UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LUIS JAIME PÉREZ CÓRDOBA

**Filmes à base de blenda gelatina-quitosana com agentes ativos nanoemulsificados:
desenvolvimento, caracterização e aplicação na conservação de mortadela fatiada
refrigerada**

Pirassununga

2018

LUIS JAIME PÉREZ CÓRDOBA

**Filmes à base de blenda gelatina-quitosana com agentes ativos nanoemulsificados:
desenvolvimento, caracterização e aplicação na conservação de mortadela fatiada
refrigerada**

Versão corrigida

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

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

Pirassununga

2018

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

Pérez Córdoba, Luis Jaime

P438f Filmes à base de blenda gelatina-quitosana com
agentes ativos nanoemulsificados: Desenvolvimento,
caracterização e aplicação na conservação de /
Luis Jaime Pérez Córdoba; orientador Paulo José do
Amaral Sobral. -- Pirassununga, 2018.

222 f.

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

1. biopolímero. 2. filmes ativos. 3. nanoemulsão.
4. mortadela. 5. vida útil. I. do Amaral Sobral,
Paulo José, orient. II. Título.

*Dedico este doutorado aos meus familiares e amigos, especialmente aos
meus pais, irmãos e sobrinhos....*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por todas as bênçãos que me concede a cada dia.

Aos meus pais, irmãos, tios (as), primos (as) e demais familiares que sempre me apoiaram à distância e mantiveram-me nas suas orações para que eu conquistasse esta meta.

À Universidade de São Paulo, especialmente à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), pela oportunidade de realização do curso doutorado direto em Ciências da Engenharia de Alimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela confiança, pela sua paciência para me orientar e pelos seus ensinamentos.

Aos meus companheiros de laboratório LTA, pela convivência e colaboração durante a minha permanência na FZEA.

Aos técnicos e auxiliares de todos os laboratórios dos quais fiz uso para o desenvolvimento desta pesquisa, especialmente à Rodrigo Vinicius Lourenço e Ana Mônica Quinta Barbosa Bittante.

Aos professores e funcionários da FZEA que sempre estiveram disponíveis a me oferecer seu conhecimento ou serviço, muito especialmente ao Prof. Dr. Marco Antonio Trindade.

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas 2013/14324-2 e 2015/22285-2 para o desenvolvimento da minha pesquisa dentro e fora do Brasil (Reino unido).

Ao Prof. Dr. Ian T Norton e aos Dres. Fotios Spyropoulos, Konstantinos Gkatzionis, Hannah K. Batchelor e Yadira González, por me permitirem fazer parte do grupo “*Microstructure Engineering Research*” e por toda a orientação e o apoio durante o meu doutorado sanduiche na Universidade de Birmingham (Reino unido).

Ao Instituto de Ciencia y Tecnologia Alimentária (INTAL) de Medellín – Colômbia, pelo apoio em algumas análises de caracterização dos filmes, especialmente aos MSc Claudia Restrepo, Luis E. Henríquez e à Eng. Diana Riveiro.

À empresa Aditivos e Condimentos IBRAC, em especial ao Sr. Mikael Andriolli Lautenschlager pela doação de insumos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos Prof. Dr. Misael Cortés Rodríguez e Dr. Ricardo Durán Barón das Universidades Nacional de Colômbia e Popular do Cesar, respectivamente, pela sua amizade e apoio.

À Msc. Margarita Núñez de Villavicencio e ao Dr. Roger de Hombre (DEP), do Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentícia (IIIA) de Havana – Cuba, por seus ensinamentos e apoio nesta última fase da tese.

À família Miotti Arantes, por ter me acolhido como mais um membro dela e ter me dado muito apoio durante a minha permanência no Brasil.

A todos os amigos que ganhei para o resto da vida durante a minha estada no Brasil e no Reino Unido.

A cada uma das pessoas que fizeram parte desta maravilhosa história e que estiveram me acompanhando durante esta longa caminhada, meu muito OBRIGADO.

“Emplearse en lo estéril cuando se puede hacer lo útil, ocuparse de lo fácil, cuando se tiene bríos para intentar lo difícil, es despojar de dignidad al talento”

José Martí

“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem nos seus caminhos”

Clarice Lispector

RESUMO

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.

Um problema importante na produção de filmes ativos utilizando agentes ativos lipofílicos é a dificuldade de dispersão desses agentes na solução formadora de filme (SFF). As nanoemulsões podem ser uma alternativa para dispersar esses compostos na matriz biopolimérica. Os objetivos gerais desta pesquisa foram: 1) Desenvolver nanoemulsões óleo-em-água (O/A), com três agentes ativos na fase óleo, sendo dois antimicrobianos – cinamaldeído e óleo essencial de alho – e um antioxidante – alfa-tocoferol, e caracterizar essas nanoemulsões, inclusive sua estabilidade; e 2) Desenvolver, caracterizar e aplicar filmes ativos à base de gelatina-quitosana (G-Q), ativados com nanoemulsões O/A preparadas nas condições ótimas de processo: N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α -tocoferol/cinamaldeído e óleo essencial de alho; e N₄: óleo de canola. As nanoemulsões O/A foram preparadas usando um microfluidizador e Tween 20 e Span 60 como emulsificantes, caracterizadas e incorporadas na SFF. Os filmes foram produzidos pela técnica de *Casting* incorporando 0 ou 5 g agente ativo nanoemulsificado/100 g biopolímero e usando glicerol como plastificante. Os filmes foram caracterizados em termos de propriedades físicas, mecânicas, de permeabilidade ao vapor de água e isothermas de sorção, ópticas, microestruturais, e atividades antimicrobiana e antioxidante. Além disso, um estudo de migração dos agentes ativos em simuladores de alimentos foi realizado. A mortadela fatiada foi embalada em bandejas de poliestireno usando filmes como separador de fatias. Posteriormente, foi avaliada a aceitação sensorial da mortadela e sua vida útil com base em análises físico-químicas e microbiológicas. Os resultados mostraram emulsões O/A com tamanho de gota nanométrico, distribuição monomodal, potencial $\zeta > -30$ mV, alta estabilidade física e eficiência de encapsulação e propriedades ativas. Por outro lado, os filmes ativos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto à espessura, umidade, permeabilidade ao vapor de água e propriedades térmicas. A solubilidade em água, ângulo de contato, transmissão de luz, rigidez e resistência à tração e o brilho dos filmes foram reduzidos ($p < 0,05$), enquanto a deformação na ruptura, opacidade, grau de inchamento, cor e rugosidade da superfície aumentaram consideravelmente ($p < 0,05$) em razão incorporação das nanoemulsões. Os modelos matemáticos de BET, GAB, Peleg e Oswin

descreveram o comportamento de absorção de vapor de água dos filmes. As análises de DSC, FTIR e de difração de raios-X sugeriram compatibilidade entre a gelatina e a quitosana. Uma boa distribuição das nanogotas de óleo que encapsulavam os agentes ativos na matriz biopolimérica foi confirmada pelas análises de MEV e MFA. As nanoemulsões e os filmes ativos foram efetivos contra a *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* e apresentaram atividade antioxidante frente aos radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e o reagente FRAP. As cinéticas de migração dos agentes ativos apresentaram comportamento Fickiano, com valores de coeficientes de difusão efetiva (D) entre 10^{-14} e 10^{-15} m²/s. Por outro lado, as fatias de mortadela embaladas sem filme foram as mais aceitas sensorialmente. Porém, o filme ativo utilizado ofereceu a maior ação antimicrobiana contra a *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*, inicialmente inoculadas na mortadela, além do maior efeito protetor contra bactérias deteriorantes, assim como inibiu a oxidação lipídica por mais tempo (5 dias) durante o estudo de vida útil. Em geral, este estudo evidenciou que os filmes à base de G-Q carregados com agentes ativos nanoemulsificados pode ter potencial como material de embalagem para melhorar a vida útil de alimentos.

Palavras-chave: Biopolímero. Filmes ativos. Nanoemulsão. α -tocoferol. Cinamaldeído. Óleo essencial de alho. Mortadela. Vida útil.

ABSTRACT

PÉREZ CÓRDOBA, L. J. **Gelatin-chitosan blend based films loaded with nanoemulsified active agents: development, characterization and application to conservation of refrigerated sliced mortadella sausage**. 2018. 222 p. PhD Thesis. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

A major problem in the production of active films using lipophilic active agents is their poor dispersion in the film-forming solution (FFS). Nanoemulsions may be an alternative to disperse these compounds within the biopolymeric matrix. The main aims of this research were: 1) to develop oil-in-water (O/W) nanoemulsions incorporated with three active agents in the oil phase, two antimicrobials – cinnamaldehyde and garlic essential oil – and one antioxidant – α -tocopherol and characterize those nanoemulsions, even their stability, and 2) Develop, characterize and applicate gelatin-chitosan (G-Ch) based films activated with O/W nanoemulsions prepared under optimal conditions: N₁: α -tocopherol/cinnamaldehyde; N₂: α -tocopherol/garlic essential oil; N₃: α -tocopherol/cinnamaldehyde and garlic essential oil; and N₄: canola oil. The O/W nanoemulsions were prepared using a microfluidizer and Tween 20 and Span 60 as emulsifiers, characterized, and then loaded into the FFS. The films were produced by the casting method incorporating 0 or 5 g of nanoemulsified active agent/100 g biopolymer, using glycerol as a plasticizer, and subsequently characterized in terms of their physical, mechanical, water vapor permeability, water sorption, optical, microstructural, antimicrobial and antioxidant properties. In addition, a study of active agent migration into food simulants was performed. The sliced mortadella was packed in polystyrene trays using films as a slice separator. After, a sensorial acceptance evaluation and shelf life study, based on physicochemical and microbiological analyses, were performed for the mortadella sausage. The results showed O/A emulsions with nanometric droplet size, monomodal distribution, ζ potential greater than -30 mV, high physical stability, high encapsulation efficiency, and active properties. On the other hand, the active films presented no significant differences ($p > 0.05$) in terms of thickness, moisture content, water vapor permeability, and thermal properties. The solubility in water, contact angle, light transmission, tensile strength, and brightness of films were reduced ($p < 0.05$), whilst the deformation at break, opacity, degree of swelling, color, and surface roughness considerably increased ($p < 0.05$), due to the incorporation of nanoemulsions. The mathematical models of BET, GAB, Peleg and Oswin described the water vapor absorption behavior of the films. The DSC, FTIR, and x-ray analyses suggested compatibility between the

gelatin and chitosan. A good distribution of the oil nanodroplets encapsulating the active agents within the matrix was confirmed by AFM and SEM analyses. The active nanoemulsions and films were effective against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes*, and showed antioxidant activity against the DPPH[•] and ABTS^{•+} free radicals, as well as the FRAP reagent. The kinetic migration of the active agents presented a Fickian behavior with values of effective diffusion coefficients (D) between 10^{-14} and 10^{-15} m²/s. On the other hand, the mortadella slices packed without films were the most sensorially accepted. However, the active films used offered the greatest effectiveness against *L. monocytogenes* and *P. aeruginosa* initially inoculated in the mortadella sausage, and highest protective effect against spoilage bacteria, as well as inhibiting lipid oxidation for longer time (5 days) during the shelf life study. Overall, this study offered clear evidence that G-Ch based films, loaded with nanoemulsified active agents, can have potential as packaging material for enhancing the shelf life of food.

Keywords: Biopolymer. Active films. Nanoemulsion. α -tocopherol. Cinnamaldehyde. Garlic essential oil. Mortadella sausage. Shelf life.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do α -tocoferol.	30
Figura 2 - Estrutura química do cinamaldeído.	31
Figura 3 - Estruturas químicas de sulfetos dialílicos e dipropílicos do óleo essencial de alho.	33
Figura 4 - Representação esquemática dos métodos de emulsificação por alta energia. a) sistema <i>rotor-stator</i> ; b) homogeneização de alta pressão; c) ultrassom; d) dispersão por membrana.	38
Figura 5 - Representação do processo de emulsificação no microfluidizador.	38
Figura 6 - Microfluidizador M-110Y.	39
Figura 7 - Representação esquemática do preparo de nanoemulsão O/A empregando o método de emulsificação-evaporação do solvente.	42
Figura 8 - Estado cinético das nanoemulsões O/A associado à energia de ativação.	45
Figura 9 - Fenômenos físicos e ou fisicoquímicos envolvidos na instabilidade de emulsões.	46
Figura 10 - Princípio de medição do equipamento LUMiSizer®.	48
Figura 11 - Perfis de transmissão para uma nanemulsão O/A indicando a taxa de cremeação em função da força centrífuga relativa (RCF) aplicada.	49
Figura 12 - Classificação dos biopolímeros de acordo com sua fonte de obtenção.	50
Figura 13 - Estrutura molecular da quitosana.	52
Figura 14 - Placas com halos de inibição do cinamaldeído (esquerda) e óleo essencial de alho (direita) frente a: A ₁₋₂) <i>L. monocytogenes</i> ; B ₁₋₂) <i>P. aeruginosa</i> ; C ₁₋₂) <i>S. aureus</i> ; D ₁₋₂) <i>E. coli</i> ; E ₁₋₂) <i>S. enteritidis</i> ; F ₁₋₂) <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152; G ₁₋₂) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692, F ₁₋₂) <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152; G ₁₋₂) e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692.	101
Figura 15 - Emulsões O/A preparadas com diferentes relações de Tween 20:Span 60.	103
Figura 16 - Superfície de resposta 3-D para o diâmetro médio de gotas em função da pressão de homogeneização e temperatura de evaporação com 3 ciclos. A) Nanoemulsão N ₁ ; B) Nanoemulsão N ₂ ; C) Nanoemulsão N ₃	111
Figura 17 - Superfície de resposta 3-D para a polidispersidade em função da pressão de homogeneização e temperatura de evaporação com 3 ciclos. A) Nanoemulsão N ₁ ; B) Nanoemulsão N ₂ ; C) Nanoemulsão N ₃	114

- Figura 18** - Superfície de resposta 3-D para a estabilidade em função da pressão de homogeneização e temperatura de evaporação com 3 ciclos. A) Nanoemulsão N₁; B) Nanoemulsão N₂; C) Nanoemulsão N₃. 117
- Figura 19** - Distribuição do diâmetro médio de gotas nas nanoemulsões ativas. A, B) N₁; C, D) N₂; E, F) N₃ preparadas nas condições ótimas e armazenadas a 20 (A, C, E) e 4 °C (B, D, F). 120
- Figura 20** - Imagens da morfologia das emulsões grossas obtidas por microscopia óptica. A) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; B) N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; C) N₃: α -tocoferol/ cinamaldeído/óleo essencial de alho. 128
- Figura 21** - Imagens da morfologia das emulsões grossas obtidas por MCVL usando um corante fluorescente (*Nile red*) na fase óleo. A) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído B) N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho C) N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho. 129
- Figura 22** - Imagens da microestrutura das nanoemulsões obtidas por MEV. A) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; B) N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; C) N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho. 130
- Figura 23** - Imagens da microestrutura das nanoemulsões obtidas por MFA. A) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; B) N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; C) N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho. 131
- Figura 24** - Efeito de inibição das nanoemulsões ativas contendo A₁₋₂) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; B₁₋₂) N₂: α -tocoferol/óleo de alho; C₁₋₂) N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo de alho contra *P. aeruginosa* (esquerda) e *L. monocytogenes* (direita). 133
- Figura 25** - Distribuição do volume do tamanho médio de gotas das nanoemulsões finais preparadas nas condições ótimas e armazenadas a 4 °C. A) N₁; B) N₂; C) N₃; e D) N₄. 136
- Figura 26** - Aspecto visual de filmes à base de Gelatina–Quitossana. A) F₀: filme controle, sem nanoemulsão; B) F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); C) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); D) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); E) F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). 139
- Figura 27** - Imagens representativas do ângulo de contato de gotas de água sobre a superfície dos filmes: A) F₀: filme controle, sem nanoemulsão; B) F₁: filme com N₁ (α -

tocoferol/cinamaldeído); C) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); D) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); E) F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)..... 142

Figura 28 - Exemplos de isotermas de absorção de água dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)..... 150

Figura 29 - Ajuste de modelos aos dados experimentais das isotermas de absorção dos filmes. A) F₀: filme controle sem nanoemulsão; B) F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); C) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); D) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/ cinamaldeído/óleo essencial de alho); E) F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)..... 151

Figura 30 - Imagens representativas da microestrutura de A) superfície e B) seção transversal dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁; F₂: filme com N₂; F₃: filme com N₃; F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). 156

Figura 31 - Imagens representativas da rugosidade dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁; F₂: filme com N₂; F₃: filme com N₃; F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). A) Topografia em 3D; b) Topografia em 2D 158

Figura 32 - Espectros FTIR dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). 160

Figura 33 - Difratoograma de raios X dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)..... 161

Figura 34 - Termogramas DSC* dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). * As linhas retas e em traços correspondem à 1ª e 2ª varredura, respectivamente..... 162

Figura 35 - Espectros UV/Vis dos filmes F ₀ : filme controle sem nanoemulsão; F ₁ : filme com N ₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F ₂ : filme com N ₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F ₃ : filme com N ₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F ₄ : filme com N ₄ (sem agente ativo).....	165
Figura 36 - Efeito de inibição dos filmes F ₀ , F ₁ , F ₂ , F ₃ e F ₄ contra A) <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152 e B) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692 testado pelo método de difusão em disco.	167
Figura 37 - Ajuste das cinéticas de liberação (linhas) dos agentes ativos α -t, Cin e OEA dos filmes. A) F ₁ : filme com N ₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); B) F ₂ : filme com N ₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); C) F ₃ : filme com N ₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho). Sim. A: água destilada, Sim. D: etanol (95 % v/v)	172
Figura 38 - Otimização do modelo de acordo com o perfil de liberação dos agentes ativos dos filmes F ₁ : A) α -tocoferol; B) Cinamaldeído e F ₂ : C) α -tocoferol; D) óleo essencial de alho	174
Figura 39 - Atributos sensoriais analisados no teste de aceitação de mortadela fatiada embalada com T ₁ (filme ativo), T ₂ (filme controle) e T ₃ (sem filme) estocada a 6 °C por 7 dias	177
Figura 40 - Contagem de bactérias A) <i>L. monocytogenes</i> ; B) <i>P. aeruginosa</i> ; C) coliformes totais; D) mesófilos aeróbicos; E) psicotróficos aeróbicos; F) bactérias ácido lácticas durante o estudo de vida útil de mortadela embalada com T ₁ (filme ativo), T ₂ (filme controle) e T ₃ (sem filme) estocada a 6 °C durante 7 dias.	183

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) de surfactantes	36
Tabela 2 - Exemplos de pesquisas sobre produção de nanoemulsão usando o microfluidizador.....	41
Tabela 3 - Exemplos de filmes à base de gelatina (G), quitosana (Q), ou da blenda gelatina-quitosana, incorporados com agentes ativos, nanoemulsificados (NE) ou não	56
Tabela 4 - Exemplos de pesquisas envolvendo a utilização de filmes ativos com atividade antimicrobiana (AM) e/ou antioxidante (AO) na preservação da carne e produtos cárneos	64
Tabela 5 - Modelos de isotermas de absorção	87
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) e atividade antimicrobiana dos agentes ativos contra diferentes bactérias*	99
Tabela 7 - Capacidade de sequestro dos radicais DPPH [•] e ABTS ^{•+} e poder de redução do íon férrico FRAP dos agentes ativos*	102
Tabela 8 - Matriz do delineamento e valores experimentais e previstos do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N ₁	104
Tabela 9 - Matriz do delineamento e valores experimentais e previstos do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N ₂	104
Tabela 10 - Matriz do delineamento e valores experimentais e previstos do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N ₃	106
Tabela 11 - Valor F e valor p dos coeficientes de regressão e coeficiente de determinação do modelo polinomial de segunda ordem para a nanoemulsão N ₁	107
Tabela 12 - Valor F e valor p dos coeficientes de regressão e coeficiente de determinação do modelo polinomial de segunda ordem para a nanoemulsão N ₂	107
Tabela 13 - Valor F e valor p dos coeficientes de regressão e coeficiente de determinação do modelo polinomial de segunda ordem para a nanoemulsão N ₃	108
Tabela 14 - Restrições de otimização para as variáveis respostas.....	118
Tabela 15 - Condições determinadas na otimização da combinação de níveis dos fatores de homogeneização-evaporação das nanoemulsões.....	118
Tabela 16 - Validação das condições ótimas de processo das nanoemulsões comparando os valores experimentais* com aqueles previstos pelos modelos para cada resposta.....	119

