e sem (C) emulsão A/O/A

Fonte: autoria própria

Todos os filmes incorporados com emulsão A/O/A (0,25 g EHFP_{bs} na emulsão A/O/A/100 g biopolímeros), foram facilmente manuseados e retirados das placas de Petri, apresentaram coloração homogênea, sem áreas quebradiças, fissuradas ou com bolhas e aspecto homogêneo, com exceção dos filmes a base de quitosana (QC) e com emulsão A/O/A (QE), que apresentaram aspecto não homogêneo devido à presença de partículas de quitosana não solubilizadas (Figura 24). Os filmes a base de gelatina com emulsão A/O/A (GE) e de blenda de gelatina/quitosana com emulsão A/O/A (GQE) e os filmes QE apresentaram coloração levemente esbranquiçada e visualmente foram mais opacos, devido à presença da emulsão A/O/A.

5.5.2 Espessura

A espessura dos filmes com, ou sem, emulsão A/O/A foi praticamente constante, variando entre 0,080 e 0,084 mm ($p > 0,05$) (Tabela 19), não sendo, portanto, a espessura um fator interferente nas demais propriedades analisadas. A espessura constante dos filmes demonstra que o controle da massa de solução filmogênica depositada nas placas de Petri para secagem foi eficiente (BITENCOURT et al., 2014).

Tabela 19 - Espessura dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A

Matriz	Espessura (mm)*	
	C	E
G	0,084 ± 0,001 ^{aA}	0,080 ± 0,004 ^{aA}
Q	0,083 ± 0,004 ^{aA}	0,082 ± 0,005 ^{aA}
GQ	0,082 ± 0,002 ^{aA}	0,080 ± 0,002 ^{aA}

*Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=10). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

5.5.3 Umidade

A determinação da umidade (U) de filmes é importante devido ao efeito plastificante da água, que influencia as características do material (PÉREZ-CÓRDOBA, 2018). A adição da

emulsão A/O/A nos filmes provocou redução ($p<0,05$) da umidade nos filmes GQ, mas não afetou a umidade dos filmes G e Q ($p>0,05$) (Tabela 20). E, os filmes a base de quitosana, apresentaram maiores ($p<0,05$) valores de umidade. Os filmes a base de gelatina apresentaram umidade em torno de 16%, enquanto que nos filmes a base de quitosana, a umidade ficou entre 27 e 30%, sendo que essa variação foi mais importante para os filmes a base de blenda gelatina/quitosana (Tabela 20).

Pérez-Córdoba (2018) não identificou alteração na umidade de filmes à base de gelatina/quitosana incorporados com emulsão simples O/A, e explicou que neste caso, a fração oleosa presente na emulsão não foi suficiente para alterar a higroscopicidade dos filmes, sendo que esta depende predominantemente do tipo de biopolímero e da presença do plastificante (glicerol).

Tabela 20 - Umidade e solubilidade dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*

Matriz	U (%)		S (%)	
	C	E	C	E
G	$16,0 \pm 0,3^{cA}$	$15,5 \pm 0,7^{bA}$	$51,8 \pm 0,4^{aA}$	$48,1 \pm 2,2^{aB}$
Q	$27,0 \pm 1,4^{aA}$	$29,9 \pm 1,9^{aA}$	$44,2 \pm 0,8^{bA}$	$40,8 \pm 2,3^{bB}$
GQ	$19,4 \pm 0,3^{bA}$	$14,8 \pm 0,4^{bB}$	$46,2 \pm 0,2^{bA}$	$38,6 \pm 0,8^{bB}$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$).

Fonte: autoria própria

5.5.4 Solubilidade em água

A solubilidade em água (S) dos filmes à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana diminuiu ($p<0,05$) com a incorporação da emulsão A/O/A (Tabela 20). A adição da emulsão A/O/A nos filmes provocou a diminuição da S de 52 para 48%, no caso dos filmes G, de 44 para 41%, no caso dos filmes Q, e de 46 para 39% no caso dos filmes GQ. Em relação ao efeito do biopolímero, observou-se que os filmes G foram mais solúveis que os outros dois, que apresentaram S significativamente similares, independentemente da presença da emulsão (Tabela 20).

A menor solubilidade dos filmes incorporados com emulsão A/O/A foi devido, muito possivelmente, à presença de óleo de soja na emulsão A/O/A que passou para a matriz de gelatina, diminuindo assim a hidrofilicidade dos filmes e, conseqüentemente, sua parcela solúvel capaz de interagir com a água (DAMMAK et al., 2017a; PÉREZ-CÓRDOBA et al., 2017). Além disso, a maior solubilidade do filme à base de gelatina está relacionada com a maior afinidade que as cadeias polipeptídicas da gelatina possuem com a água em comparação à afinidade das cadeias de quitosana (HOSSEINI et al., 2013)

Dammak et al. (2017a) e Pérez-Córdoba et al. (2017) trabalharam com filmes à base de gelatina e blenda gelatina/quitosana, respectivamente, e incorporaram emulsão O/A, contendo óleo de soja e óleo de canola como fase dispersa, respectivamente, e relataram uma diminuição na solubilidade de filmes à base de blenda gelatina/quitosana após incorporação de emulsão simples O/A. Segundo Pérez-Córdoba et al. (2017), a solubilidade dos filmes à base de blenda gelatina/quitosana diminuiu de 50,8% para valores entre 43 e 48% após a adição da emulsão O/A, ao passo que Dammak et al. (2017a) relataram que a solubilidade dos filmes à base de gelatina diminuíram de 58% para valores entre 51 e 54% após a incorporação da emulsão O/A.

5.5.5 Microestrutura

5.5.5.1 Microscopia de força atômica (AFM)

Os filmes GE, QE e GQE, ou seja, incorporados com emulsão A/O/A, apresentaram topografias de superfície diferentes daquelas apresentadas pelos filmes sem emulsão A/O/A, principalmente nos filmes de quitosana (Q e GQ) (Figura 25). Pode ser observado, nas micrografias 3D desses filmes (QE e GQE), uma topografia irregular, com a presença de grande quantidade de picos espessos. Na micrografia 2D, essas estruturas apareceram como pontos mais claros, em grande quantidade (Figura 25). Por outro lado, no caso dos filmes GE, as topografias observadas em 2D e 3D aparentaram-se como mais lisas. No caso dos filmes sem a emulsão A/O/A, é possível se observar, nas micrografias 3D, que a topografia superficial foi mais lisa, com estruturas finas, em escalas nanométricas, e em baixa densidade topográfica. Os resultados observados na micrografia 2D corroboram com essa análise.

Figura 25 - Imagens representativas da microestrutura dos filmes (topografia em 3D e topografia em 2D) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A

Fonte: autoria própria

As micrografias de fases (Figura 26) apontaram separação de fases na superfície dos filmes QE e GQE, muito possivelmente devido à presença das estruturas na forma de picos mais espessos (fase escura) (BONILLA et al., 2018; PÉREZ-CÓRDOBA et al., 2017; WANG et al., 2013).

Figura 26 - Imagens representativas da microestrutura dos filmes (imagem de fases) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A

Fonte: autoria própria

A rugosidade média (R_a), calculada a partir das topografias de superfície dos filmes sem emulsão, foi muito menor que a dos filmes incorporados com emulsão A/O/A, o que demonstrou que a presença da emulsão na matriz biopolimérica, provocou irregularidade na

topografia dos filmes, como discutido acima (Tabela 21). Os filmes GE ($74,7 \pm 12,2$ nm), QE ($80,9 \pm 5,8$ nm), GQE ($87,5 \pm 8,9$ nm) apresentaram valores de R_a significativamente maiores ($p < 0,05$) que os valores de R_a dos filmes GC ($8,4 \pm 2,9$ nm), QC ($14,6 \pm 1,5$ nm) e GQC ($16,3 \pm 1,0$ nm). Em relação ao efeito do biopolímero, observou-se que apenas o filme G apresentou valor de R_a ($8,4 \pm 2,9$ nm) menor do que os outros, pois haviam partículas insolúveis de quitosana nos filmes à base de Q e GQ, que aumentaram a rugosidade média dos filmes.

Dammak e Sobral (2019) determinaram valor de R_a de 64 nm para filme à base de gelatina incorporado com emulsão O/A, ao passo que Wang et al. (2013) determinaram a R_a de filme à base de caseinato de sódio incorporado com emulsão O/A de 89 nm, valores estes similares aos encontrados para a R_a dos filmes GE, QE e GQE (Tabela 21). Bonilla et al. (2018) relataram valores de R_a de até 200 nm para filmes à base de gelatina, quitosana ou blenda gelatina/quitosana incorporados com óleo essencial e gengibre e eugenol, sem emulsificação prévia.

Tabela 21 - Rugosidade média dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A

Matriz	R_a (nm)*	
	C	E
G	$8,4 \pm 2,9^{bB}$	$74,7 \pm 12,2^{aA}$
Q	$14,6 \pm 1,5^{aB}$	$80,9 \pm 5,8^{aA}$
GQ	$16,3 \pm 1,0^{aB}$	$87,5 \pm 8,9^{aA}$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

5.5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas por MEV (Figura 27) corroboraram os resultados apresentados e discutidos em 5.5.5.1. As superfícies dos filmes sem emulsões apresentaram-se lisas e homogêneas, enquanto as superfícies dos filmes contendo emulsões A/O/A apresentaram-se com certa irregularidade, ou seja, com aspecto de falta de uniformidade, embora não seja possível se observar a topografia, como no caso do AFM.

Figura 27 - Imagens representativas da microestrutura dos filmes (superfície e seção transversal) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A

Fonte: autoria própria

No caso dos filmes contendo emulsão A/O/A, foi possível identificar estruturas, possivelmente formadas devido a presença de óleo na superfície dos filmes (Figura 27). O efeito da adição da emulsão A/O/A na matriz biopolimérica foi mais visível nas micrografias internas dos filmes, sendo possível se observar estruturas muito homogêneas e lisas, no caso dos filmes sem a emulsão A/O/A (GC, QC, GQC), em contraste com a estrutura porosa e com fraturas, com aspecto mais grosseiro, na microestrutura interna dos filmes GE, QE e CGE (Figura 27).

A formação de poros no interior dos filmes GE, QE e GQE, observada no corte transversal dos filmes, pode ser explicada pela formação de gotas de óleo, presentes na matriz (BONILLA et al., 2018). Segundo Atarés e Chiralt (2016), a microestrutura final dos filmes incorporados com óleos é influenciada pelo arranjo estrutural dos componentes dispersos na solução filmogênica, além do comportamento destes componentes ao longo do processo de secagem, pois podem ocorrer processos de desestabilização, tais como floculação e coalescência. Dammak et al. (2017b) observaram migração de óleo para a superfície de filmes à base de gelatina incorporados com emulsão O/A, ao passo que Hosseini et al. (2016) observaram esse comportamento apenas para filmes à base de blenda gelatina/quitosana com maiores concentrações de óleo essencial de orégano não emulsificado. Bonilla et al. (2018) observaram estrutura interna similarmente porosa para filmes à base de blenda gelatina/quitosana incorporados com óleo essencial de gengibre, que não foram emulsificados previamente.

5.5.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros obtidos pela espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) são importantes para a identificação de grupos funcionais e o acompanhamento de mudanças estruturais de filmes, em nível molecular (DAMMAK et al., 2017). A incorporação de emulsão A/O/A não modificou os espectros dos filmes GE, QE e GQE em relação aos filmes GC, QC e GQC, exceto pelo surgimento de um pico pouco intenso em 1744 cm^{-1} (Figura 28), característico do estiramento da ligação C=O de ésteres de ácido graxo presentes no óleo de soja, e já reportado por outros autores (PÉREZ-CÓRDOBA, 2018; KAYA et al., 2018a).

Para todos os filmes, bandas fracas entre 3000 e 2800 cm^{-1} indicam vibração de estiramento das ligações C-H (Tabela 22), presentes nas cadeias de gelatina e quitosana. Os filmes GC e GE apresentaram bandas características de filmes à base de gelatina, como a banda em 1238 cm^{-1} , em ambos os filmes, é característica do dobramento das ligações C-N e N-H da

amida-III ou vibrações dos grupos $-\text{CH}_2$ presentes no glicerol, já reportada por outros autores (BENBETTAÏEB et al., 2014; BONILLA; SOBRAL, 2016), além das bandas em 3288 e 2298 cm^{-1} (GC e GE, respectivamente), que indicam vibrações de estiramento N-H de amida mono substituída acoplada com a ligação COO em 1631 cm^{-1} (amida-I). Bandas em 1452 cm^{-1} , presentes nos filmes GC e GE, indicam a vibração dos grupos $-\text{OH}$ presentes no grupo alcóolico primário da gelatina (BONILLA et al., 2018).