Tabela 17 - Diâmetro médio de gota, polidispersidade, potencial ζ e pH das nanoemulsões preparadas nas condições ótimas monitorados durante o armazenamento a 20 e 4 °C.....	121
Tabela 18 - Retenção dos agentes ativos nas nanoemulsões preparadas nas condições ótimas monitorada durante o armazenamento a 20 e 4 °C.....	124
Tabela 19 - Estabilidade e velocidade de cremeação das nanoemulsões preparadas nas condições ótimas monitoradas no LUMiSizer a 45, 20 e 4 °C simulando 6 meses e 1 ano	125
Tabela 20 - Densidade, tensão interfacial, tensão superficial e viscosidade das nanoemulsões preparadas.....	126
Tabela 21 - Atividade antimicrobiana das nanoemulsões ativas preparadas nas condições ótimas contra <i>P. aeruginosa</i> and <i>L. monocytogenes</i>	132
Tabela 22 - Atividade antimicrobiana* das nanoemulsões ativas contra às bactérias <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692 e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152 baseada nos halos de inibição	134
Tabela 23 - Atividade antioxidante das nanoemulsões expressa como poder de sequestro dos radicais ABTS ^{•+} , DPPH [•] e de inibição do reagente FRAP.....	135
Tabela 24 - Eficiência de encapsulação dos agentes ativos e valores de diâmetro médio de gotas, polidispersidade, potencial ζ e pH das nanoemulsões finais preparadas nas condições ótimas em função do tempo de armazenamento a 4 °C.....	138
Tabela 25 - Espessura, umidade, solubilidade em água e grau de inchamento de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana	140
Tabela 26 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana.....	143
Tabela 27 - Propriedades mecânicas de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana	144
Tabela 28 - Propriedades ópticas de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana.....	146
Tabela 29 - Parâmetros dos modelos de BET, GAB, Peleg e Oswin ajustados aos dados experimentais das isotermas de absorção de água.....	154
Tabela 30 - Parâmetros de rugosidade da superfície de filmes ativos à base de	157
Tabela 31 - Propriedades térmicas de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana.....	163
Tabela 32 - Atividade antimicrobiana* dos filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692 e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152 baseada nos halos de inibição	168

Tabela 33 - Atividade antioxidante de filmes ativos à base de Gelatina-Quitossana expressa como equivalente Trolox.....	169
Tabela 34 - Migração global dos componentes não voláteis derivados de filmes ativos à base de Gelatina-Quitossana em simuladores de alimentos.....	170
Tabela 35 - Migração específica e valores de coeficiente de partição ($K_{f,s}$) e partição (α) dos agentes ativos incorporados em filmes ativos à base de Gelatina-Quitossano ...	171
Tabela 36 - Coeficientes de difusão principais e cruzados dos agentes ativos α -t e Cin liberados dos filmes ativos à base de Gelatina-Quitossana	175
Tabela 37 - Grau de aceitação da mortadela fatiada estocada a 6 °C medido através do atributo qualidade global	176
Tabela 38 - Parâmetros físicoquímicos monitorados durante 7 dias no estudo de vida útil da mortadela fatiada estocada a 6 °C.....	178
Tabela 39 - Valores experimentais do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N ₁ no dia 0	220
Tabela 40 - Valores experimentais do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N ₂ no dia 0.....	221
Tabela 41 - Valores experimentais do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N ₃ no dia 0.....	222

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa = Atividade de água

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

ANOVA = Análise de variância simples

AOAC = *Association of Official Analytical Chemistry*

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM = *American Society for Testing and Materials*

α -t = Alfa-tocoferol

BAL = Bactérias acidoláticas

BET = Brunauer-Emmett-Teller

BHA = Butil hidroxianisol

BHI = *Brain Heart Infusion*

BHL = Balanço hidrofílico-lipofílico

BHT = Butil hidroxitolueno

CIM = Concentração inibitória mínima

Cin = Cinamaldeído

D_{ij} = coeficientes de difusão multicomponente de Maxwell-Stefan

D₁₁ e D₂₂ = Coeficientes de difusão principais

D₁₂ e D₂₁ = Coeficientes de difusão cruzados

D_m = Diâmetro médio de gota

DLS = Dispersão de luz dinâmica

DP = Deformação na perfuração

DPPH[•] = 2,2-difenil-1-picrilhidrazina

DRX = Difração de raios X

DSC = Calorimetria diferencial de varredura

EC₁ = Concentração equivalente

EC₅₀ = Concentração equivalente 50%

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

EE = Eficiência de encapsulação

Eq. = Equação

ER = Elongação na ruptura

ET = Equivalente Trolox

EUA = Estados Unidos de América

FDA = *Food and Drug Administration*

FP = Força máxima de perfuração

FRAP = *Ferric reducing ability of plasma*

FTIR = Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

FZEA = Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

GAB = Guggenheim-Anderson-Boer

GI = Grau de inchamento

G–Q = Gelatina–Quitosana

GRAS = Geralmente reconhecido como seguro

KCl = Cloreto de potássio

Log UFC/g = Logaritmo de número de unidades formadoras de colônias por grama

MAD = Malonaldeído

MCVL = Microscopia confocal de varredura laser

ME = Módulo de elasticidade

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

MFA = Microscopia de força atômica

MRS = Agar *De man, rogosa, sharpe*

MSR = Metodologia de superfície de resposta

NCCLS = *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

OEA = Óleo essencial de alho

O/A = Óleo-em-água

PCA = Agar *Plate count*

PD = Polidispersidade

PHB = Polihidroxibutirato

PHB-HV = Polihidroxibutirato-*co*-valerato

Potencial ζ = Potencial zeta

PVA = Permeabilidade ao vapor de água

PVC = poli(cloreto de vinila)

R_a = Rugosidade média do filme

R_q = Rugosidade média quadrática do filme

SA = Solubilidade em água

SFF = Solução formadora de filme

Span 60 = *Sorbitane monostearate*

Tg = Temperatura de transição vítrea

Tm = Temperatura de fusão

TBA = Ácido tiobarbitúrico

TBARs = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEAC = Capacidade antioxidante equivalente Trolox

TEP = 1,1-3,3 tetraetoxipropano

TI = Tensão interfacial

TPTZ = *2,4,6-tripyridyl-s-triazine*

TR = Tensão na ruptura

TS = Tensão superficial

TSA = Agar *Tryptic soy*

Tween 20 = *Polyethylene glycol sorbitan monolaurate*

U = Umidade

UE = Umidade de equilíbrio

UFC/mL = Unidades formadoras de colônia por mililitro

UR = Umidade relativa

USP = Universidade de São Paulo

UV = Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
2.1	AGENTES ATIVOS	30
2.1.1	<i>Alfa-tocoferol.....</i>	<i>30</i>
2.1.2	<i>Cinamaldeído.....</i>	<i>31</i>
2.1.3	<i>Óleo essencial de alho</i>	<i>32</i>
2.2	EMULSÕES ÓLEO-EM-ÁGUA.....	33
2.2.1	<i>Emulsificantes</i>	<i>35</i>
2.2.2	<i>Tecnologias de produção de nanoemulsões.....</i>	<i>37</i>
2.2.2.1	<i>Métodos de emulsificação de alta energia.....</i>	<i>37</i>
2.2.2.2	<i>Método de emulsificação-evaporação</i>	<i>42</i>
2.2.3	<i>Estabilidade da nanoemulsão</i>	<i>44</i>
2.2.3.1	<i>Fenômeno de maturação de Ostwald.....</i>	<i>46</i>
2.2.3.2	<i>Testes de medição da estabilidade e vida útil de nanoemulsões</i>	<i>47</i>
2.3	BIOPOLÍMEROS.....	49
2.3.1	<i>Gelatina.....</i>	<i>50</i>
2.3.2	<i>Quitosana.....</i>	<i>51</i>
2.3.3	<i>Blendas de biopolímeros.....</i>	<i>52</i>
2.4	EMBALAGENS ATIVAS	53
2.4.1	<i>Filmes ativos</i>	<i>54</i>
2.4.2	<i>Interação embalagem ativa-alimento</i>	<i>60</i>
2.5	APLICAÇÃO DE FILMES ATIVOS EM PRODUTOS CÁRNEOS.....	63
3	OBJETIVOS.....	66
4	HIPÓTESE	67
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
5.1	MATERIAL E REAGENTES.....	68
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES ATIVOS.....	69
5.2.1	<i>Atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM)</i>	<i>69</i>
5.2.2	<i>Atividade antioxidante</i>	<i>70</i>
5.2.2.1	<i>Método DPPH*</i>	<i>70</i>

5.2.2.2	<i>Método ABTS^{•+}</i>	70
5.2.2.3	<i>Método FRAP</i>	71
5.3	DETERMINAÇÃO DO BALANÇO HIDROFÍLICO-LIPOFÍLICO	71
5.4	PREPARO DAS NANOEMULSÕES	72
5.5	DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PROCESSO DAS NANOEMULSÕES	73
5.5.1	<i>Delineamento experimental</i>	73
5.5.2	<i>Análises de regressão</i>	74
5.5.3	<i>Otimização e validação do modelo</i>	74
5.6	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES	75
5.6.1	<i>Diâmetro médio de gota e polidispersidade</i>	75
5.6.2	<i>Estabilidade</i>	75
5.7	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES PROCESSADAS NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS	75
5.7.1	<i>Potencial ζ</i>	76
5.7.2	<i>pH</i>	76
5.7.3	<i>Eficiência de encapsulação (EE)</i>	76
5.7.4	<i>Estabilidade das nanoemulsões</i>	77
5.7.5	<i>Análise de tensão interfacial e superficial</i>	77
5.7.6	<i>Determinação da densidade</i>	78
5.7.7	<i>Análise do comportamento reológico</i>	78
5.7.8	<i>Microestrutura e morfologia</i>	78
5.7.8.1	<i>Microscopia óptica e microscopia confocal de varredura laser (MCVL) das emulsões grossas</i>	78
5.7.8.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA) das nanoemulsões</i>	79
5.7.9	<i>Atividade antimicrobiana</i>	79
5.7.10	<i>Atividade antioxidante</i>	80
5.8	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES PRODUZIDAS SEM O USO DE SOLVENTE ORGÂNICO	80
5.9	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES ATIVOS	80
5.9.1	<i>Preparo das soluções formadoras de filme (SFF)</i>	81
5.9.2	<i>Produção dos filmes</i>	82
5.10	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	82

5.10.1	<i>Espessura</i>	82
5.10.2	<i>Umidade</i>	82
5.10.3	<i>Solubilidade em água e grau de inchamento</i>	83
5.10.4	<i>Ângulo de contato de água</i>	83
5.10.5	<i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	84
5.10.6	<i>Propriedades mecânicas</i>	84
5.10.7	<i>Própriedades ópticas</i>	85
5.10.7.1	<i>Cor e opacidade</i>	85
5.10.7.2	<i>Brilho</i>	86
5.10.8	<i>Isotermas de absorção de vapor de água</i>	86
5.10.9	<i>Microestrutura dos filmes</i>	87
5.10.9.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	87
5.10.9.2	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i>	87
5.10.10	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	88
5.10.11	<i>Difração de raios X</i>	88
5.10.12	<i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	88
5.10.13	<i>Propriedade de barreira à luz UV/visível</i>	89
5.10.14	<i>Atividade antimicrobiana</i>	89
5.10.15	<i>Atividade antioxidante</i>	90
5.11	ESTUDO DE MIGRAÇÃO DOS AGENTES ATIVOS	90
5.11.1	<i>Ensaio de migração global</i>	91
5.11.2	<i>Ensaio de migração específica</i>	91
5.12	APLICAÇÃO DO FILME ATIVO EM MORTADELA PRODUZIDA COM REDUÇÃO DE ADITIVOS.....	93
5.12.1	<i>Produção de mortadela</i>	93
5.12.2	<i>Análises de composição centesimal da mortadela</i>	94
5.12.3	<i>Tratamentos testados nas análises da mortadela fatiada estocada a 6 °C</i>	95
5.12.4	<i>Estudo de aceitação sensorial da mortadela fatiada estocada a 6 °C</i>	95
5.13	ESTUDO DE VIDA ÚTIL DA MORTADELA FATIADA ESTOCADA A 6 °C POR 7 DIAS	96
5.13.1	<i>Análises Físico-Químicas</i>	96
5.13.1.1	<i>Cor</i>	96
5.13.1.2	<i>pH</i>	96
5.13.1.3	<i>Atividade de água (Aa)</i>	96

5.13.1.4	<i>Oxidação de lipídios</i>	96
5.13.2	<i>Análise microbiológica</i>	97
5.14	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	98
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
6.1	CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES ATIVOS.....	99
6.1.1	<i>Atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM)</i>	99
6.1.2	<i>Atividade antioxidante</i>	102
6.2	BALANÇO HIDROFÍLICO-LIPOFÍLICO DOS EMULSIFICANTES	103
6.3	DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PROCESSO DAS NANOEMULSÕES	104
6.3.1	<i>Diâmetro médio de gota</i>	108
6.3.2	<i>Polidispersidade (PD)</i>	112
6.3.3	<i>Estabilidade</i>	115
6.3.4	<i>Otimização e validação dos parâmetros de preparo das nanoemulsões</i>	118
6.4	CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DAS NANOEMULSÕES PREPARADAS NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS.....	119
6.4.1	<i>Diâmetro médio de gota e polidispersidade</i>	119
6.4.2	<i>Potencial ζ</i>	122
6.4.3	<i>pH</i>	123
6.4.4	<i>Eficiência de encapsulação (EE)</i>	123
6.4.5	<i>Estabilidade das nanoemulsões</i>	124
6.4.6	<i>Tensão superficial e interfacial e densidade das nanoemulsões</i>	126
6.4.7	<i>Comportamento reológico das nanoemulsões</i>	127
6.4.8	<i>Microestrutura e morfologia</i>	127
6.4.8.1	<i>Microscopia óptica e microscopia confocal de varredura laser (MCVL) das emulsões grossas</i>	127
6.4.8.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA) das nanoemulsões</i>	129
6.4.9	<i>Atividade antimicrobiana das nanoemulsões</i>	132
6.4.10	<i>Atividade antioxidante das nanoemulsões</i>	134
6.5	CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DE NANOEMULSÕES PRODUZIDAS SEM USO DE SOLVENTE ORGÂNICO.....	135
6.5.1	<i>Eficiência de encapsulação</i>	135
6.5.2	<i>Diâmetro médio de gota, polidispersidade, potencial ζ e pH</i>	136

6.6	CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DOS FILMES ATIVOS.....	139
6.6.1	<i>Espessura</i>	140
6.6.2	<i>Umidade</i>	140
6.6.3	<i>Solubilidade em água e grau de inchamento</i>	140
6.6.4	<i>Ângulo de contato de água</i>	141
6.6.5	<i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	143
6.6.6	<i>Propriedades mecânicas</i>	144
6.6.7	<i>Propriedades ópticas</i>	146
6.6.7.1	<i>Cor</i>	146
6.6.7.2	<i>Opacidade</i>	147
6.6.7.3	<i>Brilho</i>	148
6.6.8	<i>Isotermas de absorção de vapor de água</i>	148
6.6.9	<i>Microestrutura dos filmes</i>	155
6.6.9.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	155
6.6.9.2	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i>	157
6.6.10	<i>Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	159
6.6.11	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	160
6.6.12	<i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	161
6.6.13	<i>Propriedades de barreira à luz UV/visível</i>	164
6.6.14	<i>Atividade antimicrobiana</i>	166
6.6.15	<i>Atividade antioxidante</i>	168
6.7	ESTUDO DE MIGRAÇÃO DOS AGENTES ATIVOS	169
6.7.1	<i>Migração global em simuladores de alimentos</i>	169
6.7.2	<i>Migração específica em simuladores de alimentos</i>	170
6.8	APLICAÇÃO DO FILME ATIVO NA CONSERVAÇÃO DE MORTADELA PRODUZIDA COM REDUÇÃO DE ADITIVOS.....	175
6.8.1	<i>Composição centesimal da mortadela</i>	176
6.8.2	<i>Aceitação sensorial</i>	176
6.9	ESTUDO DE VIDA ÚTIL DA MORTADELA FATIADA ESTOCADA A 6 °C POR 7 DIAS	177
6.9.1	<i>Análises físico-químicas</i>	177
6.9.1.1	<i>Cor</i>	177
6.9.1.2	<i>pH</i>	179
6.9.1.3	<i>Atividade de água (Aa)</i>	180

6.9.1.4	<i>Oxidação de lipídios</i>	180
6.9.2	<i>Análise microbiológica</i>	181
7	CONCLUSÕES	184
8	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	186
	REFERÊNCIAS	187
	ANEXOS.....	217
	APÊNDICES.....	219

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis tem sido o foco de muitas pesquisas, como uma alternativa ao material plástico derivado do petróleo, que gera um acúmulo massivo de resíduos plásticos no meio ambiente (ARANCIBIA et al., 2014; RUBILAR et al., 2013). Filmes à base de biopolímeros não têm as mesmas propriedades físicas dos plásticos sintéticos. No entanto, apresentam uma aplicação promissora, já que geralmente são produzidos de fontes renováveis, são não tóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e, às vezes, podem se tornar embalagens comestíveis (CHEN et al., 2016; KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014). Além disso, esses filmes são excelentes veículos para incorporar uma ampla variedade de compostos bioativos e, portanto, esses materiais biodegradáveis podem ser usados como embalagem ativa (ABDOLLAHI; REZAEI; FARZI, 2012; RHIM; NG, 2007). As embalagens ativas estão recebendo muita atenção em razão do seu papel na liberação de agentes antimicrobianos ou antioxidante nos alimentos, para minimizar ou até eliminar a presença de microrganismos e reações oxidativas de origem alimentar e, portanto, prolongar a vida útil dos mesmos (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017; RIZZOLO et al., 2016).

Dentre os agentes bioativos recentemente incorporados em filmes, o α -tocoferol (α -t), o cinamaldeído (Cin) e o óleo essencial de alho (OEA) demonstraram ter uma ampla gama de efeitos biológicos, incluindo propriedades antimicrobianas e/ou antioxidante (KIM; KIM; KYUNG, 2004; WEI et al., 2011; YANG; MCCLEMENTS, 2013). O α -tocoferol é a forma mais biologicamente ativa da vitamina E em humanos, apresentando alta atividade antioxidante em sistemas biológicos e alimentícios (SABERI; FANG; MCCLEMENTS, 2013; YANG; MCCLEMENTS, 2013). O cinamaldeído é o principal composto ativo do óleo essencial da canela (CHEN et al., 2016) e tem se mostrado efetivo contra muitas bactérias, fungos e vírus patogênicos transmitidos por alimentos (WEI et al., 2011). O óleo essencial de alho é um óleo com uma variedade de compostos ativos, principalmente sulfetos dialílicos, usado como conservante de alimentos, que tem se mostrado efetivo contra uma ampla gama de microrganismos patogênicos e deteriorantes, incluindo: bactérias, fungos, parasitas e vírus (SUNG et al., 2014b). Todos esses agentes ativos têm sido geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) para uso em alimentos pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA (BAKER; GRANT, 2017; LAERMER; ZAMBETTI, 1992; WEI et al., 2011) e foram usados de forma independente como aditivos ativos em embalagens produzidas à base de biopolímeros por Noronha et al. (2014), Otoni et al. (2016b) e Pranoto, Rakshit e Salokhe (2005), dentre outros. Contudo, esses agentes ativos são pouco solúveis em água e, como tal, são

extremamente difíceis de se incorporar nas formulações de filmes, que geralmente são sistemas hidrofílicos (ALEXANDRE et al., 2016). Portanto, o presente estudo relata uma abordagem microestrutural que envolve a encapsulação de compostos ativos em nanoemulsões de óleo-em-água (O/A) antes de incorporá-las em uma formulação de filme à base de blenda gelatina-quitosana (4:1), visando facilitar a dispersão dos agentes ativos na matriz biopolimérica, bem como facilitar a liberação dos mesmos em um produto cárneo pronto para consumo, uma vez entre em contato com o filme ativo.