Figura 28 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão

*v: estiramento

Fonte: autoria própria

Tabela 22 - Bandas espectrais específicas e suas funções obtidas por espectroscopia de infravermelho com transformada em Fourier para os filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A **

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupos*	GC	QC	GQC	GE	QE	GQE
3600 – 3100	ν_{O-H} , ν_{N-H} amidaA e água livre	3288	3253	3286	3298	3257	3285
2960 – 2850	ν_{C-H}	2936	2879	2937	2938	2927	2928
1750 – 1740	$\nu_{C=H}$ ésteres de ácido graxo	-	-	-	1744	1744	1744
1660 – 1630	ν_{C-O} amida-I	1631	1635	1631	1631	1635	1633
1570 – 1540	δ_{N-H} amida-II	1547	1546	1546	1547	1546	1546
1460 – 1450	ν_{O-H} alcóois	1452	-	1451	1452	-	1451
1410 – 1325	δ_{O-H} , δ_{C-H} , δ_{CH_3}	1402	1407	1404	1401	1407	1405
1310 – 1204	δ_{CN} , δ_{NH} amida-III	1238	1257	1239	1238	1249	1241
1167 – 1033	ν_{C-O-C} outros grupos	1152	1152	1157	1142	1152	1154
1053 – 1020	ν_{C-O-H} Ar	1035	1024	1034	1036	1026	1033
1150 – 900	Ar e grupos amino	921	925	923	922	925	923

*v: estiramento; δ : dobramento; Ar: anel aromático

****Fonte:** adaptado de Benbettaïeb et al. (2014)

Os filmes QC e QE também apresentaram bandas características de filmes à base de quitosana, como as bandas em 1024 cm⁻¹ (QC) e 1026 cm⁻¹ (QE) indicativas da vibração de estiramento da ligação C-O-H no anel aromático presente na molécula de quitosana, e bandas de vibrações fora do plano do anel em 925 cm⁻¹ (BENBETTAÏEB et al., 2014; KAYA et al., 2018a). As bandas 1635 cm⁻¹ (amida-I do grupo acetil), 1546 cm⁻¹ (banda de absorção do NH₃⁺ parcialmente sobreposta à banda da amida-II) e 1257-1249 cm⁻¹ (amida-III ou vibração do grupo -CH₂ presente no glicerol) também foram observadas para os filmes QC e QE, assim como reportado por Bonilla et al. (2018); Benbettaïeb et al. (2014); Kaya et al. (2018a); Pereda et al. (2011). As bandas referentes à amida-I e à amida-III foram ligeiramente maiores para os filmes QC e QE em relação aos demais filmes, comportamento já observado por outros autores (BENBETTAÏEB et al., 2014; HOSSEINI et al., 2013) e que pode estar relacionado à presença de aminoácidos e carbonilas (HOSSEINI et al., 2013), que interagem eletrostaticamente e indicam a formação de um complexo polieletrólito.

Os filmes GQC e GQE apresentaram bandas características da gelatina e da quitosana, devido à presença de ambos os componentes, comportamento também observado por Pereda et

al. (2011), como a banda em 1451 cm^{-1} , referente a vibração dos grupos -OH presentes no grupo alcóolico primário da gelatina, e não identificados nos filmes à base de quitosana (QC e QE), bem como maior intensidade nas bandas referentes à amida-II, fato também observado para os filmes à base de gelatina (Figura 28). Além disso, a intensidade e região das bandas observadas nos filmes GQC e GQE se aproximaram mais às bandas características de filmes à base de gelatina (Tabela 22), visto que este biopolímero está presente em maior concentração na blenda gelatina/quitosana, indicando interações intermoleculares entre os biopolímeros, e não apenas uma superposição dessas matrizes (BENBETTAÏEB et al., 2014).

5.5.7 Difração de raios-X (DRX)

Todos os filmes apresentaram espectros característicos de materiais semicristalinos, cujos espectros dos filmes de mesmo biopolímero apresentaram padrões de difração semelhantes (Figura 29). A incorporação da emulsão A/O/A aos filmes à base de quitosana diminuiu a intensidade dos picos de difração, aumentou a intensidade dos picos de difração dos filmes à base de blenda gelatina/quitosana e não alterou a intensidade dos picos de difração do filme à base de gelatina.

Os filmes à base de gelatina e blenda gelatina/quitosana (GC, GQC e GQE), com exceção do filme GE, apresentaram pico de difração característico da presença da estrutura cristalina da tripla hélice da gelatina ($2\theta = 7^\circ$ e 10°) e referente à fase amorfa da gelatina ($2\theta = 20^\circ$) (YAKIMETS et al., 2007), picos estes também já observados por outros autores que produziram filmes à base de gelatina ou blenda gelatina/quitosana (PÉREZ-CÓRDOBA, 2018; PEREDA et al., 2011b; QIAO et al., 2017a; VALENCIA et al., 2016; YAKIMETS et al., 2005, 2007).

O aparecimento do pico correspondente à $2\theta = 12^\circ$ no filme GE, não identificado no filme GC, e a ausência do pico $2\theta = 7^\circ$, correspondem à presença da estrutura semicristalina do caseinato de sódio presente na emulsão A/O/A (presença do pico $2\theta = 12^\circ$) e diminuição das estruturas tripla-hélice na gelatina pela interação do caseinato de sódio (desaparecimento do pico $2\theta = 7^\circ$) (RANJBARYAN; POURFATHI; ALMASI, 2019). O pico $2\theta = 12^\circ$ também pôde ser observado nos demais filmes incorporados com emulsão A/O/A (QE e GQE).

Os picos em $2\theta = 9$ e 12° presentes nos filmes de quitosana (QC e QE) são característicos de cristais do tipo I presentes na estrutura de quitosana (PEREDA et al., 2011; QIAO et al., 2017a), ao passo que o pico em $2\theta = 20^\circ$ corresponde à fase amorfa (PEREDA et al., 2011). Nos filmes à base de blenda gelatina/quitosana, houve o desaparecimento do pico em $2\theta = 10^\circ$

(caraterístico da gelatina) e diminuição da intensidade dos picos $2\theta = 7$ e 12° , também observada por Qiao et al. (2017a), e explicada pela diminuição da quantidade de estruturas tripla-hélice da gelatina devido à interação com as cadeias de quitosana e com o caseinato de sódio, para o filme incorporado com emulsão A/O/A.

Figura 29 - Espectros de difração de raios-X dos filmes de (GC) gelatina, (GE) gelatina com emulsão A/O/A, (QC) quitosana, (QE) quitosana com emulsão A/O/A, (GQC) blenda gelatina/quitosana, (GQE) blenda gelatina/quitosana com emulsão A/O/A

Fonte: autoria própria

A incorporação da emulsão A/O/A aos filmes GQE aumentou a intensidade dos picos de difração característico da região amorfa ($2\theta = 20^\circ$) quando comparados aos espectros dos

filmes GQC, indicando que a presença da emulsão A/O/A, visto que o caseinato de sódio possui regiões cristalinas e amorfas em sua estrutura, contribuindo para a intensidade da difração. Pérez-Córdoba (2018) também relatou o aumento dos picos de difração e cristalinidade de filmes à base de gelatina/quitosana quando incorporados com emulsão O/A (RANJBARYAN; POURFATHI; ALMASI, 2019).

5.5.8 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana diminuiu com a incorporação da emulsão A/O/A (Tabela 23). Os valores de PVA dos filmes GE ($0,35 \pm 0,03$ g.mm/m².h.kPa), QE ($0,25 \pm 0,02$ g.mm/m².h.kPa) e GQE ($0,23 \pm 0,01$ g.mm/m².h.kPa) foram significativamente menores ($p < 0,05$) do que os valores de PVA dos filmes GC (de $0,40 \pm 0,01$ g.mm/m².h. kPa), QC ($0,42 \pm 0,02$ g.mm/m².h. kPa) e GQC ($0,26 \pm 0,01$ g.mm/m².h. kPa). Por outro lado, analisando-se o efeito do biopolímero, observou-se que o filme GQ apresentou menor ($p < 0,05$) valor de PVA em relação aos outros dois filmes sem emulsão, enquanto que o filme GE apresentou maior ($p < 0,05$) valor de PVA em relação aos outros dois filmes com emulsão A/O/A (Tabela 23).

Tabela 23 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e ângulo de contato ($\hat{A}C$) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*

Matriz	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)		$\hat{A}C$ (°)	
	C	E	C	E
G	$0,40 \pm 0,01^{aA}$	$0,35 \pm 0,03^{aB}$	90 ± 3^{aA}	71 ± 1^{aB}
Q	$0,42 \pm 0,02^{aA}$	$0,25 \pm 0,02^{bB}$	79 ± 4^{bA}	72 ± 4^{aA}
GQ	$0,26 \pm 0,01^{bA}$	$0,23 \pm 0,01^{bB}$	76 ± 3^{bA}	69 ± 3^{aB}

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

A diminuição do valor de PVA dos filmes incorporados com emulsão A/O/A possivelmente está associada à presença do óleo, que diminui a hidrofiliabilidade da matriz

(HOSSEINI et al., 2016), e à interação entre o caseinato de sódio e a matriz, que resulta em uma matriz mais coesa, dificultando a difusividade da água. O fato dos valores de PVA dos filmes QE e GQE serem significativamente menores ($p < 0,05$) do que o PVA do filme GE está relacionado com a menor afinidade que a quitosana possui com a água comparada à afinidade da gelatina com a água (BENBETTAÏEB et al., 2014)

Hosseini et al. (2016) reportaram diminuição no PVA de filmes à base de blenda gelatina/quitosana incorporados apenas com óleo essencial de orégano em comparação ao filme controle (0,71 e 0,48 g.mm/m².h. kPa, respectivamente). Entretanto, outros estudos relataram o aumento da PVA de filmes à base de gelatina, quitosana e/ou blenda gelatina/quitosana incorporados com diferentes tipos de óleos (não emulsificados previamente), pois a difícil incorporação destes na matriz hidrofílica dos filmes pode causar ruptura da mesma, criando grandes espaços vazios por onde o vapor de água permeia (BONILLA et al., 2018; DAMMAK et al., 2017). Pérez-Córdoba (2018) relatou que a incorporação de emulsão simples O/A contendo óleo de canola como fase dispersa não afetou os valores de PVA de filmes à base de blenda gelatina/quitosana.

Embora haja diferença significativa entre os valores de PVA dos filmes controles e dos filmes contendo emulsão A/O/A, todos os filmes podem ser considerados como tendo alto valor de PVA, sem nenhuma melhora significativa nesta propriedade do ponto de vista de aplicação (PÉREZ-CÓRDOBA; SOBRAL, 2017).

5.5.9 Ângulo de contato da gota de água

O ângulo de contato ($\hat{A}C$) de uma gota de água na superfície do filmes pode variar de acordo com as forças coesivas existentes no líquido e de acordo com as forças adesivas entre o líquido e o sólido (DAMMAK et al., 2017), e pode fornecer uma ideia sobre a molhabilidade do material. Os valores de $\hat{A}C$ dos filmes à base de gelatina ou de blenda gelatina/quitosana diminuíram ($p < 0,05$), com a incorporação da emulsão A/O/A, de 90 ± 3 para $71 \pm 1^\circ$ e de 76 ± 3 para $69 \pm 3^\circ$, respectivamente, não se observando diferença significativa ($p > 0,05$) no caso dos filmes a base de quitosana (Tabela 23). Não se observou efeito ($p > 0,05$) dos biopolímeros em $\hat{A}C$ dos filmes com emulsão A/O/A, mas no caso dos filmes controle, o $\hat{A}C$ do filme GC foi maior ($p < 0,05$) que os outros dois.

Os resultados do efeito da adição da emulsão A/O/A na matriz biopolimérica estão de acordo com os resultados da rugosidade dos filmes (Tabela 21). Em princípio, além de outros

eventuais efeitos químicos, quanto maior for a rugosidade do material, menor será o ÂC, em virtude da maior superfície específica do material. Logo, o comportamento observado nesta dissertação pode ser explicado pelo efeito da emulsão A/O/A sobre a rugosidade dos filmes. Segundo Pérez-Córdoba (2018), a diminuição do valor de ÂC pela incorporação de emulsão, pode estar relacionada com a orientação dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na matriz filmogênica, além da eventual migração de óleo para a superfície do filme, aumentando assim, a hidrofobicidade do material. Além disso, os emulsificantes presentes na emulsão A/O/A podem ter reduzido a tensão interfacial entre a gota de água e a superfície hidrofóbica dos filmes, ocasionando a diminuição do valor de ÂC (DAMMAK et al., 2017).

Pérez-Córdoba (2018) relatou que a incorporação de emulsão O/A em filmes à base de blenda gelatina/quitosana reduziu o ÂC de 91° para valores entre 61 e 87° , valores estes na mesma faixa de valores encontrados para os filmes GE, QE e GQE (Tabela 23). Dammak et al. (2017a) também relataram a diminuição do ÂC em filmes à base de blenda gelatina/quitosana incorporados com emulsão simples O/A, de $103,5^\circ$ para valores entre $65,8^\circ$ e $95,8^\circ$.

5.5.10 Propriedades mecânicas

5.5.10.1 Teste de tração uniaxial

A adição da emulsão A/O/A nos filmes provocou aumento ($p < 0,05$) da resistência (TR) e da rigidez (ME) dos filmes a base de gelatina ou quitosana, observando-se comportamento inverso ($p < 0,05$) em relação aos filmes a base de blenda de gelatina/quitosana (Tabela 24). A adição da emulsão A/O/A aumentou a TR dos filmes GC ($27,2 \pm 1,7$) em relação a GE ($80,4 \pm 7,4$ MPa) e dos filmes QC ($39,5 \pm 3,4$) para QE ($81,5 \pm 5,3$ MPa), ao passo que diminuiu nos filmes a base de blenda gelatina/quitosana, de (GQC) $67,9 \pm 0,9$ para (GQE) $38,0 \pm 0,8$ MPa.