Os produtos prontos para consumo, entre eles a mortadela fatiada, são processados completamente antes da embalagem final e são consumidos sem cozimento adicional. Se ocorrer uma contaminação pós-processo por bactérias patogênicas ou deteriorantes nesse tipo de produtos, existe uma alta possibilidade de estragar o alimento e/ou provocar doenças ao consumidor U.S. *Department of Agriculture* (USDA, 2005). Desse modo, o uso de embalagens ativas com agentes antimicrobianos/antioxidantes que retardem a perda de qualidade por deterioração causado por crescimento microbiano e processos oxidativos ou que melhorem a vida útil deste tipo de produtos tem sido de muito interesse nas últimas décadas por produtores e consumidores em busca de alimentos mais saudáveis, minimamente processados e livres de aditivos (SANTIAGO-SILVA et al., 2009).

Embalagens ativas têm sido desenvolvidas com extratos de orégano e alecrim (CAMO; BELTRÁN; RONCALÉS, 2008), extrato cítrico (CONTINI et al., 2014), nisina (CORREA et al., 2017), enterocinas (MARCOS et al., 2007), óleo essencial de *Zataria multiflora* e extrato de semente de uva (MORADI et al., 2011), extrato de própolis (RIZZOLO et al., 2016) e pediocina (SANTIAGO-SILVA et al., 2009), etc., para aplicação em mortadela ou presunto fatiado. No entanto, a incorporação conjunta dos agentes ativos α -t, Cin e/ou OEA nanoemulsificados em filmes à base de blenda gelatina-quitosana para melhorar a qualidade ou segurança e prolongar a vida útil de mortadela fatiada refrigerada não foi ainda reportada.

Esta Tese está composta de oito seções:

- Seção 1. Corresponde à Introdução, onde se apresenta uma breve introdução à tese, para a contextualização do trabalho realizado;
- Seção 2. Correspondendo à Revisão Bibliográfica, onde foram descritos e definidos alguns conceitos relacionados aos agentes ativos utilizados (α -tocoferol, cinamaldeído e óleo essencial de alho), às nanoemulsões O/A, aos filmes ativos e à aplicação desses filmes ativos em produtos cárneos;

- Seção 3. Correspondendo aos Objetivos gerais e específicos desta tese;
- Seção 4. Correspondendo à Hipótese da tese;
- Seção 5. Correspondendo aos Materiais e métodos, onde se apresentam todos os experimentos e análises de caracterização realizados para o desenvolvimento da tese. Esta seção está descrita em quatro etapas bem definidas: 1) Caracterização dos agentes ativos, cujas atividades foram feitas na FZEA; 2) preparo e caracterização de nanoemulsões O/A, cujas atividades foram feitas parte na FZEA e parte na Universidade de Birmingham, Reino Unido; 3) produção e caracterização de filmes ativos, cujas atividades foram feitas parte na FZEA e parte na Universidade de Birmingham, Reino Unido; e 4) aplicação do filme ativo na conservação de mortadela fatiada refrigerada; cujas atividades foram feitas na FZEA;
- Seção 6. Correspondendo a Resultados e Discussão. Nesta seção se apresentam e discutem os resultados referentes a: 1) Determinação da concentração inibitória mínima (CIM), atividade antimicrobiana e antioxidante dos agentes ativos cinamaldeído, óleo essencial de alho e α -tocoferol. 2) Determinação do balanço hidrofílico-lipofílico de emulsificantes, otimização das condições de processo, caracterização e estudo de estabilidade de nanoemulsões O/A contendo os agentes ativos. 3) Caracterização das propriedades físico-químicas, antimicrobiana e antioxidante dos filmes ativos de G–Q incorporados com as nanoemulsões preparadas nas condições ótimas e estudo de migração dos agentes ativos dos filmes. 4) Avaliação da aceitação sensorial e estudo de vida útil de mortadela fatiada, embalada com os filmes ativo e controle e armazenada sob refrigeração;
- Seção 7. Correspondendo às conclusões do trabalho;
- Seção 8. Corresponde a recomendações para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agentes ativos

Um agente ativo é a parte biológica ou quimicamente ativa de uma substância (medicamento) ou de um produto de origem natural (alimento ou planta) ou sintético, que pode exercer efeito farmacológico ou outros efeitos como antimicrobiano, antioxidante, nutracêutico, pesticida, inseticida, etc. Um agente ativo que sirva como aditivo alimentar não pode apresentar qualquer tipo de toxicidade, conferir aroma, sabor, ou cor ao produto, mas deve ser efetivo em baixas concentrações, ser fácil de incorporar de forma a obter-se uma mistura homogênea, resistir à temperatura e estar disponível a um preço relativamente baixo (PEREIRA, 2010). Em virtude da dificuldade de encontrar um agente ativo que reúna todas essas características é comum recorrer-se a sinergismos ou combinação de dois ou mais compostos, como agentes antimicrobianos com antioxidantes, de modo a conseguir reunir os benefícios de cada componente (PEREIRA, 2010).

2.1.1 *Alfa-tocoferol*

Os tocoferóis (α , β , γ , e δ) são uma família de compostos naturais ou sintéticos amplamente utilizados como ingredientes funcionais de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, sendo o α -tocoferol o membro mais naturalmente abundante e biologicamente ativo da vitamina E em humanos (YANG; MCCLEMENTS, 2013). Esses isômeros contêm dois elementos estruturais principais, uma cabeça do anel cromanol (benzodi-hidropirano contendo um grupo álcool) e uma cadeia lateral de fitol, consistindo em unidades repetidas de isoprenóides saturados (Figura 1) (TEIXEIRA et al., 2017).

Figura 1 - Estrutura química do α -tocoferol.

Fonte: Yang e McClements (2013).

O α -tocoferol tem uma ampla variedade de aplicações, dentre elas, redutor de colesterol, protetor cutâneo, potenciador imunológico, preventivo de câncer, regulador de hormônios, inibidor da agregação plaquetária e também é usado como uma molécula anti-inflamatória

(KAUR et al., 2017). Além disso, tem função antioxidante ao agir como sequestrador de radicais peroxil livres, podendo, portanto, ser capaz de proteger da auto-oxidação os lipídios presentes na fase gordurosa dos alimentos, bem como aqueles na membrana das células vivas (TEIXEIRA et al., 2017).

Assim como outros compostos lipofílicos, a utilização do α -tocoferol como ingrediente funcional em alimentos e bebidas está atualmente limitada em razão da baixa afinidade pela água e da alta sensibilidade a fatores como luz, oxigênio, álcali e temperatura (SABERI; FANG; MCCLEMENTS, 2013). Portanto, diferentes sistemas nanocarregadores/encapsulantes, entre os quais se incluem as micro e nanoemulsões O/A, têm sido pesquisados por Chiu e Yang (1992), Hatanaka et al. (2010), Kaur et al. (2017), Mehmood (2015), Saberi, Fang e Mcclements (2013), Shukat, Bourgaux e Relkin (2012), Teixeira et al. (2017) e Yang e Mcclements (2013) como possíveis alternativas para superar esses problemas. As vantagens da incorporação do α -tocoferol em nanoemulsões O/A dependem principalmente da melhora na sua estabilidade química, evitando o fenômeno de auto-oxidação e aumentando as propriedades antioxidantes em formulações alimentícias ou farmacêuticas (TEIXEIRA et al., 2017).

2.1.2 Cinamaldeído

O Cinamaldeído, ou *3-fenil-2-propenaldeído* (Figura 2), é um aldeído aromático e o principal componente (aproximadamente 65%) do extrato e óleo das folhas e casca da canela (*Cinnamomum verum*) (BURT, 2004). O cinamaldeído produz o odor e sabor característico de canela e tem sido utilizado tradicionalmente para conservar ou melhorar o aroma dos alimentos (WEI et al., 2011).

Figura 2 - Estrutura química do cinamaldeído

Fonte: Shreaz et al. (2016).

Este composto bioativo demonstrou ter atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos (SHREAZ et al., 2016), incluindo bactérias (AMALARADJOU et al., 2010; GOÑI et al., 2009; SHEN et al., 2015),

fungos (CHENG et al., 2008; XING et al., 2014) e vírus (HAYASHI et al., 2007). Além disso, ele é considerado como inseticida (HUANG; HO, 1998), anti-inflamatório (LIAO et al., 2008) e anticancerígeno (IMAI et al., 2002). O hipotético mecanismo de ação do cinamaldeído da mesma forma que do óleo essencial da canela é associado ao seu caráter lipofílico e ao seu acúmulo na membrana citoplasmática da célula, o que causa a perda da integridade dessa membrana e esgotamento de energia celular, além de alteração e dano dos perfis de ácidos graxos, inibição das enzimas respiratórias e dissipação da força motriz de prótons na célula (HELANDER et al., 1998; DONSI et al., 2012).

Diversos sistemas de encapsulação do cinamaldeído, como sistema de carregamento ou para fazer ligações cruzadas entre matrizes de proteínas, foram estudados (CHEN et al., 2017; DONSI et al., 2012; JO et al., 2015; OTONI et al., 2014, 2016a,b; PONCE; BUERA; ELIZALDE, 2010). As nanoemulsões O/A têm sido particularmente as mais adequadas para aplicações em alimentos, já que podem ser produzidas com ingredientes compatíveis aos alimentos, empregando a homogeneização de alta pressão (DONSI et al., 2012; McCLEMENTS, 2004).

2.1.3 Óleo essencial de alho

O alho (*Allium sativum* L.) tem sido utilizado ao longo da história tanto para fins culinários quanto medicinais (LANZOTTI, 2006). O óleo essencial de alho (OEA), obtido por destilação a vapor, é uma fonte particularmente rica em compostos orgâno-sulfurados ao qual é associado uma variada gama de funções, como antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório, antiviral, anticancerígeno, antidiabético, redutor do nível de colesterol no sangue, dentre outras (LAWRENCE; LAWRENCE, 2011; WANG et al., 2011). Os componentes majoritários do óleo essencial de alho são o trissulfeto de dialilo (DATS) (27,33%), dissulfeto de dialilo (DADS) (24,67%), trissulfeto de alilo-metilo (MATs) (19,11%), ditiopropanoato de propenilo (8,59%), trissulfeto de dimetilo (DMTs) (2,18%), tetrassulfeto de dialilo (DATTS) (2,13%) e uma pequena quantidade de dissulfeto de alilo-propilo (Figura 3) (KIM; KIM; KYUNG, 2004). O tetrassulfeto de dialilo, que é gerado a partir da alicina, constitui o principal componente sulfuroso responsável pela atividade antimicrobiana do OEA (SUNG et al., 2014b).

Figura 3 - Estruturas químicas de sulfetos dialílicos e dipropílicos do óleo essencial de alho

Fonte: Casella et al. (2013).

A atividade antimicrobiana do OEA contra diferentes bactérias, fungos e leveduras, entre eles, *Staphylococcus*, *Salmomella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Candida*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*, assim como a sua atividade antioxidante, tem sido relatada em vários trabalhos (BAKER; GRANT, 2017; BENKEBLIA, 2004; CASELLA et al., 2013; KALLEL et al., 2014; KIM; KIM; KYUNG, 2004; LAWRENCE; LAWRENCE, 2011; RAZAVI ROHANI et al., 2011; SUNG et al., 2014a).

Apesar dos efeitos benéficos do OEA, a sua volatilidade, forte odor, baixa estabilidade fisicoquímica e insolubilidade em água limitam a sua aplicação como ingrediente funcional nos alimentos (CORZO-MARTÍNEZ; CORZO; VILLAMIEL, 2007). Portanto, a emulsificação ou incorporação deste agente lipofílico em outras estruturas pode ser uma alternativa para melhorar a sua aplicação na indústria de alimentos. Pranoto, Rakshit e Salokhe (2005) analisaram as propriedades físicas e antimicrobianas de filmes à base de alginato incorporados com OEA, Sung et al. (2014a) incorporaram OEA em filmes plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD) para controlar o crescimento de bactérias e estender a vida útil de *beef loaves* prontos para consumo, enquanto Wang et al. (2011) prepararam um complexo à base de OEA- β -cyclodextrina e investigaram suas propriedades físico-químicas, bem como a liberação do composto ativo em um meio de dissolução ácida.

2.2 Emulsões óleo-em-água

Emulsões óleo-em-água (O/A) consistem em pequenas gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa contínua, com cada gota de óleo rodeada por uma camada interfacial fina de moléculas emulsificantes (LEE; MCCLEMENTS, 2010; MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007; TADROS et al., 2004). Segundo Mason et al. (2006), emulsões convencionais são

classificadas como aquelas de tamanho de gota maior do que 100 nm, enquanto as nanoemulsões são aquelas que se encontram por baixo desse valor. No entanto, ainda há muitas controvérsias em torno das fronteiras que demarcam as nanoemulsões e as emulsões convencionais (MASON et al., 2006). McClements (2002) considera que um valor de 100 nm é interessante, porque as propriedades físico-químicas das dispersões coloidais se alteram apreciavelmente abaixo deste valor, por exemplo, elas começam a ser mais transparentes e tornam-se altamente estáveis à separação gravitacional.

Outros autores têm reportado diferentes faixas de tamanho para nanoemulsões. Por exemplo, Guo et al. (2007), Porras et al. (2008) e Shakeel e Ramadan (2010), apontaram menos de 100 nm; Talegaonkar et al. (2010), entre 10 e 100 nm; Anton, Benoit e Saulnier (2008) e Tadros et al. (2004), entre 100 e 500 nm e Sakulku et al. (2009), entre 100 e 600 nm. No entanto, o tamanho mais adequado para obter propriedades físico-químicas diferentes das emulsões convencionais, com base na definição de nanotecnologia, está na faixa inferior a 100 nm (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012).

As nanoemulsões geralmente apresentam alta estabilidade à separação gravitacional e à agregação das gotas, em virtude do pequeno tamanho das mesmas e do fato das gotas não serem deformáveis. Em princípio, esse tamanho reduzido das gotas de óleo na nanoemulsão O/A produz uma redução do efeito da gravidade e uma diminuição das forças de atração entre elas, dificultando a separação de fases, a floculação e/ou a coalescência durante o armazenamento (HERNÁNDEZ, 2009; MCCLEMENTS, 2004). As nanoemulsões também são referidas na literatura como miniemulsões (EL-AASSER; SUDOL, 2004), emulsões ultrafinas (NAKAJIMA, 1997) e emulsões sub-micro (AMSELEN; FRIEDMAN, 1998).

As nanoemulsões O/A estão se tornando de interesse crescente para a indústria de alimentos, por causa das suas vantagens potenciais em comparação a outros sistemas coloidais e às mesmas emulsões convencionais (MCCLEMENTS, 2012), tais como boa estabilidade física, fluidez, baixa turbidez, maior solubilidade em água e melhor absorção dos componentes ativos lipofílicos encapsulados, como os nutracêuticos, esteróis de plantas, óleos essenciais, saborizantes, carotenoides, tocoferóis, vitaminas, ácidos graxos da dieta e outros compostos antimicrobianos e antioxidantes com mínimo impacto sobre as propriedades organolépticas da ampla gama de produtos alimentícios em que são incorporados ou liberados (EZHILARASI et al., 2012; LEE; MCCLEMENTS, 2010; MAYER; WEISS; MCCLEMENTS, 2013). Gaysinsky et al. (2008) e McClements (2011) demonstraram que os óleos essenciais podem melhorar a sua

atividade biológica, sua estabilidade química e aumentar a sua solubilidade em água ao serem nanoemulsificados.

2.2.1 Emulsificantes

Os emulsificantes são moléculas que tem características anfifílicas, ou seja, que tem afinidade por meios polares e apolares. Dessa forma, elas se adsorvem na superfície das gotas recém-formadas durante a homogeneização e atuam de duas formas: (i) formando uma camada protetora que impede a agregação das gotas e (ii) reduzindo a tensão superficial na interfase (KUHN; CUNHA, 2012; MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007). Os emulsificantes geralmente podem ser classificados em dois grupos – aqueles de molécula pequena, tais como polisorbatos e ésteres de glicerol, que têm forte atividade emulsificante, e os de moléculas maiores, como as proteínas do leite e os amidos modificados, que têm propriedades tanto emulsificantes quanto estabilizantes (MAO et al., 2010).

Segundo Hernández (2009), as características desejáveis para um emulsificante são:

- Reduzir a tensão interfacial ao redor de 5 dinas/cm em emulsões preparadas por agitação;
- Formar uma película fina não aderente que seja resistente quando duas gotas colidem e não permita a floculação ou a coalescência;
- Ter uma estrutura molecular específica com terminação hidrofílica para atrair a água e terminação lipofílica para atrair o óleo;
- Ser mais solúvel na fase contínua, para que possa se adsorver rapidamente ao redor das gotas da nanoemulsão;
- Ter a capacidade de emulsionar o sistema requerido com pequenas concentrações;
- Ser relativamente econômico, seguro e não tóxico.

O balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) dos emulsificantes faz referência ao equilíbrio entre as duas porções moleculares com características opostas dos emulsificantes. O BHL representa um sistema de classificação dos emulsificantes, tendo como base a solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares. No sistema BHL, uma escala numérica adimensional de valores entre 1 e 20 é usada para descrever a natureza do agente emulsificante, tendo em vista que os valores de BHL aumentam de acordo com o caráter hidrofílico da molécula (GRIFFIN, 1949; ZANIN et al., 2002).

O conhecimento dos valores de BHL permite predizer o tipo de comportamento do emulsificante, fornecendo, desta forma, orientação para suas aplicações práticas (Tabela 1).

Tabela 1 - Exemplos de balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) de surfactantes

Tipos de Emulsificantes	BHL
Emulsificantes hidrofílicos/lipofílicos	3 a 6
Molhantes	7 a 9
Antiespumantes	1,5 a 8
Emulsificantes lipofílicos/ hidrofílicos	8 a 18
Detergentes	13 a 15
Solubilizantes	15 a 18

Fonte: Zanin et al. (2002).

Existem três metodologias para a determinação do BHL de um emulsificante (ZANIN et al., 2002):

- 1) Método teórico: relacionando o BHL de um emulsificante com a sua estrutura molecular;
- 2) Método direto: comparando visualmente o comportamento do emulsificante com padrões de BHL conhecidos;
- 3) Método indireto: relacionando componentes físico-químicos mensuráveis com o BHL dos compostos.

Dentre os tipos de emulsificantes não iônicos utilizados no preparo de nanoemulsões para a indústria de alimentos, os monogliceridos e polisorbatos são os mais utilizados. No preparo de nanoemulsões O/A, precisa-se de emulsificantes com diâmetro da cabeça duas vezes menor do que o comprimento da cadeia carbonada para garantir que ele seja capaz de formar gotas com diâmetro menor do que 100 nm (TADROS et al., 2004; HERNÁNDEZ, 2009). Tadros et al. (2004) recomendam o uso de emulsificantes com BHL entre 8 e 17. Dentre eles, os Tweens, ou polisorbatos, são os mais utilizados na produção de micro e nanoemulsões O/A, em virtude, precisamente, do seu BHL estar entre 9,6 e 16,7 e da sua baixa toxicidade e potencial de irritação. Por outro lado, os Spans, ou ésteres do sorbitan, que têm valores BHL entre 1,8 e 8,6, são mais usados no preparo de emulsões de água-em-óleo (A/O)

(HERNÁNDEZ, 2009). Yuan et al. (2008a) identificaram que o Tween 20 tem maiores valores de BHL entre a série de emulsificantes Tweens, portanto, serve para produzir nanoemulsões O/A com menores tamanhos de gotas e uma distribuição de tamanho mais estreita, em comparação aos emulsificantes Tween 40, 60 ou 80.

2.2.2 Tecnologias de produção de nanoemulsões

Emulsões e nanoemulsões O/A podem ser preparadas utilizando os métodos de alta energia, de baixa energia e os combinados (KOROLEVA; YURTOV, 2012). Atualmente, os métodos de alta energia são os mais utilizados na indústria de alimentos e incluem agitação de alto cisalhamento, emulsificação por ultrassom, homogeneização por alta pressão, homogeneização por microfluidização e emulsificação por membranas. Os métodos de alta energia utilizam dispositivos mecânicos que geram forças intensas, cisalhamento causado pelo gradiente de velocidade, impacto por colisão ou cavitação por queda acentuada de pressão para romper e misturar as fases óleo e água (MCCLEMENTS, 2012). Por outro lado, os métodos de baixa energia dependem da formação espontânea de gotas de óleo na mistura emulsificante-óleo-água sob certas condições do sistema (MAYER; WEISS; MCCLEMENTS, 2013).

Os métodos de baixa energia mais utilizados incluem o método de emulsificação espontânea, de inversão de fases por temperatura, de inversão de fases por composição e o método de emulsão de fase invertida. Ao passo que os métodos combinados incluem agitação por alto cisalhamento para obter inicialmente emulsões convencionais que contêm substâncias especiais e uma difusão subsequente do emulsificante através da fronteira da interfase, que resulta na formação das nanoemulsões (MAYER; WEISS; MCCLEMENTS, 2013).

2.2.2.1 Métodos de emulsificação de alta energia

Os equipamentos utilizados nos métodos de emulsificação de alta energia permitem reduzir o tamanho das gotas da fase interna de uma emulsão à escala nanométrica, em razão, principalmente da aplicação de uma grande quantidade de energia, necessária para que ocorra a dispersão das gotas, especialmente em sistemas viscosos (Figura 4) (KOROLEVA; YURTOV, 2012).

Figura 4 - Representação esquemática dos métodos de emulsificação por alta energia. a) sistema *rotor-stator*; b) homogeneização de alta pressão; c) ultrassom; d) dispersão por membrana

Fonte: Koroleva e Yurtov (2012).

Dentre os equipamentos de homogeneização de alta pressão, encontra-se o microfluidizador. No microfluidizador, empregam-se pressões muito altas para forçar as correntes de fluxo da emulsão grossa através de microcanais até a área de colisão, o que gera uma ação de cisalhamento elevada e leva à formação de gotas em tamanho manométrico (Figura 5) (JAFARI; HE; BHANDARI, 2006). A técnica de homogeneização de alta pressão oferece um bom controle do tamanho das gotas, garantindo a estabilidade das nanoemulsões (TANG; SHRIDHARAN; SIVAKUMAR, 2013).

Figura 5 - Representação do processo de emulsificação no microfluidizador

Fonte: Yang et al. (2012).

O Microfluidizador M-110Y (*Microfluidizer*[®], Microfluidics Corp., Massachusetts, EUA) tem sido utilizado para o preparo de nanoemulsões, nanodispersões, microcápsulas, lipossomas e também para ruptura de células (Figura 6). Este equipamento inclui uma bomba pneumática, um filtro e uma câmara de interação e tem capacidade de trabalhar a pressões entre 20 e 150 MPa, temperatura de alimentação de -25 a 75 °C, fluxo entre 100 a 500 mL/min, volume de amostra a partir de 60 mL e vários ciclos de passagem da amostra (M-110Y MICROFLUIDIZER, 2014).

Figura 6 - Microfluidizador M-110Y

Fonte: Própria autoria.

O mecanismo de emulsificação na microfluidização baseia-se na combinação de cavitação e cisalhamento mecânico. Nesta técnica, tanto a pressão de homogeneização quanto o número de passagem da emulsão pelo microfluidizador têm um efeito considerável sobre o tamanho de partículas e a sua distribuição na nanoemulsão (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; QUINTANILLA-CARVAJAL et al., 2010).

Segundo Jafari, He e Bhandari (2006), a microfluidização é superior aos outros tipos de homogeneização convencional para o preparo de nanoemulsões, já que as distribuições de tamanhos de partículas produzidas são mais estreitas e o tamanho de gotas é menor do que aquele obtidos pelos outros métodos de homogeneização, conforme verificado por Pinnamaneni, Das e Das (2003), inclusive em baixas concentrações de emulsificantes. Jafari,

He e Bhandari (2006) testaram vários equipamentos para a emulsificação do D-limoneno e observaram que o melhor método de emulsificação foi a microfluidização, que permitiu obter menores tamanhos de gota (100 – 200 nm) nas emulsões contendo 20% do composto ativo, além de uma distribuição de tamanho de gota mais estreita.

Dias et al. (2014) prepararam nanoemulsões de óleo de copaíba utilizando misturas dos emulsificantes Tween 20 e Span 80, empregando um microfluidizador e observaram que as nanoemulsões resultantes apresentaram valores de tamanho de partícula entre 160 – 300 nm, potencial ξ entre -23 a -41 mV, valores menores que 0,2 para a polidispersidade, teor do composto ativo *β -caryophyllene* entre 72 e 100% e não se verificaram modificações visuais importantes na nanoemulsão durante 90 dias armazenada a 4 °C. Jo e Kwon (2014) empregaram o microfluidizador na elaboração de nanoemulsões de *β -caroteno*, como ingrediente ativo para alimentos líquidos, e observaram que o tamanho de partículas diminuiu de 416 a 97,2 nm com o aumento da pressão, número de ciclos e da concentração do emulsificante. Eles observaram ainda que as nanoemulsões apresentaram boa estabilidade física por aproximadamente 5 semanas, durante armazenamento a 25 °C.

Salvia-Trujillo et al. (2014) fizeram um estudo comparativo entre emulsões O/A incorporadas com diferentes óleos essenciais, preparadas com Ultra-Turrax (3400 rpm, 2 min) e nanoemulsões contendo os mesmos compostos lipofílicos, produzidas com um microfluidizador (150 MPa, 3 ciclos), utilizando o alginato de sódio como agente emulsificante. Esses autores verificaram que, após a microfluidização, o tamanho médio das gotas foi drasticamente reduzido na emulsão, atingindo-se valores entre 2 e 20 nm, que os valores de potencial ζ estiveram abaixo de -30 mV, que a viscosidade diminuiu significativamente e as nanoemulsões tornaram-se mais translúcidas. Jo et al. (2015) prepararam nanoemulsões O/A encapsulando trans-cinamaldeído utilizando um homogeneizador de alta velocidade (10000 rpm) e um microfluidizador (138 MPa) e estudaram suas propriedades físicas e antimicrobianas, para, posteriormente, incorporá-las em suco de melancia. Esses autores obtiveram nanoemulsões com tamanho de gota <200 nm, apresentando eficiência de encapsulação do cinamaldeído de 70% e efeito inibitório contra *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*.

Recentemente, muitos outros trabalhos têm sido publicados sobre a utilização da microfluidização como método de preparo de nanoemulsões O/A utilizando diversos componentes na fase oleosa e distintos tipos de emulsificantes e/ou condições de homogeneização, conforme pode-se observar na Tabela 2.

Tabela 2 - Exemplos de pesquisas sobre produção de nanoemulsão usando o microfluidizador

Fase oleosa	Emulsificante	Condições de homogeneização	Tamanho médio de gota	Referência
Óleo de canola + óleo de gengibre	Tween 20 + Span 80 (1:4) (5% m/m)	69 MPa, 3, 4 ou 6 ciclos	127 – 150 nm	Alexandre et al. (2016)
Óleo de milho	Alginato de sódio:Tween 20 (1:1) (1% m/m)	150 MPa, 5 ciclos	261 – 443 nm	Artiga-Artigas et al. (2017)
Triglicerídeo de cadeia média	Tween 80 (0,5 – 6% m/m)	62 – 131 MPa, 1 ciclo	110 – 230 nm	Bai e Mcclements (2016)
Triglicerídeo de cadeia média + cinamaldeído	Proteína de soro do leite (0,15 – 2% m/m)	62 MPa, 5 ciclos	120 – 300 nm	Chen et al. (2017)
Óleo de soja + rutina	Span 80 + Tween 80 (3:1) (5% m/m)	20 – 150 MPa, 3 ciclos	100 – 150 nm	Dammak e Sobral (2017)
Óleo de peixe	Goma de <i>Prosopis laevigata</i> (20% m/m)	35 – 207 MPa, 1 – 5 ciclos	125 nm – 1,9 µm	(García-Márquez et al. (2017)
Óleo de milho + β-caroteno	Isolado protéico de soro de leite ou saponinas ativas (0,1 – 3% m/m)	62 – 131 MPa, 1 ciclo	136 – 204 nm	Luo et al. (2017)
Óleo de canola + eugenol Triglicerídeo de cadeia média + eugenol	Amido modificado (2% m/m)	50 MPa por vários ciclos	301 – 313 nm	Majeed et al. (2016)
		100 MPa por vários ciclos	150 – 153 nm	Majeed et al. (2016)
óleo de palma com alto conteúdo oleico	Soro de leite: Tween 20 (1:1) (1 – 20% m/m)	69 – 138 MPa, 1 – 3 ciclos	163 nm – 2,3 µm	Ricaurte et al. (2016)
Óleo de palma com alto conteúdo oleico	Lecitina de soja (0 – 1% m/m)	55 – 138 MPa, 1 – 4 ciclos	153 nm – 1,2 µm	Ricaurte et al. (2018)
Óleo de peixe + Triglicerídeo de cadeia média Óleo de peixe + óleo de tomilho ou de limão	Tween 80 (0,5 – 2 % m/m)	138 MPa, 5 ciclos	80 – 165 nm	Walker et al. (2017)

Fonte: Própria Autoria.

O tamanho de gotas de nanoemulsões O/A produzidas por homogeneização de alta pressão pode, em princípio, ser reduzido ainda mais utilizando-se o método de emulsificação-evaporação do solvente (CHU et al., 2007; TAN; NAKAJIMA, 2005).

2.2.2.2 Método de emulsificação-evaporação

O método de emulsificação-evaporação consiste no preparo de uma nanoemulsão O/A inicialmente formada pela homogeneização de uma fase oleosa, contendo agentes ativos ou ingredientes alimentícios lipofílicos e um solvente orgânico, com uma fase aquosa contendo o emulsificante, e finalmente, a evaporação do solvente orgânico volátil sob vácuo para fazer com que as gotas de óleo diminuam de tamanho à escala nano (Figura 7) (LEE et al., 2011; MAO et al., 2010). Segundo Chu et al. (2007) e Tan e Nakajima (2005), as nanogotas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa, quando ele é evaporado na interfase água/ar.

Figura 7 - Representação esquemática do preparo de nanoemulsão O/A empregando o método de emulsificação-evaporação do solvente

Fonte: Adaptado de Troncoso, Aguilera e McClements (2012).

Segundo Anarjan et al. (2010), o método de emulsificação-evaporação é um dos mais populares no preparo de nanoemulsões de compostos e ingredientes funcionais lipossolúveis em água. Ele tem sido utilizado por Anarjan et al. (2010, 2011), Chu et al. (2007), Lee et al. (2011), Lee e McClements, (2010), Leong et al. (2011), Pooja et al. (2016), Tang, Shridharan e Sivakumar (2013) e Teo et al. (2017) para o preparo de nanodispersões, nanoemulsões, nanosuspensões e nanopartículas sólidas de lipídios contendo diversos compostos bioativos, aplicadas na indústria de alimentos ou farmacêutica.

Kwon et al. (2002) prepararam nanoemulsões carregadas com coenzima Q₁₀ pelo método de emulsificação-evaporação, empregando um microfluidizador e um rota-evaporador. A eficiência da nanoemulsão atingiu acima do 95% e o diâmetro médio das gotas se manteve na faixa de 40 – 260 nm, sendo influenciado pelo tipo de surfactante utilizado e pelo número de ciclos no processo de microfluidização. Tan e Nakajima (2005) produziram nanodispersões de β -caroteno pelo método de emulsificação-evaporação utilizando o microfluidizador, e observaram que tanto a pressão quanto o número de ciclos tiveram efeito ($p < 0,05$) sobre o diâmetro das gotas, atingindo valores de diâmetro médio de volume (D_{4,3}) na faixa 60 – 140 nm, enquanto a distribuição de tamanho de gotas foi monomodal e a estabilidade física do β -caroteno se manteve durante o armazenamento. Cheong et al. (2008) prepararam nanoemulsões de α -tocoferol usando o método de emulsificação-evaporação sob várias combinações dos parâmetros de processo e relações das fases aquosa e oleosa e obtiveram emulsões com gotas de diâmetro médio na faixa 90 – 120 nm, mantendo-se estáveis durante 3 meses. Anarjan et al. (2011) prepararam uma nanoemulsão de Astaxantina pelo método de emulsificação-evaporação, atingindo diâmetro de gotas na faixa 110 – 165 nm. Esses autores otimizaram as condições de processamento e identificaram que as nanoemulsões mais estáveis foram obtidas a 30 MPa e 3 ciclos de passagem pelo microfluidizador, seguido por uma rotaevaporação a 25 °C sob pressão reduzida.

Silva et al. (2011) produziram nanoemulsões de β -caroteno usando o método de emulsificação-evaporação, obtendo gotas com diâmetro médio de superfície (D_{3,2}) na faixa 9 – 280 nm. Os parâmetros tempo e taxa de cisalhamento na homogeneização foram os que mais afetaram ($p < 0,05$) o tamanho de partículas e a sua distribuição, assim como a estabilidade das nanoemulsões. Troncoso, Aguilera e McClements (2012) produziram nanoemulsões O/A utilizando a homogeneização de alta pressão e evaporação do solvente. Nesse estudo, esses autores avaliaram a influência da composição da fase dispersa (óleo de milho+hexano) sobre as propriedades físico-químicas e a digestão *in vitro* da nanoemulsão e concluíram que o

tamanho de partículas diminuiu de 86 para 30 nm, a distribuição do tamanho de gotas foi monomodal, o potencial ζ reduziu de -5 a -20 mV, com o incremento da concentração de hexano na fase oleosa, e a quantidade total de ácidos graxos livres liberados das nanoemulsões aumentou de 61 para 71%, assim como a sua taxa de digestão.

Recentemente, Pooja et al. (2016) utilizaram o método de emulsificação-evaporação para produzir nanopartículas lipídicas sólidas com três diferentes lipídios (monoestearato de glicerina, triestearina e tripalmitina), lecitina de soja e clorofórmio como solvente orgânico na fase oleosa e três diferentes emulsificantes (Tween 80, Poloxamer e poli(vinil álcool)). Esses autores observaram que tanto o tipo quanto a concentração de emulsificante afetaram o tamanho das nanopartículas, assim como a estabilidade das mesmas. As nanopartículas apresentaram valores de tamanho médio de entre 40 e 150 nm, de polidispersidade maior que 0,2 e de potencial ζ próximos de -30 mV, dependendo da formulação e as condições de processo utilizadas. Por outro lado, Teo et al. (2017) estudaram a cinética de estabilidade e a captação celular de luteína encapsulada em uma nanoemulsão preparada pelo método de emulsificação-evaporação. Esses autores obtiveram nanoemulsões com tamanhos de partículas (69 nm) inalterável durante 28 dias, estocadas a 5 e 20 °C, eficiência de encapsulação de 81% e alta captação celular de luteína pelas células de enterócitos Caco-2 do intestino.

2.2.3 Estabilidade da nanoemulsão

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis em virtude da energia livre positiva de Gibbs, associada à interfase óleo-água após a sua formação (Figura 8). Como regra geral, a tensão interfacial nos limites de fases nas nanoemulsões deve ser entre 1 – 10 mN.m⁻¹. A estabilidade cinética de uma nanoemulsão pode ser atribuída à presença de uma barreira energética entre dois níveis energéticos, isso é, uma energia de ativação (ΔG^*) que deve ser superada antes de se alcançar o estado mais favorável termodinamicamente. Uma nanoemulsão que é cineticamente estável deve ter uma energia de ativação significativamente maior do que a energia térmica do sistema (KOROLEVA; YURTOV, 2012).

Figura 8 - Estado cinético das nanoemulsões O/A associado à energia de ativação

Fonte: Hernández (2009).

A estabilidade de uma emulsão também está muito ligada ao potencial ζ da mesma, uma medida indireta da carga elétrica das partículas coloidais que indica o comportamento de estabilidade da dispersão quando eles ultrapassam ± 30 mV (JO; KWON, 2014). Espera-se que as nanoemulsões com valores superiores a $+30$ ou inferiores a -30 mV sejam altamente estáveis, uma vez que as nanogotas seriam suficientemente carregadas eletrostaticamente para provocarem forças repulsivas entre elas (HEURTAULT et al., 2003; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013).

Apesar do fato de as nanoemulsões O/A existirem em um estado termodinamicamente instável, elas permanecem cineticamente estáveis (metaestáveis) por meses ou inclusive anos (TADROS et al., 2004). Uma nanoemulsão cineticamente estável é aquela na qual não se apresentam mudanças marcadas na distribuição do tamanho das gotas, no seu estado de agregação ou no seu arranjo espacial na escala do tempo de observação (DICKINSON, 2003; HERNÁNDEZ, 2009). Dentre os principais fenômenos de instabilidade física ou química das nanoemulsões O/A encontram-se: cremeação/flotação, sedimentação, coalescência, floculação/aglomeração, maturação de Ostwald e inversão de fases (Figura 9).

Figura 9 - Fenômenos físicos e ou físico-químicos envolvidos na instabilidade de emulsões

Fonte: Lerche e Sobisch (2011).

2.2.3.1 Fenômeno de maturação de Ostwald

Em comparação com as emulsões convencionais, as nanoemulsões apresentam boa estabilidade contra a cremação, sedimentação, floculação e/ou coalescência, em decorrência do pequeno tamanho das gotas. A maturação de Ostwald é sempre o principal mecanismo de instabilidade das nanoemulsões (LIU et al., 2006).

A maturação de Ostwald ocorre em virtude da diferença no tamanho e a força motriz entre as gotas e da diferença do potencial químico entre as gotas da fase oleosa (LIFSHITZ; SLYOZOV, 1961; LI; CHIANG, 2012). Neste fenômeno, as gotas maiores crescem à custa das gotas menores por causa da difusão molecular da fase dispersa de uma gota à outra, através da fase contínua intermédia (MCCLEMENTS, 2004). O valor de maturação de Ostwald (ω) pode ser calculado pela teoria Lifshitz–Slezov–Wagner (eq. 1).

$$\omega = \frac{dr^3}{dt} = \frac{8}{9} \frac{C_{(\infty)} \gamma V_m D}{\rho R T} \quad \text{Eq. (1)}$$

Sendo, r , o raio médio das gotas, t , o tempo, $C_{(\infty)}$, a solubilidade das fases, γ , a tensão interfacial entre a fase dispersa e a fase contínua, V_m , o volume molar da fase dispersa, D , o

coeficiente de difusão das gotas dispersas na fase contínua, ρ , a densidade do óleo, R a constante dos universal dos gases e T , a temperatura absoluta (LIFSHITZ; SLYOZOV, 1961; LI; CHIANG, 2012).