Similarmente, em relação à rigidez, os filmes GE e QE apresentaram ME ($15,5 \pm 0,2$ MPa e $9,3 \pm 0,5$ MPa, respectivamente) significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparados aos filmes GC e QC ($8,5 \pm 0,8$ MPa e $7,0 \pm 0,7$ MPa, respectivamente), ao passo que a rigidez do filme GQE ($5,4 \pm 0,5$ MPa) foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação aos filmes GE e QE, e também em relação ao filme GQC ($11,0 \pm 1,1$ MPa).

O aumento da resistência e rigidez dos filmes à base de gelatina ou quitosana com a adição da emulsão A/O/A possivelmente está relacionada com a presença de caseinato de sódio na fase aquosa externa da emulsão A/O/A. O caseinato de sódio é uma proteína que contém

grupos hidrofóbicos capazes de interagir com a gelatina (DAMMAK; SOBRAL, 2019), além de possuir grupos aniônicos que interagem eletrostaticamente com os grupos catiônicos da quitosana (VOLPE et al., 2017), resultando no aumento da resistência e rigidez dos filmes. No caso do filme à base de blenda gelatina/quitosana incorporado com emulsão A/O/A, possivelmente a interação eletrostática entre as cadeias da blenda e o caseinato de sódio foram menos expressivas, sobressaindo-se assim o efeito plastificante do óleo de soja presente na emulsão A/O/A, que reduziu a TR e o ME com a adição da emulsão A/O/A.

Tabela 24 - Tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) dos filmes à base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*

Matriz	TR (MPa)		ER (%)		ME (MPa)	
	C	E	C	E	C	E
G	27,2 ± 1,7 ^{cB}	80,4 ± 7,4 ^{aA}	14,5 ± 0,8 ^{bB}	23,6 ± 2,1 ^{bA}	8,5 ± 0,8 ^{bB}	15,5 ± 1,2 ^{aA}
Q	39,5 ± 3,4 ^{bB}	81,5 ± 5,3 ^{aA}	44,0 ± 3,2 ^{aA}	45,0 ± 3,1 ^{aA}	7,0 ± 0,7 ^{bB}	9,3 ± 0,7 ^{bA}
GQ	67,9 ± 0,9 ^{aA}	38,0 ± 0,8 ^{bB}	11,4 ± 0,8 ^{bB}	48,8 ± 2,1 ^{aA}	11,0 ± 1,0 ^{aA}	5,4 ± 0,5 ^{cB}

*Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=10). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

Dammak e Sobral (2019), trabalhando com filmes à base de gelatina incorporado com emulsão O/A, identificaram que a presença do caseinato de sódio como emulsificante hidrofílico na emulsão O/A aumentou a resistência do filme (10,6 para 22,4 MPa). Volpe et al. (2017) relataram que para os filmes à base de blenda quitosana/caseinato de sódio, com diferentes proporções, a resistência foi consideravelmente maior (15 a 20 MPa) do que a resistência do filme à base de quitosana pura (0,6 MPa), comprovando boa compatibilidade entre os biopolímeros.

Por fim, a adição da emulsão A/O/A nas diferentes matrizes aumentou a flexibilidade (ER) dos filmes à base de gelatina ou blenda gelatina/quitosana, mas não afetou a flexibilidade do filme à base de quitosana. Os filmes GE e GQE apresentaram valores de ER (23,6 ± 2,1% e 48,8 ± 2,1%, respectivamente), significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os valores de ER dos filmes GC e GQC (14,5 ± 0,8% e 11,4 ± 0,8%, respectivamente), ao passo que o filme QE

apresentou ER estatisticamente igual ($p > 0,05$) a ER do filme QC ($44,0 \pm 3,2\%$ e $45,0 \pm 3,1\%$, respectivamente). Além disso, os filmes QE e GQE não apresentaram ER significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$), mas apresentaram valores de ER significativamente maiores em relação ao filme GE ($p < 0,05$).

O aumento da flexibilidade dos filmes GE e GQE pode ser explicado pelo efeito plastificante do óleo de soja presente na emulsão A/O/A, resultando no aumento das propriedades dúcteis (RAMOS et al., 2012). No caso dos filmes à base de quitosana, a incorporação de glicerol como plastificante resultou em filmes muito mais flexíveis do que os filmes à base dos outros biopolímeros (BENBETTAÏEB et al., 2014), portanto a incorporação da emulsão A/O/A não afetou a ER do filme QE, que já era elevada no filme QC. O filme GE apresentou menor flexibilidade em relação aos filmes QE e GQE pois sua rigidez foi maior, resultando em uma menor mobilidade das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, menor flexibilidade, o que também pode indicar melhor compatibilidade entre o caseinato de sódio e a gelatina.

Pérez-Córdoba et al. (2017), trabalhando com filmes à base de blenda gelatina/quitosana incorporado com uma emulsão O/A, observaram aumento significativo na ER dos filmes incorporados com a emulsão O/A contendo óleo de canola e cinamaldeído e α -tocoferol como fase dispersa e água e Tween 20 como fase aquosa dispersante, cujos valores de ER aumentaram de 89% para 108 a 123%. Hosseini et al. (2016) também atribuíram o aumento da flexibilidade de filmes a base de gelatina/quitosana à presença do óleo essencial de orégano incorporado na matriz.

5.5.10.2 Teste de perfuração

A incorporação de emulsão A/O/A nos filmes à base de gelatina ou quitosana aumentou a resistência à perfuração (FP) e a deformação à perfuração (DR) dos filmes, ao passo que diminuiu a FP e DR no filme à base de blenda gelatina/quitosana (Tabela 25). A adição da emulsão provocou aumento ($p < 0,05$) na FP dos filmes de G (de GC= $18,8 \pm 1,0$ N para GE= $69,8 \pm 3,6$ N) e Q (de QC= $22,6 \pm 2,3$ N para QE= $75,1 \pm 5,0$ N), mas provocou diminuição ($p < 0,05$) no caso dos filmes de GQ (de GQC= $83,6 \pm 4,1$ N para GQE= $18,9 \pm 0,8$ N).

Em relação ao efeito do biopolímero, observou-se que a FP do filme GQE ($18,9 \pm 0,8$ N) foi menor ($p < 0,05$) que a dos filmes GE ($69,8 \pm 3,6$ N) e QE ($75,1 \pm 5,0$ N), para os quais não se observaram diferença significativa ($p < 0,05$). Nos filmes controle, observou-se

comportamento contrário, ou seja, a FP do filme GQC ($83,6 \pm 4,1$ N) foi maior ($p < 0,05$) que a dos outros filmes ($GC = 18,8 \pm 1,0$ N e $QC = 22,6 \pm 2,3$ N), que também não apresentaram diferença significativa entre suas FP (Tabela 25).

Tabela 25 - Força máxima na perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), com (E) e sem (C) emulsão A/O/A*

Matriz	FP (N)		DP (%)	
	C	E	C	E
G	$18,8 \pm 1,0^{bB}$	$69,8 \pm 3,6^{aA}$	$5,6 \pm 0,1^{bB}$	$9,4 \pm 0,3^{bA}$
Q	$22,6 \pm 2,3^{bB}$	$75,1 \pm 5,0^{aA}$	$6,9 \pm 0,2^{bB}$	$27,1 \pm 2,5^{aA}$
GQ	$83,6 \pm 4,1^{aA}$	$18,9 \pm 0,8^{bB}$	$14,7 \pm 1,2^{aA}$	$10,7 \pm 0,2^{bB}$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

Esses comportamentos foram similares ao observado para as propriedades mecânicas, resistência e rigidez dos filmes, determinadas com testes de tração (Tabela 24), podendo ser explicado pelas interações que o caseinato de sódio presente na emulsão A/O/A realiza com a gelatina ou quitosana, tornando os filmes mais resistentes à perfuração e mais deformáveis, ao passo que diminui a resistência à perfuração do filme à base de blenda gelatina/quitosana, possivelmente pelo efeito plastificante do óleo de soja da emulsão A/O/A que se sobressai em relação às interações que o caseinato de sódio é capaz de fazer com a blenda.

Pérez-Córdoba et al. (2017), trabalhando com filmes à base de blenda gelatina/quitosana, mas incorporando uma emulsão diferente (emulsão simples O/A), identificaram diminuição significativa da FR dos filmes incorporados com a emulsão O/A contendo óleo de canola e cinamaldeído, α -tocoferol e Span 60 como fase lipídica dispersa e água e Tween 20 como fase aquosa dispersante (12,9 para 6,6 N), comportamento inverso ao observado para os filmes à base de gelatina ou quitosana, mas similar ao observado para o filme à base de blenda gelatina/quitosana, e atribuiu esse efeito ao efeito plastificante do óleo de canola presente na emulsão, que também foi responsável pelo aumento na DP dos filmes (10,4 para 14,1%).

5.5.11 Propriedades ópticas e de superfície

5.5.11.1 Cor

A incorporação da emulsão A/O/A nos filmes à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana diminuiu ($p < 0,05$) a luminosidade (L^*) dos filmes e aumentou a diferença de cor (ΔE^*), ao passo que o parâmetro a^* diminuiu apenas para os filmes à base de gelatina e blenda gelatina/quitosana, e o b^* aumentou apenas para o filme à base de gelatina (Tabela 26).

A incorporação de emulsão A/O/A diminuiu significativamente ($p < 0,05$) os valores de L^* dos filmes GE, QE e GQE ($88,0 \pm 0,2$, $86,1 \pm 0,2$ e $84,2 \pm 0,4$, respectivamente) em relação aos filmes GC, QC e GQC ($89,0 \pm 0,2$, $88,9 \pm 0,1$ e $88,7 \pm 0,2$, respectivamente). Em relação ao parâmetro a^* , a incorporação da emulsão A/O/A diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o tom avermelhado dos filmes GE e GQE ($0,8 \pm 0,0$ e $0,8 \pm 0,1$, respectivamente) em relação aos filmes GC e GQC ($1,0 \pm 0,0$ e $1,3 \pm 0,0$, respectivamente), mas não alterou ($p > 0,05$) a coloração do filme Q, que ficou em torno de 1,5. De qualquer maneira, pode-se considerar que a^* foi muito próximo de zero, ou seja, no limite entre a cor verde ($-a^*$) e a vermelha ($+a^*$).

O parâmetro b^* , por sua vez, foi influenciado pela incorporação da emulsão A/O/A apenas para o filme de G, com aumento ($p < 0,05$) de $5,3 \pm 0,2$, no filme GC, para $6,1 \pm 0,2$, no filme GE. Os valores de b^* dos filmes de Q ($\sim 8,6$) e GQ ($\sim 6,7$) não sofreram influência ($p > 0,05$) da adição da emulsão A/O/A. Em consequência de todos esses resultados apresentados, pode-se observar que os filmes contendo a emulsão A/O/A foram mais coloridos que aqueles sem a emulsão. A emulsão provocou aumento dos valores da diferença total de cor (ΔE^*) de todos os filmes: de $5,5 \pm 0,3$ (GC) para $7,3 \pm 0,1$ (GE), de $8,9 \pm 0,1$ (QC) para $10,5 \pm 0,3$ (QE), e de $7,2 \pm 0,4$ (GQC) para $10,8 \pm 0,5$ (GQE). Em relação ao efeito do biopolímero, observou-se que a ΔE^* do filme GE ($7,3 \pm 0,1$) foi menor ($p < 0,05$) que as dos filmes QE e GQE, que permaneceram em torno de 10,7 ($p > 0,05$). No caso dos filmes sem emulsão A/O/A, o filme mais colorido foi o QC ($8,9 \pm 0,1$), seguido do GQC ($7,2 \pm 0,4$) e do GC ($5,5 \pm 0,3$) ($p < 0,05$). O aumento da diferença total de cor (ΔE^*) indicou que os filmes se tornaram mais coloridos pela adição da emulsão A/O/A, ou seja, com diferença maior de cor em relação ao padrão branco, entretanto, os valores determinados ainda são baixos, podendo ser considerados como próximos de zero.

Tabela 26 - Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A**

Matriz	L^*		a^*		b^*		ΔE^*	
	C	E	C	E	C	E	C	E
G	$89,0 \pm 0,2^{aA}$	$88,0 \pm 0,2^{aB}$	$1,0 \pm 0,0^{cA}$	$0,8 \pm 0,0^{bB}$	$5,3 \pm 0,2^{cB}$	$6,1 \pm 0,2^{cA}$	$5,5 \pm 0,3^{cB}$	$7,3 \pm 0,1^{bA}$
Q	$88,9 \pm 0,1^{aA}$	$86,1 \pm 0,2^{bB}$	$1,6 \pm 0,0^{aA}$	$1,4 \pm 0,1^{aA}$	$8,6 \pm 0,1^{aA}$	$8,7 \pm 0,3^{aA}$	$8,9 \pm 0,1^{aB}$	$10,5 \pm 0,3^{aA}$
G/Q	$88,7 \pm 0,2^{aA}$	$84,2 \pm 0,4^{cB}$	$1,3 \pm 0,0^{bA}$	$0,8 \pm 0,1^{bB}$	$6,6 \pm 0,4^{bA}$	$6,6 \pm 0,2^{bA}$	$7,2 \pm 0,4^{bB}$	$10,8 \pm 0,5^{aA}$

**Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=9). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

Embora a presença da emulsão tenha influenciado os valores de L^* dos filmes, eles foram muito altos, indicando que todos filmes foram claros (próximos de 100). Além disso, o fato da incorporação da emulsão A/O/A ter diminuído da tonalidade avermelhada do filme GE está relacionado com a tonalidade da própria emulsão A/O/A, que tende ao verde ($-b^*$). A emulsão não influenciou essa tonalidade dos filmes QE e GQE possivelmente pela presença da quitosana, que tem coloração característica (com tonalidade avermelhada). A presença da quitosana nos filmes QE e GQE também explica o fato desses filmes serem significativamente mais amarelados que o filme GE, e não terem sofrido alteração na tonalidade amarelada com a incorporação da emulsão A/O/A, ao passo que o filme GE teve a tonalidade amarelada significativamente maior com a presença da emulsão A/O/A, que também possuiu tonalidade tendendo ao amarelo ($+b^*$).