No preparo de nanoemulsões O/A, é muito importante controlar o tamanho meio da gota e a polidispersidade, que é associada com a largura efetiva da distribuição da gota (HERNÁNDEZ, 2009). Além disso, devem-se escolher também emulsificantes e aditivos apropriados que possam impedir a aproximação das gotas, desacelerar a flocculação das mesmas na fase interna da nanoemulsão e evitar assim a maturação de Ostwald (LI; CHIANG, 2012).

2.2.3.2 Testes de medição da estabilidade e vida útil de nanoemulsões

De modo geral, existem duas abordagens para avaliar a estabilidade das nanoemulsões O/A. A primeira abordagem é a avaliação direta da homogeneidade das gotas dispersas. Isto pode ser feito pelo método simples chamado de “teste de tubo de ensaio”, observado a olho nu, ou quantificado por técnicas analíticas baseados em instrumentos de medições óticas, de raios X, acústicas, condutivas ou ressonância magnética nuclear, bem como instrumentos de digitalização, no caso de os instrumentos de medições não fornecerem resolução espacial. Porém, uma desvantagem dessas técnicas é que não registram simultaneamente os perfis de concentração de partículas dispersas para toda a altura da amostra durante um determinado tempo, portanto, não medem a influência do tempo sobre as dispersões, especialmente no caso de nanoemulsões bastante estáveis (CHIU et al., 2011; LERCHE; SOBISCH, 2011).

A segunda abordagem utiliza métodos analíticos que permitem acompanhar a evolução de propriedades de uma pequena amostra de nanoemulsão no tempo. Dentre as propriedades de interesse nessa abordagem está a velocidade de cremação, que pode ser correlacionada com a vida útil da dispersão, bem como outras medidas físicas indiretas, como a distribuição de tamanho de partícula, a diferença de densidade entre fase contínua e dispersa, a viscosidade da fase contínua, a quantidade de moléculas adsorvidas na superfície da partícula, o potencial eletrostático das partículas, a mobilidade eletroforética e/ou o comportamento reológico da dispersão, que frequentemente são usados como indicadores de estabilidade de dispersões. Porém, a previsão de estabilidade de uma nova formulação baseada apenas, por exemplo, no tamanho de partícula ou no potencial zeta pode levar a previsões falsas positivas ou falsas negativas (LERCHE; SOBISCH, 2011).

A partir dessas questões, surge a necessidade de utilizar testes de estabilidade acelerados com o uso, por exemplo, de centrífugas analíticas que utilizam campo centrífugo para acelerar

a ocorrência de fenômenos de instabilidade (cremeação ou sedimentação) e permitir a obtenção de resultados em minutos ou horas que originalmente poderiam ser obtidos em dias ou meses em testes sob força gravitacional terrestre (CHIU et al., 2011; LERCHE, 2002). Dentre as fotocentrífugas analíticas mais utilizadas para analisar a estabilidade e vida útil de uma nanoemulsão, encontram-se as LUMiSizer® (L.U.M. GmbH, Berlin, Alemanha), um novo instrumento multi-amostra, com controle de temperatura, e desenhado para medir a intensidade da luz próxima ao infravermelho (865 nm), transmitida paralelamente através da amostra em determinados intervalos de tempo (Figura 10). A evolução dos perfis de transmissão é exibida pelo software do equipamento como uma função da posição radial e da distância do centro de rotação, no tempo (Figura 11). Esses perfis de transmissão contêm informação sobre a cinética das mudanças de concentração em decorrência da separação de fases e permitem a caracterização de partículas, bem como a avaliação de interações entre elas (DAMMAK; SOBRAL, 2017; XU et al., 2012). A vida útil de nanoemulsões O/A no LUMiSizer® é determinada com os dados compilados da velocidade de sedimentação ou cremeação, determinada sob condições de gravidade ou extrapolados a partir de um teste realizado sob maiores forças de centrifugação relativas (RCF) (MERT, 2012).

Figura 10 - Princípio de medição do equipamento LUMiSizer®

Fonte: Chiu et al. (2011).

Chiu et al. (2011), Dammak e Sobral (2017), Lerche e Sobisch (2011), Maher et al. (2011), Mert (2012) e Sobisch e Lerche (2015) têm utilizado o LUMiSizer® para estudar a estabilidade e vida útil de dispersões, entre elas nanoemulsões O/A (Figura 11).

Figura 11 - Perfis de transmissão para uma nanoemulsão O/A indicando a taxa de cremação em função da força centrífuga relativa (RCF) aplicada

Fonte: Dammak e Sobral (2017).

2.3 Biopolímeros

Biopolímeros são macromoléculas de origem biológica, normalmente, proteínas ou polissacarídeos. Eles podem ser produzidos a partir de várias fontes naturais renováveis, como milho, celulose, amidos, cana-de-açúcar, alginatos, pectinas etc., ou serem sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas como o ácido butírico ou o ácido valérico, dando origem ao polihidroxibutirato (PHB) e ao polihidroxibutirato-*co*-valerato (PHB-HV), respectivamente, ou até mesmo serem derivados de fonte animal, como a quitina/quitosana ou colágeno/gelatina (Figura 12) (MOHANTY et al., 2005; RAY; BOUSMINA, 2005).

Apesar das grandes vantagens ambientais dos biopolímeros frente aos polímeros sintéticos, os primeiros possuem algumas limitações técnicas que tornam difícil sua processabilidade e seu uso como produto final. Portanto, muitas pesquisas vêm focando no estudo da melhoria das propriedades dos materiais a base desses biopolímeros para viabilizar o processamento e seu uso em diversas aplicações (BRITO et al., 2011). Para isso, blends

(BENBETTAÏEB et al., 2014; GÓMEZ-ESTACA et al., 2011; JRIDI et al., 2014; RUI et al., 2017), compósitos (CHEN; WANG, 2002; NIEDDU et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2016), nanocompósitos (ALBOOFETILEH et al., 2014; ALEXANDRE et al., 2016; FLAKER et al., 2015; VALENCIA et al., 2016), etc., têm sido estudados com o intuito de melhorar propriedades, como processabilidade, resistência térmica, propriedades reológicas e mecânicas, permeabilidade a gases e taxa de degradação.

Figura 12 - Classificação dos biopolímeros de acordo com sua fonte de obtenção

Fonte: Adaptado de Brito et al. (2011).

2.3.1 Gelatina

A gelatina é uma proteína abundante, biodegradável, biocompatível, de baixo custo, que tem a capacidade de formar gel termo-reversível após ser aquecida e tem uma ampla gama de propriedades funcionais e aplicações, incluindo a capacidade de formação de filmes com boas propriedades mecânicas e de barreiras a aromas e gases (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2007; GÓMEZ-ESTACA et al., 2011), para uso na indústria de alimentos ou na medicina, como expansor de plasma, curativo, adesivo e liberação controlada de medicamentos (AVENA-BUSTILLOS et al., 2011).

Este biopolímero é um polipeptídeo de elevado peso molecular obtido por hidrólise controlada (ácida ou alcalina) do colágeno proveniente de peles, ossos, tendões e cartilagens de bovinos, suínos e de peixes. Ele é rico nos aminoácidos glicina (27%), hidroxiprolina e prolina

(25%), tendo mais 17 aminoácidos que incluem: a alanina, o ácido glutâmico, a arginina, o ácido aspártico e a lisina (KAVOOSI et al., 2013; WANG et al., 2009).

A gelatina tem sido relatada como um dos primeiros materiais usados para carregar compostos bioativos (GENNADIOS et al., 1994). O aprimoramento de filmes de gelatina com substâncias antimicrobianas e/ou antioxidantes naturais amplia as propriedades funcionais desses filmes e fornece biomaterial de embalagem ativa (KAVOOSI et al., 2013). Contudo, apesar do melhoramento das propriedades ativas, os filmes de gelatina apresentam uma elevada capacidade de absorção de umidade, solubilidade e inchamento, em razão da natureza hidrofílica das moléculas da proteína (MA et al., 2012; WANG et al., 2009). Assim, o emprego de agentes ativos lipossolúveis nanoemulsificados na produção de filmes à base de gelatina pode contribuir na redução da sensibilidade do material ao vapor de água, além de implicar no desenvolvimento de filme ativo. Mais detalhes podem ser obtidos em revisões publicadas sobre a gelatina e sobre filmes à base de gelatina (ARVANITOYANNIS, 2002; GENNADIOS et al., 1994; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2009; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; TORRES, 1994; VEIS, 1964).

Filmes e revestimentos preparados à base de gelatina tem sido amplamente estudado (ANDRADE et al., 2014; ANDREUCCETTI et al., 2011; BERGO; SOBRAL, 2007; DE CARVALHO; GROSSO, 2006; LIMPISOPHON et al., 2009; SOBRAL et al., 2001). Porém, estes materiais apresentam uma elevada absorção de umidade, devido à natureza hidrofílica das suas moléculas proteicas e em muitas aplicações de alimentos, é desejável filmes com uma melhor barreira ao vapor de água para evitar a degradação da textura, por exemplo, em alimentos de baixa umidade e minimizar as reações de deterioração causados pela oxidação lipídica e o crescimento microbiano (PRODPRAN; BENJAKUL; ARTHARN, 2007).

2.3.2 *Quitosana*

A quitosana é um biopolímero obtido por desacetilação da quitina em meio alcalino, que consiste em unidades de β -(1-4)-2-acetamido-D-glicose e β -(1-4)-2-amino-D-glicose, com a última geralmente excedendo 60% (Figura 13), caracterizada por seu grau de desacetilação e peso molecular. A quitosana tem relativa importância tecnológica devido à sua propriedade antimicrobiana em conjunto com a sua força cátion e capacidade de formação de filme (ELSABEE; ABDOL, 2013).

Figura 13 - Estrutura molecular da quitosana

Fonte: De Azeredo (2013).

A quitosana é considerada um biopolímero ideal para a produção de filmes ativos por causa da sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade, efeito antimicrobiano e capacidade de formar filme (DUTTA et al., 2009). Embora a quitosana seja um biopolímero promissor para embalagens de alimentos, ela não possui atividade antioxidante significativa (RUIZ-NAVAJAS, 2013; WANG et al., 2013) portanto, a melhora da atividade antioxidante dos filmes de quitosana pode expandir suas aplicações como embalagem ativa de alimentos.

Segundo Kim et al. (2003) e Liu et al. (2004), as propriedades antimicrobianas da quitosana originam-se da sua natureza policatiônica, já que a potencial interação do grupo amino protonado (NH_2) da quitosana com os componentes aniônicos da superfície bacteriana (lipopolissacarídeos, proteínas) pode provocar um rompimento da integridade da membrana externa celular, resultando na perda da função de barreira. O número de grupos amino protonados (NH_2) presente na quitosana aumenta com o aumento do grau de desacetilação, o que influencia à atividade antimicrobiana da quitosana (ELSABEE; ABDOL, 2013; LIU et al., 2004). Maiores detalhes podem ser obtidos em revisões publicadas sobre a quitosana e sobre filmes ou revestimentos à base de quitosana (AIDER, 2010; ELSABEE; ABDOL, 2013; KERCH, 2015; NISPEROS-CARRIEDO, 1994; YUAN; CHEN; LI, 2016).

Filmes à base de quitosana têm sido amplamente descritos com propriedades antifúngica e antibacteriana que os qualificam na proteção de alimentos (JRIDI et al., 2014; KIM et al., 2003; NOWZARI; SHÁBANPOUR; OJAGH, 2013; QIN et al., 2006; VÁSCONEZ et al., 2009). Contudo, suas fracas propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água e aos gases limitam seu uso (ELSABEE; ABDOL, 2013).

2.3.3 *Blendas de biopolímeros*

As características dos filmes preparados à base de biopolímeros são determinadas principalmente pela natureza química de cada biopolímero. No entanto, uma boa alternativa para se melhorar suas propriedades físicas, mecânicas e de barreira, é através de blendas de

proteínas, por exemplo a gelatina, com polissacarídeos, por exemplo a quitosana (ELSABEE; ABDOU, 2013).

Filmes à base de blenda gelatina-quitosana (G-Q) têm sido amplamente caracterizados como homogêneos em virtude da boa miscibilidade e compatibilidade entre ambos biopolímeros, o que deve implicar no melhoramento das propriedades físico-químicas, térmicas, mecânicas, estruturais, de permeabilidade à água e gases e antimicrobianas de filmes à base da mistura, quando comparadas com aquelas obtidas nos filmes à base dos biopolímeros puros (ELSABEE; ABDOU, 2013). Ahmed e Ikram (2016), Arvanitoyannis; Nakayama e Aiba (1998), Benbettaïeb et al. (2014), Gómez-Estaca et al. (2011), Hosseini et al. (2013), Nowzari; Shábanpour e Ojagh (2013), Pereda et al. (2011) e Rivero, García e Pinotti (2009) produziram filmes à base de blenda gelatina-quitosana conseguindo melhoras graças à afinidade dos biopolímeros, os quais, além de formar ligações de hidrogênio, formam também interações eletrostáticas entre os grupos amônia ($-\text{NH}_3^+$), carregados positivamente da quitosana e os grupos carboxila ($-\text{COO}^-$) ou resíduos de aminoácidos (glutâmico e aspártico) carregados negativamente, da gelatina (HAIDER; PARK; LEE, 2008).

Enquanto a blenda G-Q fornece a matriz de suporte, compostos lipofílicos, como óleos essenciais, podem contribuir para uma boa barreira ao vapor de água dos filmes à base dessa mistura, além de melhorar as propriedades ativas deles (ELSABEE; ABDOU, 2013). Nos últimos anos, a blenda gelatina/quitosana tem sido muito utilizada também na produção de *Scaffolds* e bicamadas para aplicações biomédicas (BADHE et al., 2017; CHOI et al., 2018; LÓPEZ; SOBRAL, 2016; MAJI et al., 2018).

2.4 Embalagens ativas

Embalagens ativas são aquelas que contêm componentes ativos incorporados deliberadamente para, de forma controlada, liberar/absorver substâncias para/do alimento ou do meio que rodeia o alimento, visando estender a vida útil, melhorar as propriedades sensoriais e/ou garantir a segurança microbiana do alimento que contém (AHVENAINEN, 2003; DAINELLI et al., 2008; FANG et al., 2017).

A seleção de um agente ativo para a incorporação em uma embalagem ativa depende, principalmente, de fatores como: atividade específica (antimicrobiano/antioxidante), resistência dos microrganismos, mecanismos de liberação controlada, natureza química dos alimentos e do agente ativo, condições de armazenamento e distribuição do produto embalado, condições do processo de filme/recipiente, propriedades físicas e mecânicas dos materiais de embalagem, características organolépticas e toxicidade do agente ativo e, ainda, regulamentos

correspondentes (COMA, 2008). Todos esses fatores devem ser cuidadosamente considerados a fim de projetar sistemas de embalagem ativa eficazes.

2.4.1 Filmes ativos

Os filmes ativos são produzidos pela adição, na sua formulação, de certos agentes bioativos, como extratos de plantas, óleos essenciais, carotenoides, flavonoides (ex.: rutina), enzimas, bacteriocinas (ex.: nisina, pediocina, etc.), ou outros compostos com funções ativas que lhe aportam propriedades de interesse e que são gradualmente liberados desde o filme até a superfície do alimento em contato (COMA, 2008; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2013). Mais detalhes sobre filmes ativas à base de biopolímeros podem ser obtidos na revisão publicada por López-Rubio et al. (2004).

Nos últimos anos, os filmes ativos têm atraído muito a atenção da indústria alimentícia em razão do aumento na demanda dos consumidores por produtos minimamente processados e sem conservantes (SADAKA et al., 2013). Nesta tese, as atividades de interesse dos filmes são a antimicrobiana e a antioxidante.

Um filme com atividade antimicrobiana pode aumentar a vida útil dos produtos e garantir segurança do alimento aos consumidores. Sua função é reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microorganismos patogênicos ou deteriorantes nos alimentos embalados (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; REYES, 2017). Alguns biopolímeros são inerentemente antimicrobianos por causa da estrutura específica deles, como quitosana, poli-L-lisina e alginato de cálcio (BALAGUER; GAVARA; HERNÁNDEZ, 2012; HAFDANI; SADEGHINIA, 2011; OUATTARA et al., 2000; SADAKA et al., 2013). Portanto, os filmes produzidos usando estes biopolímeros podem ser classificados como antimicrobianos. No mesmo sentido filmes à base de polímeros sintéticos incorporados com agentes antimicrobianos e obtidos por co-extrusão, eletrofiação ou *casting*, também podem ser considerados antimicrobianos (SUNG et al., 2013).

De acordo com Cooksey (2001), existem três categorias básicas de embalagens antimicrobianas: 1) Incorporação do agente antimicrobiano dentro de sachês colados na embalagem, a partir dos quais as substâncias bioativas voláteis são liberadas durante o armazenamento do produto (OTONI et al., 2016a). 2) Incorporação direta do antimicrobiano na embalagem (SUNG et al., 2013). 3) Revestimento da embalagem com uma matriz que atua como carregador do agente antimicrobiano (FANG et al., 2017). Essa matriz pode ser um filme plástico ou outro material seguro para o alimento, como cera ou polissacarídeos incorporados com o antimicrobiano e revestidos diretamente sobre o alimento (ARFA et al., 2007;

ECHEGOYEN; NERÍN, 2015; RIZZOLO et al., 2016). Todas essas categorias de embalagem podem liberar gradualmente os agentes bioativos na superfície do alimento para inibir o crescimento de microrganismos (COMA, 2008).

Filmes com atividade antioxidante também podem ser usados no desenvolvimento de embalagens ativas, já que o agente antioxidante pode ser intimamente misturado com o material de embalagem (biopolímeros), uma vez que sejam aditivos alimentares e cumpram com os regulamentos estabelecidos em termos da concentração máxima permitida. A mistura do agente antioxidante com a matriz polimérica pode ser feita de três diferentes formas: 1) dissolvendo o biopolímero e o agente ativo em um solvente apropriado e posteriormente aplicando a solução ativa sobre um substrato usando a tecnologia de revestimento; 2) incorporando/misturando o agente ativo dentro do biopolímero fundido, usando a tecnologia de extrusão, ou 3) imobilizando o agente antioxidante na superfície do filme (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014), para que ele ou suas substâncias reativas migrem até o alimento e evitem reações de oxidação ou deterioração no produto alimentício (FANG et al., 2017).

Um grande número de agentes antimicrobianos, incluindo etanol, dióxido de carbono, íons de prata, dióxido de cloro, antibióticos, bacteriocinas, ácidos orgânicos, peptídeos, óleos essenciais e extratos de especiarias têm sido testado em filmes com o objetivo de inibir o crescimento de microrganismos em alimentos. Da mesma forma, antioxidantes naturais como tocoferóis, carotenoides, óleos essenciais e extratos vegetais de alecrim, orégano e chá, entre outros, têm sido comumente usados na produção de filmes ativos (FANG et al., 2017).

Dentre os agentes antimicrobianos/antioxidantes mais empregados na elaboração de filmes ativos, encontram-se os óleos essenciais. Porém, eles são de natureza hidrofóbica. Os óleos essenciais geralmente são incorporados de forma direta ou nanoemulsificados em filmes à base de biopolímeros (TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2013). Diversas pesquisas têm sido realizadas sobre filmes à base de biopolímeros adicionados de substâncias ativas de caráter lipofílico, sem necessariamente envolver a tecnologia de nanoemulsões. Essas pesquisas estiveram focadas principalmente na avaliação de propriedades físicas, ópticas e mecânicas, além de melhoramento da natureza ativa do filme (FABRA et al., 2011; MA et al., 2012; PEREDA; ARANGUREN; MARCOVICH, 2010). No entanto, pesquisas feitas sobre filmes de biopolímeros incorporados com agentes ativos lipossolúveis nanoemulsificados, tais como cinamaldeído, óleo essencial de alho e/ou α -tocoferol, são muito limitadas.

Na Tabela 3 se apresentam alguns exemplos de pesquisas realizadas sobre filmes à base de gelatina e/ou quitosana, incorporados com diferentes agentes ativos nanoemulsificados, ou não.

Tabela 3 - Exemplos de filmes à base de gelatina (G), quitosana (Q), ou da blenda gelatina-quitosana, incorporados com agentes ativos, nanoemulsificados (NE) ou não

Continua...

Biopolímero	Agente ativo	Propriedade	Referência
Quitosana	- Óleo essencial de alecrim (NE)	- Antimicrobiano contra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Escherichia coli</i> - Atividade antioxidante	Abdollahi, Rezaei e Farzi (2012)
Gelatina	Óleo essencial de <i>Morinda citrifolia</i>	- Atividade antioxidante	Adilah e Hanani (2016)
Gelatina	Óleo essencial de Bergamot e erva-cidreira	- Antimicrobiano contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	Ahmad et al. (2012)
Gelatina	- Óleo essencial de gengibre (NE)	- Atividade antioxidante	Alexandre et al. (2016)
Gelatina/proteína isolada de peixe	- Óleo essencial de manjerição - Óxido de zinco	- Antimicrobiano contra <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Arfat et al. (2014)
Gelatina/quitosana	- Ácido ferúlico - Ácido cafeico	- Atividade antioxidante	Benbettaieb et al. (2018)
Gelatina	Extrato etanólico de Curcuma	- Atividade antioxidante	Bitencourt et al. (2014)
Gelatina	Extrato etanólico de própolis	- Antimicrobiano contra <i>Staphylococcus aureus</i>	Bodini et al. (2013)
Gelatina/Quitosana	Extratos etanólicos de canela, guarana, alecrim e boldo-do-chile	- Antimicrobiano contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> - Atividade antioxidante	Bonilla e Sobral (2016)
Quitosana	Cinamaldeído (NE)	- Antibacteriano contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> e antifúngico contra <i>Candida albicans</i>	Chen et al. (2016)
Gelatina	Antimicrobianos comerciais Artemix Consa 152/NL e octanoato de sódio	- Antibacteriano contra <i>E. coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> e a microflora aeróbica e anaeróbica de carne	Clarke et al. (2016)

Tabela 3 - Exemplos de filmes à base de gelatina (G), quitosana (Q), ou da blenda gelatina-quitosana, incorporados com agentes ativos, nanoemulsificados (NE) ou não

Continuação...

Biopolímero	Agente ativo	Propriedade	Referência
Gelatina	Óleos essenciais de cânhamo e sálvia	- Antibacteriano contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Listeria innocua</i> e antifúngico contra <i>Penicillium expansum</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cozmata et al. (2015)
Gelatina	Rutina (NE)	- Atividade antioxidante	Dammak et al. (2017a)
Quitosana	Extrato aquoso, cera e óleo de bagaço de uva	- Atividade antioxidante	Ferreira et al. (2014)
Gelatina	- Extrato de borragem - α -tocoferol - BHT	- Atividade antioxidante	Gómez-Estaca et al. (2009a)
Gelatina	Extratos de orégano e alecrim	- Atividade antioxidante	Gómez-Estaca et al. (2009b)
Gelatina/Quitosana	Óleos essenciais de cravo, alecrim, tomilho, e lavanda	-Antimicrobiano contra <i>E. coli</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Listeria innocua</i> <i>P. fluorescens</i> e <i>Shewanella putrefaciens</i>	Gómez-Estaca et al. (2010)
Gelatina	Extrato aquoso de dois tipos de folhas de murta	- Atividade antioxidante	Gómez-Guillén et al. (2007)
Quitosana	Óleo essencial de eucalipto	- Antibacteriano contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> antifúngico contra <i>C. albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i> - Atividade antioxidante	Hafsa et al. (2016)
Gelatina/Quitosana	Óleo essencial de orégano encapsulado em nanopartículas de quitosana	- Antimicrobiano contra <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Salmonella enteritidis</i>	Hosseini et al. (2016)
Quitosana	- Óleo essencial de alcaravia - Cera de abelha	- Antimicrobiano contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> - Atividade antioxidante	Hromiš et al. (2015)
Gelatina	- α -tocoferol - Hidroxitolueno butilado (BHT)	- Atividade antioxidante	Jongjareonrak et al. (2008)

Tabela 3 - Exemplos de filmes à base de gelatina (G), quitosana (Q), ou da blenda gelatina-quitosana, incorporados com agentes ativos, nanoemulsificados (NE) ou não

Continuação...

Biopolímero	Agente ativo	Propriedade	Referência
Gelatina	- Carvacrol - Óleo essencial de <i>Zataria multiflora</i>	- Antimicrobiano contra <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i> - Atividade antioxidante	Kavoosi et al. (2013, 2014)
Gelatina	- Extratos de chá verde, gengibre e folha de ginkgo - Proantocianidinas e polifenóis de extrato de semente de uva	- Atividade antioxidante	Li et al. (2014)
Gelatina	Polifenóis de chá encapsulados em nanopartículas de quitosana	- Atividade antioxidante	Liu et al. (2015)
Gelatina	Boldina	- Atividade antioxidante	López et al. (2017)
Quitosana	Carvacrol	- Antimicrobiano contra <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Escherichia coli</i> O157:H7 - Atividade antioxidante - Efeito protetor contra a hemólise de eritrócitos	López-Mata et al. (2013)
Quitosana	α -tocoferol	- Atividade antioxidante	Martins et al. (2012)
Gelatina	Óleos essenciais de orégano e lavanda	- Antimicrobiano contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> - Atividade antioxidante	Martucci et al. (2015)
Quitosana	- Óleo essencial de <i>Zataria multiflora</i> - Extrato de semente de uva	- Atividade antioxidante - Alto teor de compostos fenólicos	Moradi et al. (2012)
Gelatina	Lignina	- Atividade antioxidante	Núñez-Flores et al. (2013)
Quitosana	Óleos essenciais de limão, tomilho e canela	- Antimicrobiano contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Peng e Li (2014)
Quitosana	Óleo essenciais de folha de canela, manjerição e tomilho	- Antifúngico contra <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> - Atividade antioxidante	Perdones et al. (2014, 2016)

Tabela 3 - Exemplos de filmes à base de gelatina (G), quitosana (Q), ou da blenda gelatina-quitosana, incorporados com agentes ativos, nanoemulsificados (NE) ou não

Continuação...			
Biopolímero	Agente ativo	Propriedade	Referência
Quitosana	Oleoresina de azeitona, alecrim, alho, pimenta, arando, cebola, oregano e oregano + carvacrol	- Antimicrobiano contra <i>L. monocytogenes</i> e a flora nativa de abobora - Atividade antioxidante	Ponce et al. (2008)
Quitosana	- Óleo essencial de alho - Sorbato de potássio - Nisina	- Antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Pranoto, Rakshit e Salokhe (2005)
Gelatina/Quitosana	Ácido gálico	- Antimicrobiano contra <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , e <i>S. aureus</i> - Atividade antioxidante	Rui et al. (2017)
Quitosana	Óleos essenciais de <i>Thymus moroderi</i> e <i>Thymus piperella</i>	- Antimicrobiano contra <i>Serratia marcescens</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Achromobacter denitrificans</i> e <i>Alcaligenes faecalis</i> - Atividade antioxidante	Ruiz-Navajas et al. (2013)
Gelatina e Quitosana	- Óleo essencial de <i>Ziziphora clinopodioides</i> - Extrato etanólico de semente de uva vermelha	- Antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. typhimurium</i> e <i>E. coli</i> O157:H7 - Atividade antioxidante - Alto teor de compostos fenólicos	Shahbazi (2017)
Quitosana	Extrato aquoso de chá verde	- Atividade antioxidante - Alto teor de compostos fenólicos	Siripatrawan e Harte (2010)
Quitosana	Extrato de própolis	- Antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Salmonella enteritidis</i> - Atividade antioxidante - Alto teor de compostos fenólicos	Siripatrawan e Vitchayakitti (2016)
Quitosana	Quercetina	- Antimicrobiano contra <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Morganella morganii</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> - Atividade antioxidante	Souza et al. (2015)

Tabela 3 - Exemplos de filmes à base de gelatina (G), quitosana (Q), ou da blenda gelatina-quitosana, incorporados com agentes ativos, nanoemulsificados (NE) ou não

<i>Conclusão...</i>			
Biopolímero	Agente ativo	Propriedade	Referência
Quitosana	Polifenóis da casca de maçã	- Antibacteriano contra <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> e antifúngico contra <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Colletotrichum fructicola</i> e <i>Botryosphaeria dothidea</i>	Sun et al. (2017)
Quitosana	Polifenóis de extratos de tomilho	- Atividade antioxidante	Talón et al. (2017)
Gelatina	Óleos essenciais de lima bergamota, limão kaffir, gengibre, açafrão, <i>plai</i> e manjeriço	- Atividade antioxidante - Alta atividade quelante	Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2012, 2013, 2014a,b)
Quitosana	Polifenóis de chá	- Atividade antioxidante	Wang et al. (2013)
Gelatina	Extrato de chá verde	- Atividade antioxidante - Alto teor de fenólicos	Wu et al. (2013)
Gelatina/quitosana	Óleo essencial de orégano	- Antimicrobiano contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. enteritidis</i>	Wu et al. (2014)
Gelatina	Óleo essencial de canela em nanolipossomas	- Antibacteriano contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> e antifúngico contra <i>Aspergillus niger</i>	Wu et al. (2015)
Quitosana	- Carvacrol - Extrato de casca de romã	- Antimicrobiano contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> - Atividade antioxidante - Alto teor de fenólicos	Yuan et al. (2015)

Fonte: Própria autoria.

2.4.2 Interação embalagem ativa-alimento

As interações de embalagens-alimentos podem ser definidas como uma interação entre produto, embalagem e ambiente, que se referem à troca de massa e energia entre os três meios e podem ser classificados em três fenômenos principais: migração, permeabilidade e sorção (SADAKA et al., 2013). Um dos maiores desafios da ciência de embalagens de alimentos é o monitoramento de compostos que migram dos materiais de embalagem aos alimentos, por conta da sua possível toxicidade (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Entretanto, no caso de embalagens ativas, essa migração pode ser interessante, mas deve ser controlada, para garantir maior tempo de conservação.

Os parâmetros que determinam as interações embalagem ativa-alimento em um determinado sistema de embalagem/alimento são (BART, 2006):

- Cinética: Difusão do componente migrante na matriz polimérica e no alimento (coeficiente de difusão “D”);
- Termodinâmica: Equilíbrio, com conhecimento do coeficiente de partição entre a embalagem e o alimento (coeficiente de partição “K”);
- Dimensões geométricas.

Um dos mecanismos de ação da embalagem ativa, principalmente com atividades antioxidante e/ou antimicrobiana, é a migração do agente ativo da embalagem para o alimento por contato direto para exercer a sua função, ou seja, a interação embalagem ativa-alimento sempre é desejada (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017; TIAN; DECKER; GODDARD, 2013).

A quantidade de substância migrada é fortemente controlada pelos coeficientes de difusão (D) e de partição (K). No caso de filmes ativos, os coeficientes estão diretamente ligados à composição do alimento, à capacidade de hidratação do filme, à mobilidade das moléculas dos agentes ativos e à espessura do filme (HUANG et al., 2013; KUORWEL et al., 2013).

O potencial de migração dos agentes ativos, que migram da embalagem, pode ser acessado através dos testes de migração. Entre os testes de migração, encontram-se o teste de migração global e o teste de migração específica. A migração global refere-se à quantidade total de todas as substâncias transferidas da embalagem para o alimento embalado, enquanto a migração específica faz referência à transferência de uma ou várias substâncias identificáveis. Em ambos os casos, a migração tem de ser determinada para cada material de embalagem destinado a entrar em contato com o alimento (TOVAR et al., 2005) e os valores medidos não podem exceder certos limites estabelecidos nos regulamentos EN 1186-1:2002 e EN 13130-1:2005 para garantir a proteção da saúde dos consumidores e evitar alterações no produto alimentício. Por exemplo, o limite para a migração global de material polimérico é de 60 mg de substância/kg de alimento ou simulador e o limite para a migração específica é fixado com base na avaliação toxicológica da substância migrante. Esse último limite é geralmente estabelecido de acordo com a ingestão diária aceitável, definido pelo comitê científico de alimentação humana como uma quantidade que não constitui um risco para a saúde (SADAKA et al., 2013). Entretanto, deve-se observar que não existem normas específicas para migração de componentes bioativos de embalagens ativas.

Uma medida real da migração do agente ativo para o alimento é particularmente difícil porque a maioria dos alimentos são compostos de uma mistura de substâncias como água, carboidratos, gorduras, lipídios, proteínas, vitaminas, fibras e minerais. Assim, os estudos de migração são geralmente realizados usando simuladores de alimentos (CRAN et al., 2010; SADAKA et al., 2013). A União Europeia publicou uma série de diretrizes onde se estabeleceram as regras básicas para o ensaio de migração de materiais de embalagem destinados a entrar em contacto com diferentes produtos alimentícios *Council of the European Union* (1982), e a lista de simuladores que poderiam substituir os alimentos reais nos testes de migração *Council of the European Union* (1985), além das condições do teste e os métodos de ensaio a utilizar para testar a migração global e específica dos componentes do material da embalagem (EN 1186-1:2002; EN 13130-1:2005). Os simuladores definidos para os testes de migração são (SADAKA et al., 2013):

- A: Água destilada: usada para alimentos aquosos com um valor de $\text{pH} > 4,5$;
- B: Solução de ácido acético (3% m/v): utilizada para alimentos aquosos com um valor de $\text{pH} < 4,5$;
- C: Solução aquosa de etanol (10% v/v)*: Usada para alimentos com teor alcoólico entre 5 e 10%;
- D: Solução aquosa de etanol (50% v/v): Usada como simulador de alimentos gordurosos;
- E: Azeite de oliva, isooctano ou solução aquosa de etanol (95% v/v): Usados também como simulador de alimentos gordurosos.

* Nota: para líquidos ou bebidas com teor alcoólico maior que 10%, o teste deve ser realizado com um simulador aquoso de etanol com o mesmo grau alcoólico.

Encontram-se na literatura, diversas pesquisas envolvendo a migração global (ÚBEDA et al., 2017) ou a migração específica de diversos agentes ativos incorporados em filmes à base de polímeros sintéticos ou biopolímeros (ARANCIBIA et al., 2014; BENBETTAÏEB et al., 2016; COLÍN-CHÁVEZ et al., 2013; GIMÉNEZ et al., 2013; HWANG et al., 2013; KUORWEL et al., 2013; LIU et al., 2017; MANZANAREZ-LÓPEZ et al., 2011; RAMOS et al., 2014; ZHU et al., 2013) para os simuladores de alimentos mencionados anteriormente, sob diferentes condições de ensaio.

2.5 Aplicação de filmes ativos em produtos cárneos

O processamento térmico em produtos cárneos cozidos, tais como mortadela, salsicha, presunto, etc., reduz o número de bactérias de caráter patogênico e deteriorante presentes a um nível que garante a segurança e a estabilidade do produto. Porém, contaminações cruzadas podem ocorrer durante a manipulação, como o fatiamento e subsequente embalagem do produto (CORREA et al., 2017; DUŠKOVÁ et al., 2016). O propósito de incorporar os agentes ativos nos filmes, em vez de aplicá-los diretamente sobre a superfície do alimento, é prolongar a sua migração durante o armazenamento, em vez de liberá-los em uma única dose massiva (MORADI et al., 2011; OUATTARA et al., 2000) e evitar alterações das características sensoriais do produto (COMA, 2008).

O uso de um agente antimicrobiano na embalagem reduziria o risco com eventuais contaminações cruzadas após o processamento (COMA, 2008) causadas pelas bactérias *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* capazes de crescer na superfície de carnes e produtos cárneos cozidos, armazenados a uma temperatura de 7 °C (MARCOS et al., 2007).

Muitos estudos têm sido realizados na área de filmes e revestimentos utilizando óleos essenciais como agentes antioxidantes naturais de produtos cárneos, sendo os resultados geralmente limitados pelo intenso aroma e sabor aportado pelos óleos essenciais, que leva, em muitos casos, a mudanças notáveis nos atributos sensoriais desses produtos alimentícios (FECKA; TUREK, 2008). Nesse sentido, o uso de compostos como o ácido cafeico e seus oligômeros, glicosídeos, flavonóides, derivados da hidroquinona, terpenóides e compostos fenólicos, entre outros, provenientes de extratos de plantas, pode ser especialmente desejável, porque se presume que sejam seguros à saúde, por serem obtidos de fontes naturais e serem bem aceitos pelos consumidores

Diferentes agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes, tais como extratos, óleos essenciais, bacteriocinas, peptídeos, triclosan, enzimas, quelantes e ácidos orgânicos (propiônicos e sórbicos), têm sido incorporados em diferentes filmes, para inibir o crescimento dessas bactérias na preservação de carnes e produtos cárneos (COMA, 2008; FANG et al., 2017; KUULIALA et al., 2015; LEKJING, 2016; OUSSALAH et al., 2007; PATIÑO et al., 2014; TORNUK et al., 2015) e, portanto, para estender o seu tempo de vida útil.

Na tabela 4 se apresentam alguns exemplos de pesquisas realizadas envolvendo filmes com atividades antimicrobiana e/ou antioxidante empregados na embalagem de carne e produtos cárneos para sua preservação ou extensão da vida útil.

Tabela 4 – Exemplos de pesquisas envolvendo a utilização de filmes ativos com atividade antimicrobiana (AM) e/ou antioxidante (AO) na preservação da carne e produtos cárneos

Continua...