Bonilla et al. (2018) e Pérez-Córdoba (2018) também observaram a diminuição do valor do parâmetro a^* e aumento do valor de b^* para filmes à base de gelatina, quitosana ou blenda gelatina/quitosana quando incorporados com óleos essenciais (sem emulsificação) e emulsão O/A, respectivamente, comportamentos estes explicados pela coloração dos aditivos incorporados. Dammak et al. (2017a) também observaram a mesma tendência para filmes à base de gelatina incorporados com emulsão O/A

5.5.11.2 Opacidade

A opacidade dos filmes à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana aumentou ($p < 0,05$) com a incorporação da emulsão A/O/A nos filmes, de $1,0 \pm 0,1$ (GQ) para $7,0 \pm 0,5\%$ (GE), de $2,3 \pm 0,1$ (QC) para $4,3 \pm 0,4\%$ (QE) e de $0,6 \pm 0,0$ (GQC) para $4,9 \pm 0,4\%$ (GQE) (Tabela 27). Considerando-se o efeito dos biopolímeros, observou-se que no caso dos filmes contendo a emulsão A/O/A, o filme GE ($7,0 \pm 0,5\%$) apresentou a maior ($p < 0,05$) opacidade, sendo que não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre a opacidade dos filmes QE e GQE ($\sim 4,6\%$). Em relação aos filmes controles, independentemente das diferenças significativas observadas, pode-se considerar que eles foram muito pouco opacos (opacidade $\rightarrow 0$), ou seja, muito transparentes.

Segundo Atarés e Chiralt (2016), a adição de óleos nas matrizes filmogênicas reduzem consideravelmente a transmissão de luz, provavelmente devido à dispersão de luz na interface das gotículas de óleo, e consequentemente a opacidade dos filmes aumenta. Além disso, a fase

lipídica da emulsão A/O/A (imiscível na matriz) possui índice de refração diferente da matriz filmogênica, provocando aumento da opacidade dos filmes (WANG et al., 2013)

Tabela 27 - Opacidade dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*

Matriz	Opacidade (%)	
	C	E
G	$1,0 \pm 0,1^{bB}$	$7,0 \pm 0,5^{aA}$
Q	$2,3 \pm 0,1^{aB}$	$4,3 \pm 0,4^{bA}$
GQ	$0,6 \pm 0,0^{cB}$	$4,9 \pm 0,4^{bA}$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=9). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

Vários autores observaram o aumento na opacidade de filmes à base de gelatina, quitosana e/ou blenda gelatina/quitosana incorporados com óleos essenciais ou emulsões contendo óleo (ATARÉS; CHIRALT, 2016; BONILLA et al., 2018; PÉREZ-CÓRDOBA et al., 2017; WANG et al., 2013). A opacidade dos filmes contendo emulsão A/O/A são similares com os valores de opacidade relatados por Bonilla et al. (2018) para filmes à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana incorporados com óleo essencial de gengibre (5,4%, 3,4% e 4,3%, respectivamente), sem prévia emulsificação.

5.5.11.3 Brilho

O brilho dos filmes é uma propriedade de superfície relacionada com a rugosidade superficial, ou seja, o polimento da superfície, e possui escala arbitrária (DAMMAK et al., 2017). Observou-se, segundo os resultados obtidos a 20° e 60° (Tabela 28), que a incorporação da emulsão A/O/A provocou enorme diminuição do brilho de todos os filmes estudados, o que está de acordo com os resultados da rugosidade dos filmes (Tabela 21): os filmes contendo a emulsão A/O/A, com maior rugosidade, apresentaram-se com menor brilho que os filmes controles.

Os valores de brilho dos filmes GE, QE e GQE, determinados com 20°, foram $6,0 \pm 0,7^\circ$, $2,6 \pm 0,3^\circ$ e $9,3 \pm 0,6^\circ$, respectivamente, muito menores ($p < 0,05$) do que os valores de brilho dos filmes GC, QC e GQC ($71,0 \pm 3,6^\circ$, $39,8 \pm 3,8^\circ$ e $81,7 \pm 1,0^\circ$, respectivamente). Comportamento similar foi observado nos resultados obtidos com 60° (Tabela 28).

Em relação ao efeito do biopolímeros, observou-se nos resultados dos filmes com emulsão A/O/A, determinados com 20°, que o filme GQE ($9,3 \pm 0,6^\circ$) apresentou o maior ($p < 0,05$) valor de brilho que o filme GE ($6,0 \pm 0,7^\circ$), que foi seguido pelo filme GQE ($2,6 \pm 0,3^\circ$). No caso dos resultados determinados a 60°, observou-se que não houve diferença significativa entre os resultados dos filmes GQE ($36,9 \pm 3,8^\circ$) e GE ($31,2 \pm 0,7^\circ$), que foram maiores ($p < 0,05$) que os do filme QE ($15,4 \pm 0,9^\circ$). Comportamentos similares foram observados nos resultados dos filmes controle (Tabela 28).

Tabela 28 - Brilho dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*

Matriz	Brilho determinado a 20°		Brilho determinado a 60°	
	C	E	C	E
G	$71,0 \pm 3,6^{bA}$	$6,0 \pm 0,7^{bB}$	$141,2 \pm 5,9^{aA}$	$31,2 \pm 0,7^{aB}$
Q	$39,8 \pm 3,8^{cA}$	$2,6 \pm 0,3^{cB}$	$89,7 \pm 6,8^{bA}$	$15,4 \pm 0,9^{bB}$
GQ	$81,7 \pm 1,0^{aA}$	$9,3 \pm 0,6^{aB}$	$136,4 \pm 6,0^{aA}$	$36,9 \pm 3,8^{aB}$

*Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=10$). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

Bonilla et al. (2018), Dammak et al. (2017b) e Pérez-Córdoba (2018) também determinaram valores de brilho significativamente menores para filmes à base de gelatina, quitosana e/ou blenda gelatina/quitosana incorporados com óleos essenciais (não emulsificados) e emulsões do tipo O/A quando comparados aos filmes controles. Pérez-Córdoba (2018) relatou valores de brilho para filmes à base de blenda gelatina/quitosana incorporados com emulsão simples O/A tão baixos quanto os relatados para os filmes GE, QE e GQE (valores entre $3,0$ e $7,2^\circ$ em 20° , e $26,4$ e $47,6$ em 60°).

5.5.12 Propriedades de barreira à luz UV/Visível

As propriedades de barreira à luz UV/Vis são de extrema importância para a tecnologia de embalagens ativas, visto que embalagens com alta barreira UV/Vis (baixa transmitância) podem proteger o alimento embalado da luz, colaborando na prevenção da oxidação lipídica de produtos alimentícios (BITENCOURT et al., 2014). Na região da luz ultravioleta (100 a 300nm), todos os filmes apresentaram baixa transmitância (Figura 30), ou seja, eles possuem alta barreira ao UV, o que está em acordo com o relatado por Dammak et al. (2017b), Pérez-Córdoba (2018) e Wang et al. (2013). De fato, todos os filmes, com exceção do QC, se mostraram impermeáveis ao UV até 250 nm. Entre 250 e 300 nm, a barreira ao UV dos filmes variou da seguinte forma: GE = GQE > QE > GQC > GC > QC, ou seja, a emulsão A/O/A proporcionou filmes com maior barreira ao UV, e no caso dos filmes controles, esse efeito foi devido à gelatina. Os anéis aromáticos presentes em alguns aminoácidos da gelatina têm a capacidade de absorver a luz UV, promovendo assim, a barreira no material.

Figura 30 - Espectros UV/Vis dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A

Fonte: autoria própria

Por outro lado, observou-se que a incorporação de emulsão A/O/A nos filmes reduziu consideravelmente os valores da transmitância na região da luz visível (300 a 750 nm), quando comparados aos valores de transmitância dos filmes controles (GC, QC e GQC) (Figura 30). Enquanto os filmes GC, QC e GQC apresentaram transmitância superior à 80% a partir do comprimento de onda de 300 nm, os filmes GE, QE e GQE apresentaram transmitância próxima à 60% apenas em comprimento de onda de 800 nm, ou seja, apresentando certa barreira à luz visível.

A redução expressiva na transmitância da luz na região da luz visível para os filmes GE, QE e GQE deve estar relacionada, possivelmente, com a dispersão de luz ocasionada pelas gotas de óleo presente na interface filme-ar, e da diferença no índice de refração da fase lipídica (imiscível) e da matriz filmogênica, como mencionado anteriormente (ATARÉS; CHIRALT, 2016; WANG et al., 2013). Mas, é possível que algum componente fenólico do EHFP possa também absorver a luz visível.

Segundo Pérez-Córdoba (2018), filmes à base de blenda gelatina/quitosana incorporados com emulsão simples O/A apresentaram transmitância acima de 60% a partir do comprimento de onda de 350 nm (luz visível), sendo as propriedades de barreiras UV/Vis desses filmes menos eficientes do que às dos filmes GE, QE e GQE. Na mesma faixa de comprimento de onda (350 a 800 nm), Dammak et al. (2017b) relataram valores de transmitância que variaram de 20 a 50% para filmes a base de gelatina incorporados com emulsão O/A contendo um componente fenólico (rutina), que são similares aos valores de transmitância dos filmes GE, QE e GQE.

5.5.13 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

De um modo geral, foi possível se observar nos termogramas obtidos por DSC (Figura 31) o ocorrência dos seguintes fenômenos, na ordem crescente de temperatura: na primeira varredura: (i) primeira transição vítrea, ocorrendo em temperaturas crioscópicas (~ -70 °C), associada à uma fração rica em glicerol (plastificante), para todos os filmes; (ii) pequena endoterma (~ -31 °C), associada à fusão dos lipídeos presentes na emulsão A/O/A, portanto para os filmes ativos; (iii) segunda transição vítrea, ocorrendo em temperaturas moderadas (28 a 47 °C), que pode ser associada à fração rica em biopolímero, para todos os filmes, e (iv) uma endoterma, devido à fusão da fração cristalina dos biopolímeros (~ 67 °C), ocorrendo nos filmes

com gelatina; e na segunda varredura: foram observados todos os fenômenos descritos acima (i, ii, iii), com exceção da fusão (iv) da fração microcristalina dos biopolímeros. Esse último comportamento tem sido observado em trabalhos similares envolvendo filmes a base de gelatina. A segunda endoterma (iv) não foi observada na segunda varredura por que, com o resfriamento crioscópico após a primeira varredura, o material ficou completamente amorfo (SOBRAL et al., 2001). Por isso, a temperatura dessa transição vítrea na segunda varredura foi menor que na primeira (Tabela 29).

Especificamente em relação ao efeito da incorporação de emulsão A/O/A nos filmes, nos valores das temperaturas onde ocorrem os fenômenos, observou-se, apenas no caso dos filmes à base de quitosana, que a temperatura de transição vítrea da quitosana (T_{g2}), da primeira varredura, foi menor ($p < 0,05$) nos filmes com a emulsão ($QC = 36,7 \pm 2,2$ °C, $QE = 28,0 \pm 3,2$ °C), ou seja, de modo geral, a emulsão A/O/A não influenciou ($p > 0,05$) ambas as T_g dos filmes (Tabela 29). A presença da emulsão A/O/A também não influenciou ($p > 0,05$) a temperatura de fusão da fração microcristalina (T_{m2}) da gelatina, que ficou em torno de 67,5 °C, mas influenciou a respectiva entalpia para os filmes a base de blenda: a entalpia de fusão de GC ($5,5 \pm 0,6$ J/g) foi menor ($p < 0,05$) que a de GE ($9,1 \pm 1,3$ J/g), sendo que para os filmes G, a entalpia permaneceu ($p > 0,05$) em torno de 19,5 J/g.

Em relação ao efeito do biopolímero, também se observou efeito apenas nos filmes de quitosana: as T_{g2} dos filmes de quitosana (QC e QE) foram menores que a dos outros dois filmes (G e GQ), nas duas varreduras (Tabela 29). No caso da T_{g1} , o filme QC apresentou o maior valor ($-69,2 \pm 2,7$ °C). E, como era de se esperar, não houve efeito do biopolímero sobre a temperatura de fusão do lipídeo, que ocorreu em torno de -31 °C, mas se observou que a entalpia dessa fusão foi maior ($p < 0,05$) para o filme a base da blenda (GQE = $2,1 \pm 0,2$ J/g) (Tabela 29), e nem na temperatura de fusão dos microcristais ($T_{m2} = 67,5$ °C). Por outro lado, foi observado efeito do biopolímero sobre a entalpia de fusão dos microcristais da gelatina: os filmes a base de blendas (GQC = $5,5 \pm 0,6$ e GQE = $9,1 \pm 1,3$ J/g) apresentaram entalpia de fusão inferiores aos filmes de gelatina (GC = $20,0 \pm 2,1$ J/g e GE = $18,6 \pm 2,0$ J/g) pura (Tabela 29).

A temperatura de transição vítrea (T_{g2}) dos filmes GE e GQE, além dos filmes GC e GQC, corresponde à transição vítrea da fração amorfa da gelatina plastificada com glicerol, que é seguida pelo pico endotérmico característico da fusão da estrutura tripla-hélice cristalina (T_{m2}) presente na gelatina (Figura 32), ao passo que a T_{g2} do filme QE corresponde à temperatura de transição vítrea da estrutura amorfa da quitosana. O aparecimento de uma única T_{g2} para os filmes GQC e GQE, e estatisticamente iguais às T_{g2} dos filmes GE e GQE, indicam boa compatibilidade entre a gelatina e a quitosana (HOSSEINI et al., 2013). Além disso, a

entalpia de fusão correspondente à T_{m2} (ΔH_{m2}) foi significativamente menor para os filmes à base de blenda gelatina/quitosana porque a presença da quitosana, ou seja, efeito substituição da gelatina pela quitosana (HOSSEINI et al., 2013).

Figura 31 - Termogramas dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A: linhas contínuas – 1ª varredura, linhas pontilhadas – 2ª varredura

Fonte: autoria própria

Tabela 29 - Temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e entalpia de fusão dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A*

Matriz	1ª varredura				2ª varredura			
	Tg ₁ (°C)		Tg ₂ (°C)		Tg ₁ (°C)		Tg ₂ (°C)	
	C	E	C	E	C	E	C	E
G	-71,5 ± 1,6 ^{aA}	-70,3 ± 0,2 ^{aA}	46,2 ± 0,3 ^{aA}	47,2 ± 1,9 ^{aA}	-75,6 ± 2,2 ^{aA}	-79,7 ± 7,9 ^{aA}	31,6 ± 1,2 ^{aA}	32,4 ± 2,2 ^{aA}
Q	-69,4 ± 1,2 ^{aA}	-68,3 ± 1,1 ^{aA}	36,7 ± 2,2 ^{bA}	28,0 ± 3,2 ^{bB}	-69,2 ± 2,7 ^{bA}	-70,2 ± 1,5 ^{aA}	7,0 ± 0,6 ^{bA}	8,9 ± 3,0 ^{bA}
GQ	-73,4 ± 4,1 ^{aA}	-69,6 ± 1,8 ^{aA}	46,3 ± 1,2 ^{aA}	45,2 ± 1,0 ^{aA}	-72,2 ± 2,6 ^{aA}	-70,5 ± 1,1 ^{aA}	31,8 ± 0,8 ^{aA}	30,3 ± 0,7 ^{aA}

Matriz	1ª varredura					
	Tm ₁ (°C)		ΔH _{m1} (J/g)		Tm ₂ (°C)	
	E		E		C	E
G	-30,0 ± 0,8 ^a		1,7 ± 0,2 ^b		65,4 ± 0,9 ^{aA}	67,3 ± 2,0 ^{aA}
Q	-31,1 ± 1,0 ^a		1,5 ± 0,2 ^b		-	-
GQ	-31,5 ± 0,3 ^a		2,1 ± 0,2 ^a		70,9 ± 3,9 ^{aA}	66,3 ± 2,8 ^{aA}

*Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Tg₁ = temperatura de transição vítrea do glicerol; Tg₂ = temperatura de transição vítrea do biopolímero; Tm₁ = temperatura de fusão do óleo de soja; Tm₂ = temperatura de fusão da fase cristalina da gelatina; ΔH_{m1} = entalpia de fusão do óleo de soja; ΔH_{m2} = entalpia de fusão da fase cristalina da gelatina.

Fonte: autoria própria

Os valores de T_g dos filmes à base de gelatina ou blenda gelatina/quitosana, primeira varredura, foram próximos aos valores relatados por Bonilla, Bittante e Sobral (2017) (51,7 a 53,9 °C), Pérez-Córdoba et al. (2017) (45,5 a 46,6 °C); Dammak et al. (2017a) (39,1 a 45,8 °C) para filmes à base de gelatina bovina e suína e blenda gelatina/quitosana na mesma umidade relativa (58% UR), entretanto apresentaram valores de T_g superiores aos valores de T_g de filme à base de gelatina de pele de choco e pele de atum (29 °C e 7 °C, respectivamente) (GÓMEZ-ESTACA et al., 2011a; HOSSEINI et al., 2013), que também observaram diminuição da T_g e desaparecimento do pico endotérmico na segunda varredura. Em relação a T_g dos filmes à base de quitosana, os valores determinados foram menores do que os valores relatados por Bonilla, Bittante e Sobral (2017) (51,7 °C) e Hosseini et al. (2013) (56,1 °C), comportamento que pode estar associado à presença do glicerol nos filmes QC e QE, que torna as cadeias de quitosana mais flexíveis. Além disso, diferentes valores de temperatura de transição vítrea para filmes à base de quitosana têm sido relatados na literatura, com temperaturas que podem variar de 51 °C a 170 °C, por exemplo (BONILLA; BITTANTE; SOBRAL, 2017; HOSSEINI et al., 2013; JRIDI et al., 2014; KAYA et al., 2018b; QIAO et al., 2017a).

A fusão das gotas do óleo de soja (T_m), também foi observada por Pérez-Córdoba (2018) para filmes à base de blenda gelatina/quitosana incorporados com emulsão O/A contendo óleo de canola (-18 °C).

5.5.14 Atividade antioxidante

Os filmes ativos, isto é, aqueles que tiveram emulsão A/O/A adicionados na sua solução formadora de filmes, apresentaram resultados positivos nas análises de compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu, diferentemente dos filmes controles (Tabela 30). Esse resultado não é banal, pois isso demonstra que o processamento da solução formadora de filmes para a produção dos respectivos filmes, não provocou perda total dos componentes bioativos do EHFP.

Em relação ao efeito dos biopolímeros sobre os compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR), o filme GE apresentou valor de FCR ($0,46 \pm 0,04$ mg GAE/g filme) significativamente maior ($p < 0,05$) que os valores de FCR dos filmes QE ($0,14 \pm 0,06$ mg GAE/g filme), que também foi significativamente maior que dos filmes GQE ($0,26 \pm 0,03$ mg GAE/g filme) ($p < 0,05$).

Tabela 30 - Compostos redutores do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) e atividade antioxidante dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A determinada por três métodos (ABTS^{•+}, DPPH e FRAP)*

Matriz	FCR (mg GAE/g filme)		ABTS ^{•+} (mg TE/g filme)		DPPH (%)		FRAP (μmol FeSO ₄ /g filme)	
	C	E	C	E	C	E	C	E
G	0,0 ± 0,0 ^{aB}	0,46 ± 0,04 ^{aA}	3,27 ± 0,28 ^{aB}	5,72 ± 0,32 ^{aA}	4,98 ± 0,31 ^{bB}	15,42 ± 0,09 ^{bA}	7,00 ± 0,00 ^{aB}	13,73 ± 1,00 ^{aA}
Q	0,0 ± 0,0 ^{aB}	0,14 ± 0,06 ^{cA}	2,23 ± 0,02 ^{bA}	2,25 ± 0,26 ^{cA}	6,37 ± 0,52 ^{aB}	18,87 ± 0,12 ^{aA}	7,32 ± 1,07 ^{aB}	10,72 ± 1,30 ^{bA}
GQ	0,0 ± 0,0 ^{aB}	0,26 ± 0,03 ^{bA}	1,19 ± 0,23 ^{cB}	3,85 ± 0,41 ^{bA}	2,62 ± 0,48 ^{cB}	15,69 ± 0,43 ^{bA}	6,87 ± 0,49 ^{aA}	8,87 ± 0,94 ^{bA}

*Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

A incorporação da emulsão A/O/A aumentou consideravelmente a atividade antioxidante dos filmes à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana, segundo resultados obtidos com todos os métodos estudados, exceto para os filmes QE, pelo método ABTS^{•+}, e para o filme GQE, pelo método FRAP, cujas atividades antioxidantes permaneceram similares ($p > 0,05$) aos respectivos filmes controle (Tabela 30).

Para o método de captura do radical livre ABTS^{•+}, o filme GE apresentou maior capacidade de captura do radical ABTS^{•+} ($5,72 \pm 0,32$ mg TE/g filme), seguido pelo filme GQE ($3,85 \pm 0,41$ mg TE/g filme), e com a menor capacidade o filme QE ($2,25 \pm 0,26$ mg TE/g filme) ($p < 0,05$). Com exceção do filme QE, que não apresentou capacidade redutora do radical livre ABTS^{•+} afetada pela incorporação da emulsão A/O/A (QC = $2,23 \pm 0,02$ mg T/g filme) ($p > 0,05$), os filmes GE e GQE apresentaram atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} significativamente maior em comparação a atividade antioxidante dos filmes GC e GQC ($3,27 \pm 0,28$ mg TE/g filme e $1,19 \pm 0,23$ mg TE/g filme, respectivamente).

A capacidade de inibição da absorbância do radical livre DPPH foi significativamente maior ($p < 0,05$) para o filme QE ($18,87 \pm 0,12\%$) comparando-o com os filmes GE e GQE, que apresentaram valores de $15,42 \pm 0,09\%$ e $15,69 \pm 0,43\%$, respectivamente, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Entretanto, os filmes GE, QE e GQE apresentaram atividade antioxidante pelo método de DPPH significativamente maiores ($p < 0,05$) do que a atividade antioxidante dos filmes GC, QC e GQC ($4,98 \pm 0,31\%$, $6,37 \pm 0,52\%$ e $2,62 \pm 0,48\%$, respectivamente).

Por fim, pelo método de poder de redução do íon férrico FRAP, o valor determinado para o filme GE ($13,73 \pm 1,00$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ filme) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que os valores determinados para os filmes QE e GQE ($10,72 \pm 1,30$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ filme e $8,87 \pm 0,94$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ filme, respectivamente), sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Com exceção do filme GQE, que não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) na atividade antioxidante pelo método FRAP em relação ao filme GQC ($6,87 \pm 0,49$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ filme), os valores de atividade antioxidante dos filmes GE e QE foram significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os valores determinados para os filmes GC e QC ($7,32 \pm 1,07$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ filme e $6,87 \pm 0,49$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ filme, respectivamente).

Com exceção do método DPPH, o filme GE apresentou maior atividade antioxidante em comparação aos filmes QE e GQE, e isto pode ter ocorrido devido à maior solubilidade do filme GE, que facilita a extração dos compostos ativos encapsulados.

Apesar de não apresentarem resultados positivo de FCR, os filmes controles apresentaram atividade antioxidante, embora relativamente baixa. No caso dos filmes da

gelatina, isso pode estar relacionado com a presença de aminoácidos específicos como a prolina e a glicina (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009), e para filmes à base de quitosana, a atividade antioxidante pode ser explicada pela reação entre os radicais livres e o íon férrico e os grupos amino residuais livres para formar grupos de amônio (MORADI et al., 2012), já identificado por outros autores (BONILLA; SOBRAL, 2017a; DAMMAK et al., 2017a; OLIVEIRA, 2017)

Embora a atividade antioxidante dos filmes incorporados com emulsão A/O/A tenha sido maior quando comparada a atividade antioxidante dos filmes controles, os valores encontrados foram relativamente baixos. Oliveira (2017) incorporou extrato aquoso de folha de pitangueira em filmes à base de gelatina, e determinou valor de FCR entre 3,4 e 11,3 mg GAE/g filme, valores muito superiores aos valores encontrados para os filmes GE, QE e GQE, além de capacidade de captura do radical ABTS^{•+} entre 34 e 46 mg TE/g filme. Bitencourt et al. (2014) relatou valores %IA da absorbância do radical DPPH de até 70% para filmes à base de gelatina incorporados com extrato etanólico de cúrcuma, valor muito superior aos valores encontrados para os filmes GE, QE e GQE. Pérez-Córdoba et al. (2018) determinou valores de até 81 µmol FeSO₄/g filme incorporados com emulsão O/A contendo cinamaldeído e α – tocoferol, também superior aos valores relatados nesta dissertação.

A baixa atividade antioxidante dos filmes está relacionada com a baixa concentração de EHFP, em base seca, incorporado nas matrizes filmogênicas, visto que a presença do óleo de soja na emulsão A/O/A limita a concentração da emulsão que pode ser incorporada. Enquanto Oliveira (2018) incorporou cerca de 5 a 15 g EHFP em base seca/100 g de gelatina, só foi possível incorporar nos filmes GE, QE e GQE 0,25 g EHFP em base seca/100 g biopolímero. Somado a isto, os compostos ativos encapsulados na emulsão A/O/A podem não ter sido completamente extraídos da matriz filmogênica, além de possíveis perdas que podem ter ocorrido durante o processo de produção da emulsão A/O/A e dos filmes.

5.5.15 Atividade antimicrobiana

A incorporação de emulsão A/O/A nos filmes à base de gelatina, quitosana e blenda/gelatina quitosana inibiu o crescimento das bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Salmonella* apenas abaixo dos discos retirados dos filmes, com exceção do filme GE, cuja inibição ocorreu apenas para a bactéria *S. aureus*, com uma pequena diminuição da concentração de bactéria ao redor do filme (Figura 32). Não ocorreu, portanto, formação de halos de inibição em nenhum dos casos estudados. Já foi relatado na literatura que as bactérias

gram-positivas, como no caso da *S. aureus*, são mais sensíveis ao afeito de agentes antimicrobianos (VICTORIA et al., 2012). Desta forma, verificou-se apenas se os filmes apresentaram (+) ou não (-) efeito inibitório contra as bactérias testadas, sem atribuição de halos de inibição (Tabela 31).