Agente ativo	Embalagem carregadora	Produto testado	Referência
Acido cítrico	Filme de gelatine (AM, AO)	Hambúrguer de carne armazenada a 4 °C por 5 dias	Battisti et al. (2017)
Óleos essenciais de manjerição e tomilho	Revestimento de quitosana (AM, AO)	Carne de porco moída armazenada a 10 °C por 15 dias	Bonilla et al. (2014)
Ácidos carboxílicos e flavanonas	Bandejas de poli(etileno tereftalato) (AO)	Carne de peito de peru armazenada a 4 °C por 4 dias	Contini et al. (2014)
Nisina	Filme de polihidroxibutirato/ policaprolactona (AM)	Presunto cozido embalado a vácuo e armazenado a 5 °C por 4 semanas	Correa et al. (2017)
Nisina	Sacolas de polietileno de baixa densidade (AM)	Hambúrguer de carne embalada a vácuo e armazenada a 4 °C por 21 dias	Ferrocino et al. (2016)
Extrato de hena	Revestimento de gelatina (AM, AO)	Carne cortada em cubos armazenada a 4 °C por 8 dias	Jridi et al. (2018)
Óleo essencial de cravo	Revestimento de quitosana (AM, AO)	Salsicha de carne de porco armazenada a 4 ± 2 °C por 25 dias	Lekjing (2016)
Enterocinas	Filmes de alginato, zeína e poli(vinil álcool) (AM)	Presunto cozido fatiado embalado à vácuo ou não e armazenado a 6 °C por 29 e 8 dias	Marcos et al. (2007)
BHA, BHT, extrato de alecrim e α-tocoferol	Filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) (AO)	Bifes de carne frescos armazenados a 4 ± 2 °C por 9 dias	Moore et al. (2003)
Óleo essencial de <i>Zataria multiflora</i> Boiss e extrato de semente de uva	Filme de Quitosana (AM, AO)	Mortadela fatiada armazenada a 4 °C por 21 dias	Moradi et al. (2011)
hidroxitolueno butilado Extrato de chá verde	Filme de amido de batata (AO)	Carne armazenada a 4 e 20 °C por 10 dias	Nisa et al. (2015)

Tabela 4 - Exemplos de pesquisas envolvendo a utilização de filmes ativos com atividade antimicrobiana (AM) e/ou antioxidante (AO) na preservação da carne e produtos cárneos

			<i>Conclusão...</i>
Agente ativo	Embalagem	Produto testado	Referência
	carregadora		
Ácido ascórbico Tomilho, alecrim e sálvia	Revestimento da blenda caseinato de cálcio, proteína de soro e Carboximetilcelulose (AM, AO)	Carne moída armazenada a 4 ± 2 °C por 10 dias	Ouattara et al. (2002)
Própolis Óleos essenciais de cravo e manjerição	Folhas de papel revestidas com gelatina (AM, AO)	Hambúrguer de carne armazenada a ± 4 °C por 10 dias	Reyes (2017)
Extrato de Própolis	Folhas de papel revestidas com polietileno (AO)	Presunto cozido fatiado armazenado a 4 °C por 4 dias	Rizzolo et al. (2016)
Pediocinas	Filmes de acetato de celulose (AM)	Presunto cozido fatiado embalado à vácuo e armazenado a 12 ± 1 °C por 15 dias	Santiago-Silva et al. (2009)
Extrato de casca de amendoim Extrato de resíduo de pimenta rosa	Filme de quitosana (AM, AO)	Hambúrguer de carne de frango armazenada a 3 ± 1 °C por 7 dias	Serrano-León et al. (2018)
Óleo essencial de alho	Filmes de PEBD com etileno-vinil-acetato (EVA) como copolímero (AM)	Carne cozida embalada no filme ativo e armazenada a 4 °C por 15 dias	Sung et al. (2014a)
trans-cinamaldeído, carvacrol, timol e eugenol	Revestimento de quitosana (AM, AO)	Salsichas de carne de porco embaladas ao vácuo e armazenadas a 4 °C por 42 dias	Upadhyay et al. (2015)
Extrato de chá verde	Filmes de polietileno (AO)	Carne de porco picada embalada à vácuo e armazenada a 4 °C por 13 dias	Wrona et al. (2017)

Fonte: Própria autoria.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Os objetivos gerais desta tese são os seguintes:

- Desenvolver nanoemulsões óleo-em-água (O/A) com três agentes ativos na fase óleo, sendo dois antimicrobianos – cinamaldeído e óleo essencial de alho – e um antioxidante – alfa-tocoferol; e caracterizar essas nanoemulsões, inclusive sua estabilidade.
- Desenvolver, caracterizar e aplicar filmes ativos à base de gelatina-quitosana (G-Q), ativados com nanoemulsões O/A preparadas nas condições ótimas de processo, conforme o objetivo anterior.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desta tese foram os seguintes:

- Estabelecer e otimizar as condições de processo de nanoemulsões O/A com relação à suas características físicas e de estabilidade;
- Desenvolver e avaliar as propriedades físico-químicas, antimicrobiana e antioxidante de filmes ativos à base de G-Q adicionados de nanoemulsões O/A;
- Estudar a migração dos compostos ativos dos filmes em simuladores de matrizes alimentícias;
- Aplicar os filmes ativos entre fatias de mortadela, avaliar a sua aceitação sensorial e estudar a vida útil através de análises físico-químicas e microbiológicas.

4 HIPÓTESE

A hipótese que se buscou demonstrar nesta tese é que os agentes ativos apolares (α -tocoferol/cinamaldeído; α -tocoferol/óleo essencial de alho; ou α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) nanoemulsificados (O/A) podem ser melhor dispersos na matriz de filmes de gelatina-quitosana produzidos por *casting*, tendo a água como solvente, produzindo-se assim, filmes ativos, sem provocar prejuízos às demais propriedades físicas ou funcionais do material. Ainda, considera-se que esses filmes deverão apresentar liberação controlada dos agentes ativos para o alimento, possibilitando maior conservação da mortadela fatiada refrigerada.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material e reagentes

Para a produção e caracterização das nanoemulsões e dos filmes, assim como para a produção da mortadela e estudo da sua vida útil, foram utilizados os seguintes materiais e reagentes: α -tocoferol (95% de pureza), cinamaldeído (>95% de pureza), óleo essencial de alho (>99% de pureza), Tween 20, Span 60 e hexano adquiridos na Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Além disso, utilizou-se também óleo de canola, carne bovina, sal refinado (Lebre), e amido de mandioca (Yoki), comprados em um supermercado local, tripolifosfato e nitrito de sódio adquiridos na empresa CORI (Rio Claro, SP, Brasil), e condimentos de mortadela, doados pela empresa IBRAC (Rio Claro, SP, Brasil).

Utilizou-se ainda gelatina comercial de pele suína, do tipo A (260 °Bloom, PM $\sim 5.2 \times 10^4$ Da), fornecida pela empresa GELNEX (Itá, Santa Catarina, Brasil); quitosana de peso molecular médio (GD: 75–85%; viscosidade: 200–800 cps) da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil); glicerol (Synth); brometo de sódio, 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ), 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox); ácido tiobarbitúrico (TBA), 1,1-3,3 tetraetoxipropano (TEP); ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); galato de propilo, persulfato de potássio; cloreto férrico; etanol absoluto e outros reagentes de grau analítico, adquiridos nas firmas Labsynth (SP, Brasil) e Sigma-Aldrich (Dorset, Reino unido).

Para as análises microbiológicas, foram utilizados o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Himédia, Mumbai, Índia) e os agar: nutritivo (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino unido), *Mueller-Hinton* (Acumédia, Michigan, EUA), *Listeria Ottaviani and Agosti*, *Tryptic soy* (TSA), e *man, rogosa, sharpe* (MRS) (Merck, São Paulo, Brasil). Placas PetrifilmTM foram fornecidas pela empresa 3M (Sumaré, SP, Brasil). Também foram utilizados água peptonada; água deionizada Millipore (Elix[®] 5UV, essential) e cloranfenicol. Foram utilizadas ainda cepas de bactérias *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 29213), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *S. enteritidis* (ATCC 13076), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), fornecidas pelo laboratório de higiene zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP); além das cepas *P. aeruginosa* (ATCC 15692) e *L. monocytogenes* (ATCC 35152), doadas pelo laboratório de microbiologia da Escola de Engenharia Bioquímica da Universidade de Birmingham, Reino unido.

5.2 Caracterização dos agentes ativos

Os agentes ativos α -tocoferol (α -t), cinamaldeído (Cin) e óleo essencial de alho (OEA) foram inicialmente caracterizados com relação à sua atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) e capacidade antioxidante.

5.2.1 Atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana do Cin e OEA foi avaliada pelo método de difusão em disco proposto pela *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997; HUSSAIN et al., 2008). Para esta análise, foram testadas as cepas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, e *L. monocytogenes*, além das cepas *P. aeruginosa* (ATCC 15692) e *L. monocytogenes* (ATCC 35152), como referências de bactérias Gram negativa e Gram positiva.

Placas com agar *Mueller-Hinton* foram inoculadas com uma suspensão dos microrganismos testes, contendo 10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), a qual foi espalhada na superfície do meio com ajuda de um *Swab* estéril. Posteriormente, discos de papel filtro (*Whatman* # 1) de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 15 μ L dos compostos ativos (puros e 50 v/v%) e colocados sobre a placa. Discos impregnados com cloranfenicol (2,5 m/v%) e etanol absoluto foram utilizados como controle positivo e controle negativo, respectivamente. Finalmente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana dos compostos ativos foi determinada medindo o diâmetro dos halos de inibição de crescimento dos microrganismos testes, em milímetros, e comparando com o diâmetro do halo de inibição do controle positivo e negativo (HUSSAIN et al., 2008).

A concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes ativos foi determinada apenas para as bactérias *P. aeruginosa* (ATCC 15692) e *L. monocytogenes* (ATCC 35152). Para esta análise, foi utilizado o ensaio de susceptibilidade à microdiluição em caldo com algumas modificações propostas por Miles e Misra (1938). Os testes foram realizados em caldo BHI suplementado com o emulsificante Tween 80 (0,5 m/m%). Diluições seriadas foram realizadas para obter concentrações de cinamaldeído entre 0,0125 – 1.25 mg/g e de óleo essencial de alho entre 0.1 – 10 mg/g. Em seguida, 100 μ L de cada diluição foram individualmente adicionados a 100 μ L de uma suspensão contendo 10^8 UFC/mL de *P. aeruginosa* (ATCC 15692) e *L. monocytogenes* (ATCC 35152) nas microplacas de 96 poços, as quais foram incubadas a 37 °C por 24h. Para cada bactéria, foram utilizados um controle positivo (cloranfenicol 2,5% m/v) e um controle negativo (água) em poços inoculados com as mesmas suspensões. Após o período de incubação, foram feitas diluições em série ($\times 10^{-7}$) de cada diluição e 10 μ L foram

imediatamente colocadas em forma de microgotas (x3) sobre placas de agar nutritivo, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 h. Finalmente, foi determinada a redução das UFC/mL utilizando-se a média das UFC por microgota (3 a 30 UFC) e o fator de diluição (MILES; MISRA, 1938).

5.2.2 Atividade antioxidante

5.2.2.1 Método DPPH[•]

O radical DPPH[•] foi previamente preparado com etanol na concentração de 60 µM e em seguida, foi transferido para um frasco de vidro âmbar e guardado a 4 ± 1 °C por 24 h. Foram preparadas no mínimo três concentrações de soluções de α -t, Cin e OEA e testadas em triplicata. Alíquotas de 0,1 mL de amostra foram misturadas com 3,9 mL de solução do radical DPPH[•] e mantida em ambiente escuro por 60 min até estabilizar a absorbância medida à 515 nm no espectrofotômetro Lambda 35 UV/Visível (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). A curva padrão foi construída a partir da solução inicial de DPPH[•] em uma faixa linear de 0 a 60 µM ($R^2=0,999$) e os resultados foram expressos como valor E_{C50} , que leva em consideração a quantidade de agente ativo (µL/mL de ensaio) necessária para a redução da absorbância inicial do radical DPPH[•] em 50% em um período de tempo determinado (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

5.2.2.2 Método ABTS^{•+}

O radical ABTS^{•+} foi inicialmente preparado pela reação, no escuro, de uma solução do ABTS (7 mM) com uma solução de persulfato de potássio (2,45 mM) na relação 1:0,5, à temperatura ambiente por 16 h. Após esse tempo, a absorbância do radical foi medida a 734 nm no espectrofotômetro Lambda 35 UV/Visível (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) e corrigida para 0,7 ± 0,02 nm com a utilização de etanol absoluto. Para a análise, alíquotas de 30 µL de, no mínimo, três diluições dos agentes ativos foram adicionadas a 3mL de solução do radical ABTS^{•+} e a leitura da absorbância foi feita após 6 minutos de reação no escuro (RE et al., 1999). A curva padrão foi feita em simultâneo com uma solução de Trolox (2,5 mM) numa faixa linear de 0 a 2500 µM ($R^2=0,985$) e os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente Trolox (TEAC) (mM Trolox/µL amostra) e EC_{50} (µL/mL ensaio) (RE et al., 1999).

Para a determinação da redução do radical ABTS^{•+} em 50%, foi utilizada a eq. 2.

$$\%Inibição = \left[\frac{Abs_{inicial} - Abs_{final}}{Abs_{inicial}} \right] \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Sendo $Abs_{inicial}$, a absorbância do branco e Abs_{final} , a absorbância da amostra em contato com o radical após o tempo de estabilidade.

5.2.2.3 Método FRAP

O reagente FRAP foi inicialmente preparado pela reação da solução tampão de acetato de sódio (300 mM) com a solução de TPTZ em HCl (10 mM) e a solução de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 mM) na relação 10:1:1, respectivamente, e, posteriormente, aquecido a 37 °C por 15 minutos. Para as análises, uma alíquota de 90 µL das diluições dos agentes ativos foi misturada com 270 µL de água destilada e 2700 µL de FRAP. Após 30 minutos de reação, foi feita a leitura da absorbância a 593 nm no espectrofotômetro Lambda 35 UV/Visível (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). A curva padrão foi feita com o sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) na faixa linear de 0 a 2000 µmol/L ($R^2=0,993$) e os resultados foram expressos como concentração equivalente 1 (EC_1), definida como a concentração de amostra necessária para reduzir a absorbância da solução TPTZ-férrica no equivalente a 1000 µmol/L da solução $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, em um período de tempo determinado (BENZIE; STRAIN, 1996).

5.3 Determinação do balanço hidrofílico-lipofílico

Para o cálculo do balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) (Eq. 3), utilizaram-se diferentes concentrações dos tensoativos Tween 20 ($BHL = 16,7$) e Span 60 ($BHL = 4,7$) de forma a se obter misturas com valores BHL entre 6 e 13, faixa ideal para a obtenção de emulsões O/A estáveis (LIU et al., 2006).

$$BHL_{mis} = (BHL_{T20}) * (\% T_{20}) + (BHL_{S60}) * (\% S_{60}) \quad \text{Eq. (3)}$$

Sendo BHL_{mis} , o balanço da mistura de tensoativos, BHL_{T20} e BHL_{S60} , os valores de BHL do Tween 20 e Span 60, respectivamente, e $\%T_{20}$ e $\%S_{60}$, a porcentagem utilizada de cada tensoativo.

Para as determinações de BHL, emulsões contendo 5% (m/m) da mistura de tensoativos, 10% (m/m) de fase oleosa (óleo de canola + agentes ativos) e 85% (m/m) de água destilada foram preparadas. O Span 60 foi misturado com a fase oleosa e foi aquecido a 40 °C, sob

agitação por 30 min. Por outro lado, o Tween 20 foi misturado com a água à temperatura ambiente. As duas fases foram misturadas em um homogeneizador de alta velocidade Ultra-Turrax® IKA T25 digital (Labotechnik, Staufen, Alemanha) com incrementos graduais das rpm até atingir 23000 rpm em 7 minutos. Os sistemas foram mantidos em repouso por 24 horas. O valor de BHL ideal correspondeu ao valor BHL da mistura Tween 20 e Span 60 da emulsão que apresentou a maior estabilidade visual, ou seja, menor separação de fases após 24 h (Liu et al., 2006, Galvão, 2015). Uma vez estabelecido o BHL ideal da mistura de tensoativos, as nanoemulsões foram preparadas.

5.4 Preparo das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas pela técnica de emulsificação-evaporação. Inicialmente, foi feita uma pré-emulsificação da fase orgânica (óleo de canola + agentes ativos + hexano de grau analítico + Span 60) na fase aquosa (água destilada + Tween 20), usando um homogeneizador Ultra-Turrax® IKA T25 (Labotechnik, Staufen, Alemanha) a 5000 rpm, por 5 min. (CHEONG et al., 2008). Posteriormente, um Microfluidizador M-110Y (Microfluidics, Massachusetts, USA) foi utilizado para a homogeneização e redução do tamanho médio de gota da emulsão à escala nanométrica, seguido do rotaevaporador TE-211 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) sob pressão reduzida de 0,25 atm, para eliminação do hexano residual (CHEONG et al., 2008), empregando-se os parâmetros de homogeneização e evaporação descritos no item 5.5.

Vale a pena esclarecer que na parte experimental desenvolvida na Universidade de Birmingham, Reino unido, foram preparadas nanoemulsões sem o uso do solvente orgânico na formulação, portanto, utilizou-se a mesma metodologia descrita no paragrafo anterior, porém, sem o emprego do rotoevaporador para à eliminação do solvente.

Para a produção das nanoemulsões O/A (N_1 , N_2 e N_3), as combinações dos componentes da mistura fase orgânica + fase aquosa em (g/100g de nanoemulsão) foram as seguintes:

- N_1 : óleo de canola (7), cinamaldeído (2), α -tocoferol (1), Span 60 (1,5), hexano (5) + Água, (85), Tween 20 (3,5);
- N_2 : óleo de canola (7), óleo essencial de alho (2), α -tocoferol (1), Span 60 (1,5), hexano (5) + Água, (85), Tween 20 (3,5);
- N_3 : óleo de canola (7), cinamaldeído (1), óleo essencial de alho (1), α -tocoferol (1), Span 60 (1,5), hexano (5) + Água, (85), Tween 20 (3,5).

As nanoemulsões foram caracterizadas imediatamente após o seu preparo (Dia 0) (Apêndice B), entretanto, os dados escolhidos para a otimização do processo de produção foram aqueles determinados com amostras condicionadas a 20 °C por 30 dias. Decidiu-se assim, para se levar em consideração, a estabilidade da emulsão.

5.5 Definição das condições ótimas de processo das nanoemulsões

5.5.1 Delineamento experimental

A otimização das condições de processo das três nanoemulsões contendo os agentes ativos foi feita empregando-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) com delineamento experimental *integrated variance IV-optimal*, que inclui 3 fatores ou variáveis independentes: dois fatores numéricos (pressão de homogeneização, X_1 e temperatura de evaporação, X_3) e um fator categórico (número de ciclos, X_2), em vários níveis determinados pelo software *Design-Expert* 8.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EUA) (STAT-EASE, 2000).

Para a nanoemulsão N_1 , os parâmetros de homogeneização e evaporação estudados foram os seguintes:

- X_1 – Pressão de homogeneização no microfluidizador = 20 – 100 MPa;
- X_2 – Ciclos de homogeneização no microfluidizador = 1 – 3 ciclos;
- X_3 – Temperatura de evaporação no rotaevaporador = 15 – 70 °C.

Por outro lado, as nanoemulsões N_2 e N_3 foram preparadas com os seguintes parâmetros de homogeneização e evaporação:

- X_1 – Pressão de homogeneização no microfluidizador = 20 – 100 MPa;
- X_2 – Ciclos de homogeneização no microfluidizador = 2 – 3 ciclos;
- X_3 – Temperatura de evaporação no rotoevaporador = 15 – 70 °C.

As variáveis dependentes, ou de resposta, avaliadas para definir as condições ótimas de preparo (homogeneização-evaporação) das nanoemulsões foram: diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade (YUAN et al., 2008b), determinadas nas amostras condicionadas. Todos os experimentos foram realizados sob condições homogêneas em um só bloco de medições e a sequência foi aleatorizada para minimizar os efeitos provocados por fatores não controlados (ANARJAN et al., 2011; DIAS et al., 2014).

5.5.2 Análises de regressão

Foram realizadas análises de regressão múltipla para determinar a significância estatística em função dos efeitos principais, quadráticos e de interação entre a pressão de homogeneização, o número de ciclos e a temperatura de evaporação (X_1 , X_2 e X_3), assim como para ajustar um modelo de regressão (Eq. 4) que relacione os dados experimentais com as variáveis independentes (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + e \quad \text{Eq. (4)}$$

Sendo, Y , a variável dependente (resposta), β_0 , uma constante, β_i , β_{ii} , e β_{ij} , os coeficientes linear, quadráticos e de interação, respectivamente, X_i e X_j as variáveis independentes codificadas e “e” o erro.

A significância dos coeficientes de regressão estimados para cada resposta foi avaliada pela razão F e uma probabilidade $p \leq 0,05$. A adequação dos modelos à superfície de resposta foi determinada pelo coeficiente de determinação (R^2) e pelo teste de falta de ajuste (WENG; LIU; LIN, 2001). Somente os termos considerados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) pelo software *Design-Expert 8.0.6* (STAT-EASE, 2000) foram incluídos nos modelos reduzidos (ANARJAN et al., 2010).

O ajuste das equações de regressão polinomial foi verificado ao comparar os valores experimentais obtidos do delineamento da MSR com aqueles previstos pelos modelos finais reduzidos, segundo Anarjan et al. (2010), Mehmood (2015) e Yuan et al. (2008a,b).