Figura 32 - Halos de inibição dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella ssp* e *Staphylococcus aureus*

* Controle positivo (C+): cloranfenicol (2,5 mg/mL); controle negativo (C-): água destilada

Fonte: autoria própria

Tabela 31 - Inibição dos filmes a base de gelatina (G), quitosana (Q) e blenda gelatina/quitosana (GQ), sem (C) e com (E) emulsão A/O/A contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella ssp* e *Staphylococcus aureus*

Filme	Inibição		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella ssp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
GC	-	-	-
QC	+	+	+
GQC	+	+	+
GE	-	-	+
QE	+	+	+
GQE	+	+	+

* (+): inibição moderada; (-) sem atividade antimicrobiana

Fonte: autoria própria

Pérez-Córdoba (2018) identificou o mesmo comportamento para filmes à base de gelatina/quitosana incorporados com emulsão O/A contendo cinamaldeído e α -tocoferol encapsulados, e explicou que o fato de os agentes ativos estarem encapsulados, dificulta a difusão dos mesmos pelo ágar. A formação de halos de inibição para o teste de difusão de disco só ocorre quando os agentes antimicrobianos difundem pelo ágar (PURWAR; VERMA; BATRA, 2019). Além disso, a baixa concentração de EHFP presente nos filmes pode ter contribuído para a não formação de halos de inibição.

O fato das bactérias testadas não terem crescido abaixo dos discos dos filmes QC, GQC, QE e GQE está relacionado com o poder naturalmente antimicrobiano da quitosana, que possui grupos aminos carregados positivamente que interagem com a membrana celular das bactérias, que possuem cargas negativas, ocasionando a saída de componentes proteicos e intracelulares das bactérias (PEREDA et al., 2011). Outros autores já identificaram atividade antimicrobiana para filmes à base de quitosana ou blenda gelatina/quitosana, proveniente unicamente do poder antimicrobiano natural da quitosana (BONILLA; SOBRAL, 2016; GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; PEREDA et al., 2011).

6 CONCLUSÕES

O extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP) apresentou atividades antioxidante e antimicrobianas elevadas, expressivamente maiores em comparação à outros extratos de plantas, e foi efetivo na formação de halo de inibição contra o crescimento das bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Salmonella*, não apresentando atividade antimicrobiana contra a bactéria *E. coli*.

A concentração de emulsificantes e a proporção de fases afetaram a estabilidade física e a distribuição e diâmetro médio de gotas das emulsões A/O e A/O/A, sendo que em ambos os casos, as menores concentrações de emulsificantes mostraram-se mais eficientes.

A emulsão A/O ótima apresentou diâmetro médio de gota de 0,208 μm e polidispersão de 0,157, além de distribuição de diâmetro médio de gotas monomodal, comportamento de fluido newtoniano e elevada estabilidade física.

A emulsão A/O/A ótima apresentou diâmetro médio de gotas de 0,365 μm , alta polidispersão (0,768) e distribuição do diâmetro médio de gotas trimodal, com gotas de tamanho nanométrico, submicrométrico, e micrométrico, além de comportamento de fluido pseudoplástico e boa estabilidade física. Além disso, a emulsão A/O/A foi capaz de manter as

propriedades ativas do EHFP, apresentando boas atividades antioxidante e antimicrobiana, proporcionais à concentração do EHFP presente.

A emulsão A/O/A mostrou-se um sistema estável e eficiente para encapsulação e proteção de compostos ativos aquosos na fase aquosa interna da emulsão, tornando-o interessante para a produção de produtos alimentícios funcionais ou para a aplicação em materiais que atuem como veículos de compostos ativos.

Os filmes à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana incorporados com a emulsão A/O apresentaram elevada rugosidade superficial, aumento na heterogeneidade da superfície e da estrutura interna da matriz. Em decorrência disto, o ângulo de contato dos filmes ativos diminuiu. Além disso, a presença da emulsão A/O/A não afetou negativamente a espessura e a umidade dos filmes ativos, mas diminuiu a solubilidade e a permeabilidade ao vapor de, além de afetar as propriedades óticas e de superfície (cor, opacidade e brilho), diminuindo o brilho dos filmes ativos e aumentando a opacidade.

A incorporação da emulsão A/O/A melhorou a resistência e rigidez à tração dos filmes à base de gelatina ou quitosana, ao passo que as diminuiu no filme à base de blenda gelatina/quitosana. A elongação dos filmes à base de gelatina ou blenda gelatina/quitosana aumentou, ao passo que não afetou a elongação do filme à base de quitosana. As propriedades de barreira à luz visível melhoraram consideravelmente.

A incorporação da emulsão A/O/A não afetou as propriedades térmicas dos filmes ativos, exceto pelo filme à base de quitosana, que apresentou redução da temperatura de transição vítrea da quitosana. A única alteração observada nos espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi o surgimento de uma banda em 1744 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C-H presente nos ácidos graxos do óleo de soja.

A incorporação da emulsão A/O/A aumentou a atividade antioxidante dos filmes ativos, em todos os métodos avaliados. Os filmes à base de quitosana e blenda gelatina/quitosana inibiram o crescimento das bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Salmonella* na região de contato com o filme, ao passo que o filme à base de gelatina só inibiu o crescimento da bactéria *S. aureus*.

Pode-se concluir que, a incorporação de emulsão A/O/A rica em EHFP nos filmes à base de gelatina, quitosana e blenda gelatina/quitosana melhorou, de um modo geral, as propriedades dos filmes, em especial as propriedades ativas e de barreira, permitindo que estes filmes sejam considerados filmes ativos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, sugere-se:

- Estudo da estabilidade do EHFP, da emulsão A/O/A e dos filmes ativos em condições de armazenamento;
- Estudos sobre a liberação dos compostos ativos da emulsão A/O/A e dos filmes ativos em meios simulantes de alimentos;
- Aplicação dos filmes ativos como embalagens ativas;
- Encapsulação de outros compostos ativos aquosos na emulsão A/O/A.

REFERÊNCIAS

AGULLÓ, E.; RODRÍGUEZ, M. S.; RAMOS, V.; ALBERTENGO, L. Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 10, p. 521–530, Ago. 2003.

ALMEIDA, K. M.; DE MEDEIROS, E. P.; GOMES, J. P.; DE SOUSA, E. P.; DOS SANTOS, J. W. Caracterização físico-química de misturas de óleos vegetais para fins alimentares Physico-chemical characterization of mixtures of vegetable oils for food. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, p. 218–222, Mar. 2013.

AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923–928, 2009.

ANDRADE, M. A.; RIBEIRO-SANTOS, R.; BONITO, M. C. C.; SARAIVA, M.; SANCHES-SILVA, A. Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. **LWT – Food Science and Technology**, v. 92, p. 497–508, Jun. 2018.

ANGGRAENI, N. I.; HIDAYAT, I. W.; RACHMAN, S. D.; ERSANDA. Bioactivity of essential oil from lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) as antioxidant agent. In: AIP Conference Proceedings, 2018, Cesme-Izmir, **anais Proceedings of the 35th International Conference of the Polymer Processing Society**, Cesme-Izmir: AIP Publishing, 2018, p. 030007. Disponível em:

< <https://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/1.5021200> > Acessado em: 14 jan. 2020.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, n. 2, p. 113–126, Jun. 2002.

ASTM D7334-08(2013), Standard Practice for Surface Wettability of Coatings, Substrates and Pigments by Advancing Contact Angle Measurement. In: **Annual book of ASTM Standards**. West Conshohocken, PA, 2013

ASTM STANDARD D644-99. Standard test methods for moisture content of paper and paperboard by oven drying. In: **Annual book of ASTM Standards**. American Society for Testing and Materials: Philadelphia, 1999.

ASTM STANDARD D882-09. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In: **Annual book of ASTM Standards**. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2002.

ASTM STANDARD E 96 -95. Standard test method for water vapor transmission of materials. In: **Annual book of ASTM Standards**. American Society fo Testing and Materials: Philadelphia, 1995.

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

AUGUSTYNIAK, A. et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1216–1262, Out. 2010.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 1, p. 55–61, 2003.

AZIZ, M.; KARBOUNE, S. Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 486–511, 2017.

BARIKANI, M.; OLIAEI, E.; SEDDIQI, H.; HONARKAR, H. Preparation and application of chitin and its derivatives: A review. **Iranian Polymer Journal**, v. 23, n. 4, p. 307–326, Fev. 2014.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; ROMANAZZI, G.; JIMÉNEZ-APARICIO, A. **Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities**. Academic Press, 2016.

BENBETTAÏEB, N.; KUREK, M.; BORNAZ, S.; DEBEAUFORT, F. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin-chitosan blend films related to biopolymer interactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2409–2419, Set. 2014.

BENJAKUL, S.; NAGARAJAN, M. ; PRODPRAN, T. Films and Coatings from Collagen and Gelatin. In: MONTERO, M. P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. **Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications**. Nova Iorque: CRC Press, 2016, cap. 6, p. 103-124.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J.; The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERENDSEN, R.; GÜELL, C.; FERRANDO, M. Spray dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification: Effect of interfacial composition. **Food Chemistry**, v. 178, p. 251–258, Jul. 2015.

BERGO, P., MORAES, I. C. F., SOBRAL, P. J. A. Effects of moisture and content on structural and dielectric properties of cassava starch films. **Starch**, v. 64, p. 835-839, Mai. 2012.

BEZERRA, I. C. F.; RAMOS, R. T. M.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES L. A. L. Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 1, p. 92–101, 2018.

BITENCOURT, C. M.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; SOBRAL, P. J. .; CARVALHO, R. A. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 145–152, Out. 2014.

- BONILLA, J.; ATARÉS, M.; CHIRALT, A. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2012.
- BONILLA, J.; BITTANTE, A. M. Q. B.; SOBRAL, P. J. A. Thermal analysis of gelatin–chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, n. 2, p. 1221–1227, 2017.
- BONILLA, J.; POLONI, T.; LOURENÇO, R. V.; SOBRAL, P. J. A. Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/chitosan films. **Food Bioscience**, v. 23, n. 1, p. 107–114, Mar. 2018.
- BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extracts of guarana, boldo, rosemary and cinnamon. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, n. 1, Mai. 2017b.
- BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. Antioxidant and physicochemical properties of blended films based on gelatin-sodium caseinate activated with natural extracts. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 7, p. 1–9, Mai. 2017a.
- BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. **Food Bioscience**, v. 16, p. 17–25, Dez. 2016.
- BOURTOOM, T. Edible films and coatings: Characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v. 15, n. 3, p. 237 – 248, Fev. 2008.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, Jan. 1995.
- BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.
- BUNACIU, A. A.; DANET, A. F.; ABOUL-ENEIN, S. F. H. Y. Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 389–399, Jun. 2016.
- CARRILLO-NAVAS, H; CRUZ-OLIVARES, J.; VARELA-GUERRERO, V.; ALAMILLA-BELTRÁN, L.; VERNON-CARTER, E. J.; PÉREZ-ALONSO, C. Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer–protein blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1231–1235, Jan. 2012.
- CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-55, 2004.
- CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. **Advanced Materials**, v. 8, n. 4, p. 305–313, 1996.
- CUNHA, A. G.; MOUGEL, J. B.; CATHALA, B.; BERGLUND, L. A.; CAPRON, I. Preparation of double pickering emulsions stabilized by chemically tailored nanocelluloses. **Langmuir**, v. 30, n. 31, p. 9327–9335, Jul. 2014.
- DA CUNHA, F. A. B. et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614–621, 2016.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174–181, Abr. 2012.

DAMMAK, I.; BITTANTE, A. M. Q. B.; LOURENÇO, R. V.; SOBRAL, P. J. A. Properties of gelatin-based films incorporated with chitosan-coated microparticles charged with rutin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 643–652, 2017b.

DAMMAK, I.; CARVALHO, R. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; LOURENÇO, R. V.; SOBRAL, P. J. A. Properties of active gelatin films incorporated with rutin-loaded nanoemulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 39–49, Mai. 2017.

DAMMAK, I.; SOBRAL, P. J. A. Active gelatin films incorporated with eugenol nanoemulsions: effect of emulsifier type on films properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 9, p. 2725–2735, 2019.

DAMMAK, I.; SOBRAL, P. J. A. Formulation and Stability Characterization of Rutin-Loaded Oil-in-Water Emulsions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 5, p. 926–939, Mai. 2017.

DARSHAN, S.; DORESAMY, R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 5, p. 343–357, Mai. 2004.

DE MOURA, S. C. S. R.; BERLING, C. L.; GERMER, S. P. M.; ALVIM, I. D.; HUBINGER, M. D. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, v. 241, n. 1, p. 317–327, Fev. 2018.

DE MOURA, S. C. S. R.; SCHETTINI, G. N.; GARCIA, A. O.; GALLINA, D. A.; ALVIM, I. D.; HUBINGER, M. D. Stability of Hibiscus Extract Encapsulated by Ionic Gelation Incorporated in Yogurt. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 9, p. 1500–1515, Set. 2019.

DICKINSON, E. Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. **Food Biophysics**, v. 6, n. 1, p. 1–11, Mar. 2011.

DOS SANTOS, J. F. S. et al. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, n. 1, p. 233–239, Set. 2018.

DURAN, M.; ADAY, M. S.; ZORBA, N. N. D.; TEMIZKAN, R.; BÜYÜKCAN, M. B.; CANER, C. Potential of antimicrobial active packaging “containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating” to extend shelf life of fresh strawberry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 98, p. 354–363, Jan. 2016.

DUTTA, P. K.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DUTTA, J. Chitin and chitosan for versatile applications. **Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews**, v. 42, n. 3, p. 307–354, Nov. 2002.

ELSABEE, M. Z.; ABDOL, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 1819–1841, Jan. 2013.

EUROPEAN COMMISSION. 2004. Regulation (EC) No. 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004, on materials and articles intended to come

into contact with food and repealing Directives 80/509/EEC and 89/109/EEC. European Commission. Off J Eur Comm L. 338:4–17.

FABRA, M. J.; FALCÓ, I.; RANDAZZO, W.; SÁNCHEZ, G.; LÓPEZ-RUBIO, A. Antiviral and antioxidant properties of active alginate edible films containing phenolic extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 81, n. 1, p. 96–103, Ago. 2018.

FANG, Y.; TUNG, M. A.; BRITT, I. J.; YADA, S.; DALGLEISH, D. G.; Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1., p. 188–193, 2002.

FENG, Y.; LEE, Y. Surface modification of zein colloidal particles with sodium caseinate to stabilize oil-in-water pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 292–302, 2016.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed. São Paulo: Editora Artmed, 2010.

FLAKER, C. H. C.; LOURENÇO, R. V.; BITTANTE, A. M. Q. B.; SOBRAL, P. J. A. Gelatin-based nanocomposite films: a study on montmorillonite dispersion and concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 65–70, 2015.

FLORENCE, A. T.; WHITEHILL, D. The formulation and stability of multiple emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 277–308, Ago. 1982.

FRAJ, J.; PETROVIC, L. B.; MILINKOVIC, J. R.; KATONA, J. M.; BUCKO, S. D.; SPASOJEVIC, L. M. Properties of water in oil emulsions (W/O) stabilized with mixtures of PGPR and polyglycerol fatty acid esters. **Acta Periodica Technologica**, v. 48, n. 48, p. 95–107, 2017.

GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4–14, Fev. 2014.

GARTI, N. Double emulsions — scope, limitations and new achievements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123–124, p. 233–246, Mai. 1997.

GARTI, N.; BISPERINK, C. Double emulsions: Progress and applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 3, n. 6, p. 657–667, 1998.

GIROUX, H. J.; CONSTANTINEAU, S.; FUSTIER, P.; CHAMPAGNE, C. P.; ST-GELAIS, D.; LACROIX, M.; BRITTEN, M. Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. **International Dairy Journal**, v. 29, n. 2, p. 107–114, Abr. 2013.

GOMES, A.; COSTA, A. L. R.; CUNHA, R. L. Impact of oil type and WPI/Tween 80 ratio at the oil-water interface: Adsorption, interfacial rheology and emulsion features. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 272–280, Abr. 2018.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; MONTERO, P. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1461–1469, Jan. 2011a.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LACEY, A. L.; 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 Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 889–896, Mai.

2010.

GÓMEZ-ESTACA, J.; MONTERO, P.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; ALEMÁN, A.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 5, p. 1334–1341, 2009.

GOMEZ-GUILLEN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. A.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190–195, 1992.

GONTARD, N.; RING, S. Edible wheat gluten film: Influence of water content on glass transition temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3474–3478, 1996

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLÈ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245–251, Ago. 2008.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 128–130, p. 227–248, Dez. 2006.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.

HAN, C.; WANG, J.; LI, Y.; LU, F.; CUI, Y. Antimicrobial-coated polypropylene films with polyvinyl alcohol in packaging of fresh beef. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 901–907, 2014.

HANANI, Z. A. N.; ROOS, Y. H.; KERRY, J. P. Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 94–102, 2014.

HINTZ, T.; MATTHEWS, K. K.; DI, R. The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation. **BioMed Research International**. v. 2015, n. 1, p. 1–12, 2015.

HO, C. T.; WANG, M.; WEI, G. J.; HUANG, T. C.; HUANG, M. T. Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. **Biofactors**. v. 13, n. 1–4, p. 161–166, Jan. 2000.

HONARKAR, H.; BARIKANI, M. Applications of biopolymers I: Chitosan. **Monatshefte fur Chemie**. v. 140, n. 12, p. 1403–1420, 2009.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1266–1274, Mar. 2016.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3–4, p. 1490–1495, Fev. 2013.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin – chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3–4, p.

1490–1495, 2013.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1–24, 2012.

ILIĆ, J. D.; NIKOLOVSKI, B. G.; LONCAREVIC, I. S.; PETROVIC, J. S.; BAJAC, B. M.; VUCINIC-VSIC, M. Release Properties and Stability of Double W₁/O/W₂ Emulsions Containing Pumpkin Seed Oil. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 2, p. 1–13, Abr. 2017.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H. Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by bha, Bht, and Other Antioxidants. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 109–150, Jan. 1985.

JENA, S.; RAY, A.; BANERJEE, A.; SAHOO, S.; KAR, B.; PATNAIK, J.; PANDA, P. C.; NAYAK, S. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from leaves and rhizomes of *Curcuma angustifolia* Roxb. **Natural Product Research**, v. 31, n. 18, p. 2188–2191, Set. 2017.

JOUKI, M.; YAZDI, F. T.; MORTAZAVI, S. A.; KOOCHEKI, A.; KHAZAEI, N. Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 88–97, 2014.

JRIDI, M.; HAJJI, S.; AYED, H. B.; LASSOUED, I.; MBAREK, A.; KAMMOUN, M.; SOUISSI, N.; NASRI, M. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 373–379, 2014.

KAIMAINEN, M.; MARZE, S.; JÄRVENPÄÄ, E.; ANTON, M.; HOUPALAHTI, R. Encapsulation of betalain into w/o/w double emulsion and release during in vitro intestinal lipid digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 899–904, Mar. 2015.

KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39–47, 2016.

KANATT, S. R.; CHAWLA, S. P. Shelf life extension of chicken packed in active film developed with mango peel extract. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 2018.

KANOUNI, M.; ROSANO, H. L.; NAOULI, N. Preparation of a stable double emulsion (W₁/O/W₂): Role of the interfacial films on the stability of the system. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 99, n. 3, p. 229–254, 2002.

KAYA, M.; RAVIKUMAR, P.; ILK, S.; MUJTBA, M.; AKYUZ, L.; LABIDI, J.; SALABERRIA, A. M.; CAKMAK, Y. S.; ERKUL, S. K. Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, n. 1, p. 287–297, Fev. 2018a.

KHALID, N.; KOBAYASHI, I.; NEVES, M. A.; UEMURA, K.; NAKAJIMA, M. Preparation and Characterization of Water-in-Oil-in-Water Emulsions Containing a High Concentration of L-Ascorbic Acid. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 6, p. 1171–1178, Jun. 2013.

KIM, Y. T.; KANG, D. H.; KIM, J. K.; HA, Y. G.; HWANG, J. Y.; KIM, T.; LEE, S. H.

Antimicrobial Active Packaging for Food. **Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods**, v. 76, n. 1, p. 99–110, 2008.

LAI, P.; ROY, J. Antimicrobial and Chemopreventive Properties of Herbs and Spices. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1451–1460, 2012.

LAMBA, H.; SATHISH, K.; SABIKHI, L. Double Emulsions: Emerging Delivery System for Plant Bioactives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 4, p. 709–728, 2015.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; IBARBURU, I.; DUEÑAS, M. T.; CABA, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 4, p. 889–899, 2013.

LECETA, I.; MOLINARO, S.; GUERRERO, P.; KERRY, J. P.; CABA, K. Quality attributes of map packaged ready-to-eat baby carrots by using chitosan-based coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 142–150, 2015.

LEONG, T. High-Power Ultrasonication for the Manufacture of Nanoemulsions and Nanodispersions. In: **Innovative Food Processing Technologies: Extraction, Separation, Component Modification and Process Intensification**. Woodhead Publishing, 2016, cap. 16, p. 413–428.

LEONG, T. S. H.; MARTIN, G. J. O.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic encapsulation – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 605–614, Mar. 2017.

LEONG, T. S. H.; ZHOU, M.; ZHOU, D.; ASHOKKUMAR, M.; MARTIN, G. J. O. The formation of double emulsions in skim milk using minimal food-grade emulsifiers – A comparison between ultrasonic and high pressure homogenisation efficiencies. **Journal of Food Engineering**, v. 219, p. 81–92, 2018.

LIU, C.; LI, M.; HAN, R.; LI, J.; LIU, C. Rheology of Water-in-Oil Emulsions with Different Drop Sizes. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 333–344, Mar. 2016.

LIU, D.; NIKOO, M.; BORAN, G.; ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Collagen and Gelatin. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 527–557, 2015.

LIU, F.; JIANG, Y.; DU, B.; CHAI, Z.; JIAO, T.; ZHANG, C.; REN, F.; LENG, X. Design and characterization of controlled-release edible packaging films prepared with synergistic whey-protein polysaccharide complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 5824–5833, 2013.

LORENZO, J. M. et al. Influence of pitanga leaf extracts on lipid and protein oxidation of pork burger during shelf-life. **Food Research International**, v. 114, n. 1, p. 47–54, Dez. 2018.

LORENZO, J. M.; BATLLE, R.; GÓMEZ, M. Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 181–188, Nov. 2014.

LORENZO, J. M.; SINEIRO, J.; AMADO, I. R.; FRANCO, D. Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 526–534, 2014.

MANIGLIA, B. C. **Aproveitamento e resíduos agroindustriais para elaboração de filmes biodegradáveis**. 2017. 295 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

MANIGLIA, B. C.; TESSARO, L.; LUCAS, A. A.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Bioactive films based on babassu mesocarp flour and starch. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 383–391, Set. 2017.

MÁRQUEZ, A. L.; MEDRANO, A.; PANIZZOLO, L. A.; WAGNER, J. R. Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, n. 1, p. 101–108, 2010.

MARTINEZ, N. Y.; ANDRADE, P. F.; DURÁN, N.; CAVALITTO, S. Development of double emulsion nanoparticles for the encapsulation of bovine serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 190–196, 2017.

MARTINEZ-CORREA, H. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 998–1006, 2011.

MATOS, M.; GUTIÉRREZ, G.; MARTÍNEZ-REY, L.; IGLESIAS, O.; PAZOS, C. Encapsulation of resveratrol using food-grade concentrated double emulsions: Emulsion characterization and rheological behaviour. **Journal of Food Engineering**, v. 226, p. 73–81, 2018c.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 251, p. 55–79, 2018.

MOHAMMADI, A.; JAFARI, S. M.; ASSADPOUR, E.; ESFANJANI, A. F. Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC–pectin complexes and evaluating their release rate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 816–822, Jan. 2016.

MORADI, M.; TAJIK, H.; ROHANI, M. R.; OROMIEHIE, A. R.; MALEKINEJAD, H.; ALIAKBARLU, J.; HADIAN, M. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 477–484, Mai. 2012.

MORAES-LOVISON, M. **Óleo essencial de orégano nanoemulsionado: produção, caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante in vitro e aplicação em patê de frango**. 2017. 152 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

MORAIS, J. M. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino**. 2013. 231 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

MORITA, M.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; NIKI, E. Antioxidant capacity of blueberry extracts: Peroxyl radical scavenging and inhibition of plasma lipid oxidation induced by multiple oxidants. **Journal of Berry Research**, v. 7, n. 1, p. 1–9, Mar. 2017.

MURILLO-MARTÍNEZ, M. M.; PEDROZA-ISLAS, R.; LOBATO-CALLEROS, C.; MARTÍNEZ-FEREZ, A.; VERNON-CARTER, E. J. Designing $W_1/O/W_2$ double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 577–585, 2011.

MUSCHIOLIK, G.; DICKINSON, E. Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 3, p. 532–555, Mai. 2017.

MUTALIYEVA, B.; GRIGORIEV, D.; MADYBEKOVA, G.; SHARIPOVA, A.; AIDAROVA, S.; SAPARBEKOVA, A.; MILLE, R. Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. **Physicochem. Eng. Aspects**, v. 521, p. 147–152, 2017.

MUXIKA, A.; ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358–1368, 2017.

NCCLS, National Committee on Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. 7th ed. Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa.; Document M2 – A7.

<<http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5021200>>. Acesso em: 2 dez. 2018

NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 7–17, Mai. 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6^a ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2014.

OLDONI, T. L. C.; MERLIN, N.; KARLING, M.; CARPES, S. T.; DE ALENCAR, S. M.; MORALES, F. R.; DA SILVA, E. A.; PILAU, E. J. Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil. **Food Research International**, v. 125, n. 1, p. 108647, 2019.

OLIVEIRA, T. G. **Caracterização de filmes à base de gelatina aditivados com extratos vegetais**. 2017. 119 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

OPAWALE, F. O.; BURGESS, D. J. Influence of Interfacial Rheological Properties of Mixed Emulsifiers on the Stability of Water-in-Oil-in-Water Emulsions. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 50, n. 1, p. 965–973, 1998.

ORTEGA-RAMIREZ, L. A. et al. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: A hypothesis. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, p. 129–137, 2014.

PATEIRO, M.; LORENZO, J. M.; AMADO, I. R.; FRANCO, D. Effect of addition of green tea, chestnut and grape extract on the shelf-life of pig liver pâté. **Food Chemistry**, v. 147, p. 386–394, Mar. 2014.

PAULA, D. DE A.; DE OLIVEIRA, E. B.; TEIXEIRA, A. V. N. C.; SOARES, A. S.; RAMOS, A. M. Double emulsions (W/O/W): physical characteristics and perceived intensity of salty taste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 475–483, 2018.

PEREDA, M.; AMICA, G.; RÁ CZ, I.; MARCOVICH, N. E. Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 1, p. 76–83, Jul. 2011a.

PEREDA, M.; PONCE, A. G.; MARCOVICH, N. E.; RUSECKAITE, R. A.; MARTUCCI, J.

F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1372–1381, Jul. 2011b.

PÉREZ CÓRDOBA, L. J.; SOBRAL, P. J. A. Physical and antioxidant properties of films based on gelatin, gelatin-chitosan or gelatin-sodium caseinate blends loaded with nanoemulsified active compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 213, p. 47–53, 2017.

PÉREZ-CÓRDOBA, L. J. **Filmes à base de blenda gelatina-quitosana com agentes ativos nanoemulsificados: desenvolvimento, caracterização e aplicação na conservação de mortadela fatiada refrigerada**. 2018. 222 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

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**, v. 79, p. 544–559, 2017.

PIMENTEL-MORAL, S.; OCHANDO-PULIDO, J. M.; SEGURA-CARRETERO, A.; MARTINEZ-FEREZ, A. Stabilization of W/O/W multiple emulsion loaded with Hibiscus sabdariffa extract through protein-polysaccharide complexes. **LWT – Food Science and Technology**, v. 90, n. 1, p. 389–395, Abr. 2018.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D.; MEDINA-JARAMILLO, C.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; GOYANES, S. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488–495, Fev. 2017.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUS, N. K. O.; MATHE, E. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922–935, 2018.

POPPE, J. Gelatin. In: IMESON, A.; POPPE, J. **Thickening and Gelling Agents for Food**. Boston: Springer Science & Business Media, 1997, cap. 7, p. 98-123, 1997.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTOM, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

PURWAR, R.; VERMA, A.; BATRA, R. Antimicrobial gelatin/sericin/clay films for packaging of hygiene products. **Journal of Polymer Engineering**, v. 39, n. 8, p. 744–751, 2019.

QI, X.; WANG, L.; ZHU, J. Water-In-Oil-In-Water Double Emulsions: An Excellent Delivery System for Improving the Oral Bioavailability of Pidotimod in Rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2203–2211, Jun. 2011.

QIAO, C.; MA, X.; ZHANG, J.; YAO, J. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. **Food Chemistry**, v. 235, p. 45–50, 2017a.

RAI, M.; PANDIT, R.; GAIKWAD, S.; KÖVICS, G. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 3381–3394, 2016.

RAMOS, M.; JIMÉNEZ, A.; PELTZER, M.; GARRIGÓS, M. C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 513–519, 2012.

RAMOS, M.; VALDÉS, A.; BELTRÁN, A.; GARRIGÓS, M. C. Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. **Coatings**, v. 6, n. 4, p. 41, Set. 2016.

RAMZIIA, S.; MA, H.; YAO, Y.; WEI, K.; HUANG, Y. Enhanced antioxidant activity of fish gelatin–chitosan edible films incorporated with procyanidin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 10, p. 1–10, 2018.

RANJBARYAN, S.; POURFATHI, B.; ALMASI, H. Reinforcing and release controlling effect of cellulose nanofiber in sodium caseinate films activated by nanoemulsified cinnamon essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 21, n. 1, p. 100341, Abr. 2019.

RATTMANN, Y. D.; DE SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. . Analysis of flavonoids from eugenia uniflora leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, Mai. 1999.

RESTUCCIA, D.; SPIZZIRRI, U. G.; PARISI, O. I.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; IEMMA, F.; PUOCI, F.; VINCI, G.; PICCI, N. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. **Food Control**, v. 21, n. 11, p. 1425–1435, Nov. 2010.

ROBERT, P.; ZAMORANO, M.; GONZÁLES, E.; SILVA-WEISS, A.; COFRADES, S.; GIMÉNEZ, B. Double emulsions with olive leaves extract as fat replacers in meat systems with high oxidative stability. **Food Research International**, v. 120, n. 1, p. 904–912, Jun. 2019.

SALGADO, P. R.; ORTIZ, C. M.; MUSSO, Y. S.; GIORGIO, L. D.; MAURI, A. N. Edible films and coatings containing bioactives. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 86–92, 2015.

SANCHES-SILVA, A.; COSTA, D.; ALBUQUERQUE, T. G.; BUONOCORE, G. G.; RAMOS, F.; CASTIHO, M. C.; MACHADO, A. V.; COSTA, H. S. Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 3, p. 374–395, Mar. 2014.

SAPEI, L.; NAQVI, M. A.; ROUSSEAU, D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. **Food hydrocolloids**, v. 27, p. 316–323, 2012.

SCHICK, M. J. **Nonionic Surfactants Physical Chemistry**. 1ª ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1987.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. From Collagen to Gelatine. In: **Gelatine Handbook**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. p. 45–117.

SCHUCH, A.; DEITERS, P.; HENNE, J.; KÖHLER, K.; SCHUCHMANN, H. P. Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 402, p. 157–164, Jul. 2013.

SCHUMACHER, N.; COLOMEU, T. C.; FIGUEIREDO, D.; CARVALHO, V. C.; CAZARIN, C. B. B.; PRADO, M. A.; MELETTI, L. M. M.; ZOLLNER, R. L. Identification and Antioxidant Activity of the Extracts of Eugenia uniflora Leaves. Characterization of the Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Extract on Diabetes Expression in an Experimental Model

- of Spontaneous Type 1 Diabetes (NOD Mice). **Antioxidants**, v. 4, n. 4, p. 662–680, Out. 2015.
- SHADDEL, R.; HESARI, J.; AZADMARD-DAMIRCHI, S.; HAMISHEHKAR, H.; FATHI-ACHACHLOUEI, B.; HUANG, Q. Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1800–1810, 2018.
- SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. Chitosan functional properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, n. 4, p. 535–542, 1997.
- SILVA-WEISS, A.; BIFANI, V.; IHL, M.; SOBRAL, P. J. A.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 458–466, 2013.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, Jan. 1965.
- SIROCCHI, V.; DEVLIEGHERE, F.; PEELMAN, N.; SAGRATINI, G.; MAGGI, F.; VITTORI, S.; RAGAERT, P. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1069–1076, 2017.
- SOBRAL, P. J. A. ; MENEGALLI, F. C. ; HUBINGER, M. D. ; ROQUES, M. A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 423-432, 2001.
- SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 377-382, 2001.
- SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N.; HABITANTE, A. M. Q. B.; SERENO, A. Phase diagram for freeze-dried persimmon. **Thermochimica Acta**, v. 376, n. 1, p. 83–89, 2001.
- SOBRAL, P. J. D. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 1251–1259, Jun. 2000.
- SOUILEM, S.; KOBAYASHI, I.; NEVES, M. A.; SAYADI, S.; ICHIKAWA, S.; NAKAJIMA, M. Preparation of Monodisperse Food-Grade Oleuropein-Loaded W/O/W Emulsions Using Microchannel Emulsification and Evaluation of Their Storage Stability. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 7, p. 2014–2027, Jul. 2014.
- SU, J.; FLANAGAN, J.; HEMAR, Y.; SINGH, H. Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water–oil–water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2–3, p. 261–268, Mar. 2006.
- SULTANA, T.; RANA, J.; CHAKRABORTY, S. S.; DAS, K. K.; RAHMAN, T.; NOOR, R. Microbiological analysis of common preservatives used in food items and demonstration of their in vitro anti-bacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 6, p. 452–456, 2014.
- SURH, J.; VLADISAVLJEVIC, G. T.; MUN, S.; MCCLEMENTS, J. et al. Preparation and Characterization of Water/Oil and Water/Oil/Water Emulsions Containing Biopolymer-Gelled Water Droplets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 175–184, Jan.

2007.

TARAVEL, M.N.; DOMARD, A. Collagen and its interaction with chitosan. **Biomaterials**, v. 16, n. 11, p. 865-871, 1995.

TEKIN, E.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Physicochemical, rheological, and sensory properties of low-fat ice cream designed by double emulsions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 9, p. 1–9, 2017.

TEPSONGKROH, B.; HARNSILAWAT, T.; MAISUTHISAKUL, P.; CHANTRAPORNCHAI, W. Influence of Polyglycerol Polyricinoleate and Biopolymers on Physical Properties and Encapsulation Efficiency of Water-in-Oil-in-Water Emulsions Containing Mango Seed Kernel Extract. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 36, n. 8, p. 1126–1133, 2015.

THARANATHAN, R. . Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 71–78, Mar. 2003.

THOMPSON, L. H.; DORAISWAMY, L. K. Sonochemistry: Science and Engineering. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 1215–1249, Mar. 1999.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; DONNELL, C. P. O.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BURKE, P.; CULLEN, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5987–6000, 2009.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. 1231–1249, 2014.

URANGA, J.; PUERTAS, A. I.; ETXABIDE, A.; DUEÑAS, M. T.; GUERRERO, P.; CABA, K. Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 86, p. 95–103, 2019.

VALENCIA, G. A. **Propriedades físicas de filmes à base de biopolímeros reforçados com laponita**. 2017. 125 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

VALENCIA, G. A.; LOURENÇO, R. V.; BITTANTE, A. M. Q. B.; SOBRAL, P. J. A. Physical and morphological properties of nanocomposite films based on gelatin and Laponite. **Applied Clay Science**, v. 124–125, p. 260–266, 2016.

VAN DEN BROEK, L. A. M.; KNOOP, R. J. I.; KAPPEN, F. H. J.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237–242, Fev. 2015.

VARGAS, F. C. **Caracterização de extratos aquosos de Pitanga (*Eugenia uniflora* L), Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e sua aplicação para promover a estabilidade da carne bovina refrigerada**. 2015. 125 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

VARGAS, F. C.; ARANTES-PEREIRA, L.; DA COSTA, P. A.; DE MELO, M. P.; SOBRAL, P. J. A. Rosemary and Pitanga Aqueous Leaf Extracts On Beef Patties Stability under Cold Storage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1.10, 2016.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R.; ACEVEDO-FANI, A.; GONZÁLES-AGUILAR, G. A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Encapsulation and stability of a phenolic-rich extract from mango

peel within water-in-oil-in-water emulsions. **Journal of Functional Foods**, v. 56, n. 1, p. 65–73, Mar. 2019.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; DA SILVA, W. P.; DA MOTTA, A. D.; NASCENTE, P. S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.

VIEIRA, M. G. A.; DA SILVA, M. A.; DOS SANTOS, L. O.; BEPPU, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254–263, Mar. 2011.

VILLALOBOS, R.; CHANONA, J.; HERNÁNDEZ, P.; GUTIÉRREZ, G.; CHIRALT, A. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 53–61, 2005.

VLAIA, L.; VLAIA, V.; MICLEA, L. M.; OLARIU, I.; CONEAC, G. Topical W/O/W double emulsions of piroxicam: in vitro drug release study. **Farmacia**, v. 57, n. 5, p. 639–647, 2009.

VOLPE, S.; CAVELLA, S.; MASI, P.; TORRIERI, E. Effect of solid concentration on structure and properties of chitosan-caseinate blend films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 13, n. 1, p. 76–84, Jun. 2017.

WANG, L.-J.; YIN, Y.-C.; YIN, S.-W.; YANG, X.-Q.; SHI, W.-J.; TANG, C.-H.; WANG, J.-M. Development of Novel Zein-Sodium Caseinate Nanoparticle (ZP)-Stabilized Emulsion Films for Improved Water Barrier Properties via Emulsion/Solvent Evaporation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 11089–11097, Nov. 2013.

WANYI, W.; ZEHAN, L. L.; XINAN, X. Comparison of emulsifying characteristics of different macromolecule emulsifiers and their effects on the physical properties of lycopene nanoemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 2691, n. 1, p. 1–10, Mai. 2019.

YAKIMETS, I.; PAES, S. S.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; MITCHELL, J. R. Effect of Water Content on the Structural Reorganization and Elastic Properties of Biopolymer Films: A Comparative Study. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1710–1722, Mai. 2007.

YAKIMETS, I.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; FARHAT, I.; MITCHELL, J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12577–12585, 2005.

YANG, C. S.; HO, C.-T.; ZHANG, J.; WAN, X.; ZHANG, K.; LIM, J. Antioxidants: Differing Meanings in Food Science and Health Science. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 3063–3068, 2018.

YILDIRIM, M.; SUMNU, G.; SAHIN, S. The effects of emulsifier type, phase ratio, and homogenization methods on stability of the double emulsion. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 807–814, 2017.

ZENGİN, G.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M. L.; BAHADORI, M. B.; MOCAN, A.; LOCATELLI, M.; AKTUMSEK, A. Chemical composition and biological activities of extracts from three *Salvia* species: *S. blepharochlaena*, *S. euphratica* var. *leiocalycina*, and *S. verticillata* subsp. *amasiaca*. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 11–21, Jan. 2018.

ZHANG, C.; GUO, K.; MA, Y.; MA, D.; LI, X.; ZHAO, X. Incorporations of blueberry extracts into soybean-protein-isolate film preserve qualities of packaged lard. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 9, p. 1801–1806, Set. 2010.

ZHEN, J.; VILLANI, T. S.; GUO, Y.; QI, Y.; CHIN, K.; PAN, M. H.; WU, Q. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of Hibiscus sabdariffa leaves. **Food Chemistry**, v. 190, p. 673–680, Jan. 2016.