5.5.3 Otimização e validação do modelo

As condições ótimas de processo das nanoemulsões (X_1 , X_2 e X_3) foram determinadas de acordo com os resultados das variáveis resposta e sob o critério de otimização proposto por Myers, Montgomery e Anderson-Cook (2009). A adequação dos modelos de regressão aos valores previstos para cada resposta foi testada ao preparar as diferentes nanoemulsões usando as condições ótimas obtidas pela MSR e validada ao caracterizar essas nanoemulsões em termos de diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade.

As análises estatísticas dos dados experimentais, bem como o processo de otimização, foram realizadas com o software *Design-Expert 8.0.6* (STAT-EASE, 2000).

5.6 Caracterização das nanoemulsões

5.6.1 Diâmetro médio de gota e polidispersidade

O diâmetro médio de gota (D_m) e a polidispersidade (PD) das nanoemulsões foram determinados por dispersão dinâmica de luz (DLS) usando o equipamento *Zetasizer NanoSeries* (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As amostras foram inicialmente diluídas em aproximadamente 100 vezes com água deionizada para evitar o efeito de espalhamento múltiplo de luz (JO; KWON, 2014; LIANG et al., 2012). O diâmetro médio das gotas foi calculado diretamente no software *Zetasizer nano range v.7.11* (Malvern Instruments, UK), como o diâmetro da esfera que teria a mesma difusão da gota no mesmo meio, medido em função da correlação de variação da intensidade de luz. Os resultados de D_m e PD foram obtidos no software do sistema.

5.6.2 Estabilidade

A estabilidade (E) das nanoemulsões foi analisada no equipamento LUMiSizer® LS 610 (LUM GmbH, Berlim, Alemanha) em condições aceleradas. Alíquotas de 0,4 mL de amostra foram colocadas em células de policarbonato ($r = 130$ mm) e imediatamente centrifugadas a 4000 rpm ($2325,4 \times g$) e 45 °C por aproximadamente 2 horas, no comprimento de onda de 865 nm e fator de luz a cada 10 s, com o objetivo de simular a estabilidade das nanoemulsões em condições críticas de armazenamento durante 6 meses, sob a gravidade da terra. Valores de instabilidade foram obtidos diretamente do software *SepView v.4.1* (L.U.M, Alemanha) e foram convertidos e interpretados como estabilidade, de acordo com a porcentagem de transmitância do feixe de luz (LERCHE; SOBISCH, 2011).

5.7 Produção e caracterização de nanoemulsões processadas nas condições ótimas

Nanoemulsões (N_1 , N_2 e N_3) foram preparadas conforme descrito no item 5.4, porém sob condições de processo otimizadas.

Nanoemulsões produzidas nas condições ótimas foram submetidas a testes de estabilidade no tempo. Para isso, elas foram armazenadas em garrafas de vidro cor âmbar e mantidas a 20 °C/30 dias e 4 °C/90 dias, sendo que análises foram realizadas em amostras coletadas imediatamente após o processamento e a cada 7 ou 30 dias, respectivamente, a saber: diâmetro médio de gota e polidispersidade, conforme a metodologia descrita em 5.6.1, e potencial ζ , pH e eficiência de encapsulação (EE).

As nanoemulsões preparadas nas condições ótimas também foram caracterizadas em termos de reologia, estabilidade, tensão superficial e interfacial, densidade, microestrutura e morfologia e atividade antimicrobiana e antioxidante.

5.7.1 *Potencial ζ*

O potencial ζ foi determinado no equipamento *Zetasizer NanoSeries* (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As amostras foram diluídas aproximadamente 100 vezes com solução de KCl 0,1 mM antes de cada determinação para evitar o efeito de espalhamento múltiplo de luz (JO; KWON, 2014).

5.7.2 *pH*

Os valores de pH foram determinados a 20 °C por imersão direta do eletrodo de um pHmetro (SevenCompact, Mettler Toledo, Suíça) na nanoemulsão, de acordo com o método oficial AOAC 981.12 (AOAC, 1982).

5.7.3 *Eficiência de encapsulação (EE)*

A eficiência de encapsulação (EE) dos agentes ativos cinamaldeído (Cin), óleo essencial de alho (OEA) e α -tocoferol (α -t) das nanoemulsões foi calculada usando a eq. 5 (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2015).

$$EE = (AC_R/AC_I) \times 100 \quad \text{Eq. (5)}$$

Sendo, AC_R , a quantidade de agente ativo (Cin, OEA e α -t) restante dentro das nanogotas de cada emulsão, determinada como descrito abaixo, e AC_I , a quantidade de agente ativo inicialmente adicionado na nanoemulsão.

A quantidade de agente ativo que permaneceu encapsulado nas gotas da nanoemulsão foi determinada utilizando o UHPLC⁺ (Dionex Ultimate 3000, Thermo scientific, Alemanha). As análises foram realizadas diluindo a amostra em metanol para facilitar a detecção de Cin (1:300), e OEA ou α -t (1:100). As amostras diluídas foram separadas em uma coluna *Phenomenex Luna 3a C18* (150 x 4,6 mm, diâmetro interno 3 μ m) com um sistema de eluição de metanol:acetonitrila:solução de ácido fosfórico (1 v/v%) (50:30:20), para Cin e OEA, ou metanol:acetonitrila:água (68:28:4), para α -t. A taxa de fluxo dos solventes da fase móvel foi

de 1 mL/min, o volume de injeção foi de 10 μ L (Cin) ou 25 μ L (OEA e α -t) e o comprimento de onda de detecção foi ajustado em 285, 210 e 208 nm, para Cin, OEA e α -t, respectivamente. A concentração dos agentes ativos foi determinada a partir de curvas padrões, em uma faixa linear de 0 – 100 μ g/mL para Cin ($R^2=0,997$) e α -t ($R^2=0,999$), ou de 0 – 300 μ g/mL para o OEA (MAO et al., 2010).

5.7.4 Estabilidade das nanoemulsões

A estabilidade física das nanoemulsões preparadas nas condições ótimas foi analisada de forma acelerada no equipamento LUMiSizer® simulando condições de 45 °C/6 meses ou 20 e 4°C/1 ano de estocagem, respectivamente, como descrito no item 5.6.2. Além disso, também foi analisada a velocidade de separação de fases e expressa como a velocidade de cremação em mm/h, conforme descrito por Maher et al. (2011). Neste caso, alíquotas de amostra (0,4 mL) foram colocadas em células de policarbonato e centrifugadas (1140 $\times$ g) a temperaturas de 45 °C ou 20 e 4°C, durante aproximadamente 2 ou 8 horas, para simular 6 meses ou 1 ano de separação sob a gravidade da terra nessas condições de armazenamento, respectivamente. Todas as respostas foram obtidas diretamente no software *SepView v.4.1* do equipamento.

5.7.5 Análise de tensão interfacial e superficial

As medidas de tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa foram feitas pelo método da placa de Wilhelmy usando o tensiômetro K100 (Krüss, Hamburgo, Alemanha). A placa de platina de Wilhelmy (comprimento = 20 mm, largura = 10 mm e espessura = 0,2 mm) foi imersa em aproximadamente 20 mL da fase aquosa até uma profundidade de 3 mm. Posteriormente, foi criada uma interface entre as duas fases pipetando cuidadosamente 30 mL da fase oleosa sobre a fase aquosa. Para a medição da tensão superficial, foi utilizada a mesma placa introduzindo-a completamente dentro das amostras e puxando-a para acima até sair à superfície da mesma. A placa de platina foi enxaguada com água destilada e, se necessário, acetona, passando depois, por uma chama azul de Bunsen e resfriada antes de cada medição (YUSOFF; MURRAY, 2011). Os testes foram conduzidos a 20 e 4°C durante 3600 s, tempo em que os valores de tensão interfacial e superficial alcançaram o equilíbrio. Os valores de tensão interfacial e superficial das diferentes amostras foram fornecidos pelo software *Kruss Laboratory* (Krüss, Alemanha), inserido no sistema, e expressos em mN/m (SULLIVAN et al., 2016).

5.7.6 *Determinação da densidade*

Os valores de densidade (g/cm^3) das nanoemulsões foram determinados no viscosímetro digital de bancada Stabinger SMV3000 (Anton Paar, Graz, Áustria).

5.7.7 *Análise do comportamento reológico*

O comportamento de fluxo das nanoemulsões foi analisado a 20 e 4°C usando o reômetro Kinexus Pro⁺ (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra) equipado com uma geometria de cilindros concêntricos de parede dupla (raio interno = 16 mm, raio externo = 17,5 mm, altura = 53 mm e $gap = 2000 \mu\text{m}$). As curvas de fluxo foram obtidas para taxas de deformação variando entre 0,01 e 200 s^{-1} , em dois ciclos, de aumento e redução, com duração de 2 minutos cada rampa. O comportamento de fluxo das nanoemulsões (viscosidade) foi descrito por meio do ajuste dos dados experimentais de taxa de cisalhamento ao modelo Newtoniano (Eq. 6) (DOMIAN et al., 2014).

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad \text{Eq. (6)}$$

Sendo, τ , tensão de cisalhamento (Pa), μ , viscosidade (Pa.s) e $\dot{\gamma}$, taxa de deformação ($1/\text{s}$)

5.7.8 *Microestrutura e morfologia*

5.7.8.1 *Microscopia óptica e microscopia confocal de varredura laser (MCVL) das emulsões grossas*

Amostras da emulsão grossa foram analisadas por microscopia óptica Leica (DFC 450C, Wetzlar, Alemanha). Nesse caso, uma pequena gota foi colocada sobre uma lâmina de vidro, coberta com uma lamínula e observada com uma lente objetiva de 40x (LIANG et al., 2012).

Amostras da emulsão grossa também foram analisadas por microscopia confocal de varredura laser Leica (DM2500, Wetzlar, Alemanha). Neste caso, uma solução de vermelho Nilo preparada em acetona (0,01 v/v%) foi utilizada para colorir as gotas de óleo. Uma alíquota de aproximadamente 0,5 mL de amostra corada foi colocada sobre uma lâmina e mantida à temperatura ambiente até a secagem. Posteriormente, a amostra foi coberta com uma lamínula revestida de óleo mineral e analisada a 20 °C usando lentes objetivas de imersão em óleo de 63x ou 40x. A fluorescência da amostra foi excitada com feixes de laser Hélio Neon (HeNe) a 633 nm e argônio a 488 nm (MA et al., 2012; YUSOFF; MURRAY, 2011).

5.7.8.2 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA) das nanoemulsões*

As análises de MEV, assim como as de MFA, foram realizadas como uma ferramenta complementar para caracterizações morfológicas e de tamanho médio de gota das nanoemulsões.

A morfologia e microestrutura das nanoemulsões foram analisadas em um criomicroscópio eletrônico de varredura ambiental (FEG-ESEM XL30, Phillips, Japão). Uma gota de nanoemulsão não diluída foi congelada com nitrogênio líquido (~ -180 °C), fraturadas e liofilizadas a -90 °C, durante 2 minutos. As amostras foram, então, resfriadas até -130 °C e submetidas a revestimento com ouro, por pulverização iônica sob uma corrente de 12 mA (SULLIVAN et al., 2016).

Para as análises por MFA, uma gota de 20 μ L da nanoemulsão diluída (1:10) em água ultrapura, foi colocada sobre uma lamínula e deixada em repouso durante 1 hora à temperatura ambiente para secar na superfície. As imagens foram registradas em um microscópio de força atômica (Topview opticsTM Nanowizard, JPK Instruments, Alemanha), operado com uma ponta de silício DP17/GP/NAI (μ masch), no modo “*tapping*” a uma taxa de varredura de 0,7 a 0,8 Hz. Posteriormente, elas foram analisadas no software JPKSPM *data processing* (Topview opticsTM Nanowizard, JPK Instruments) do equipamento (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013).

5.7.9 *Atividade antimicrobiana*

A atividade antimicrobiana das nanoemulsões foi testada unicamente contra as cepas *L. monocytogenes* (ATCC 35152) e *P. aeruginosa* (ATCC 15692) utilizando-se o método de difusão em disco da NCCLS (1997), cujo procedimento está descrito no item 5.2.1, e outro método descrito por Miles e Misra (1938).

Para análises segundo o método de Miles e Misra (1938), microplacas de 96 poços foram utilizadas para misturar 100 μ L das diferentes amostras de nanoemulsão com 100 μ L de cada suspensão de bactérias contendo 10^8 UFC/mL de *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*, em triplicata, incluindo a mistura com um controle positivo (cloranfenicol 2,5 m/v%) e um controle negativo (água destilada estéril). Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, foram feitas diluições em série ($\times 10^{-7}$) de cada uma das misturas e 10 μ L foram imediatamente colocadas em forma de microgotas ($\times 3$) sobre placas de agar nutritivo, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 h. Finalmente, foi determinada a redução das UFC/mL

utilizando-se a média das UFC por microgota (3 a 30 UFC) e o fator de diluição (MILES; MISRA, 1938).

5.7.10 Atividade antioxidante

As análises de atividade antioxidante foram realizadas usando os métodos de sequestro dos radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e o método de poder de redução do íon férrico (FRAP), segundo Brand-williams, Cuvelier e Berset (1995), Re et al. (1999) e Benzie e Strain, (1996), respectivamente, descritos no item 5.2.2. A atividade antioxidante das nanoemulsões foi expressa como EC₅₀ (μL agente ativo/mL de ensaio) para DPPH[•] e ABTS^{•+}, e EC₁ (μL agente ativo/mL de ensaio) para FRAP.

5.8 Produção e caracterização de nanoemulsões preparadas sem o uso de solvente orgânico

Com a intenção de se obter um produto sem o uso de solvente orgânico, portanto “*environmentally friendly*”, optou-se por preparar as três nanoemulsões (N₁, N₂ e N₃) nas condições ótimas, sem o uso do hexano, visando a sua incorporação nos filmes ativos. Uma quarta nanoemulsão O/A com a mesma relação de fases oleosa:aquosa (1:9) foi preparada sem a adição de agentes ativos e considerada como nanoemulsão controle (N₄). Todas as nanoemulsões foram produzidas seguindo a mesma metodologia descrita em 5.4, exceto pelo uso do rotaevaporador para a eliminação do solvente orgânico.

A estabilidade no tempo dessas nanoemulsões (N₁, N₂, N₃ e N₄) foi estudada medindo-se a variação do diâmetro médio de gotas, polidispersidade, potencial ζ, pH e eficiência de encapsulação durante um período de 90 dias em amostras armazenadas a 4 °C, seguindo a metodologia descrita nos itens 5.6.1, 5.7.1 e 5.7.2.

5.9 Produção e caracterização de filmes ativos

Inicialmente, foi realizado um estudo preliminar em que se produziram filmes à base de blendas de gelatina com outros biopolímeros (quitosana, caseinato de sódio e zeína). A partir dos resultados desse estudo, selecionou-se a blenda gelatina-quitosana (G–Q) na relação 4:1 para continuar com o desenvolvimento da tese, em razão de que essa blenda polimérica tinha a capacidade de reter os agentes ativos lipofílicos dentro da matriz após a etapa de secagem da solução formadora de filme (SFF).

Foram produzidos, no total, 5 tipos de filmes usando a mesma blenda G–Q (4:1). O primeiro foi preparado sem a incorporação de nanoemulsão e foi considerado como filme controle (F_0). Os demais filmes foram incorporados com as nanoemulsões finais preparadas nas condições ótimas, conforme descrito no item 5.8, e foram definidos como filmes F_1 , F_2 , F_3 e F_4 , de acordo com a composição de cada nanoemulsão.

5.9.1 Preparo das soluções formadoras de filme (SFF)

As soluções de gelatina e quitosana foram preparadas, sem ou com as nanoemulsões, separadamente. A gelatina foi hidratada durante 30 minutos à temperatura ambiente (SOBRAL et al., 2001). Em seguida, foi solubilizada a 60 °C por mais 30 minutos sob agitação mecânica, utilizando-se um banho termostático. Após esse período, o glicerol e as nanoemulsões foram adicionados convenientemente, mantendo-se a agitação por mais 5 min para homogeneização.

Separadamente, a quitosana foi dispersa em uma solução de ácido acético (2 v/v%) suficiente para garantir a solubilidade da quitosana (pH = 4,02), durante 24 h à temperatura ambiente e, posteriormente, filtrada para eliminar impurezas. Após esse processo foram adicionados o glicerol e as diferentes nanoemulsões sob agitação mecânica por cerca de 5 min.

Em seguida, a SFF foi obtida misturando-se as soluções de gelatina e quitosana previamente preparadas numa relação 50:50 (pH = 4,27), sob agitação magnética (SB162-3, Stuart, Reino Unido) durante 3 min. Posteriormente, a SFF foi homogeneizada a 5000 rpm por 5 min usando o agitador de alto cisalhamento Silverson (L5M, Reino Unido). Durante a agitação, o pH das SFF foi ajustado em 5,6 para alcançar uma melhor interação entre a quitosana e a gelatina. Esse valor de pH está acima do ponto isoelétrico da gelatina ($P_i = 4,5 - 5,2$), em que todas as cadeias de gelatina são carregadas negativamente e abaixo do ponto isoelétrico da quitosana ($P_i = 6,2$), o que evita a precipitação da quitosana na solução (BENBETTAÏEB et al., 2014). Finalmente, as SFF foram submetidas a uma sonicação no ultrassom (QS18, Ultrawave, Reino Unido) a 50°C x 10 min para a eliminação de bolhas de ar formadas na homogeneização.

As SFF foram elaboradas com as seguintes concentrações:

- Concentração de gelatina: 4g/100 g SFF;
- Concentração de quitosana: 1g/100 g SFF;
- Concentração agentes ativos nanoemulsificados: 0 ou 5g/100 g gelatina-quitosana;
- Concentração de glicerol: 30g/100g de gelatina-quitosana.

5.9.2 Produção dos filmes

Para a produção dos filmes ativos, as SFF foram vertidas em placas de Petri (14 cm de diâmetro) e posteriormente desidratadas a 30 °C em umidade relativa ambiente por 18 a 24 horas, em uma estufa com circulação de ar forçado (Marconi, MA 037, São Paulo, Brasil). A espessura dos filmes foi mantida constante controlando-se a relação de massa de SFF/área da placa.

Após a retirada dos filmes das placas de petri, foi feita uma inspeção visual desses filmes e, posteriormente, foram acondicionados dentro de dessecadores contendo solução saturada de NaBr a 25 °C e 58% de umidade relativa por um período de 7 dias, antes da caracterização de suas propriedades físico-químicas, antimicrobianas e antioxidantes. Para as análises de MEV e MFA, os filmes recém-formados foram acondicionados em sílica gel (umidade relativa 0%) durante o mesmo período.

5.10 Caracterização dos filmes

5.10.1 Espessura

A espessura foi medida em 10 pontos aleatórios sobre a superfície dos filmes usando o micrômetro digital Mitutoyo IP-65 (Kawasaki, Japão), com precisão de 0,001 mm (GONTARD et al., 1994).

5.10.2 Umidade

A umidade (U) foi determinada cortando-se as amostras do filme em discos (20 mm de diâmetro), colocando em pesa filtros e medindo a redução na massa de 3 discos de cada filme após a secagem na estufa (GPS/50/CLAD/250/HYD, Leader, Reino unido) a 105 °C durante 24 h. Os valores de umidade foram calculados com a eq. 7, expressos como g de água/100 g de amostra úmida.

$$U(\%) = \left(1 - \frac{m_f}{m_i}\right) \times 100 \quad \text{Eq. (7)}$$

Sendo U , a umidade, m_i , a massa inicial da amostra (g) e m_f , a massa final da amostra seca (g) (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992).

5.10.3 Solubilidade em água e grau de inchamento

Para as medidas de solubilidade em água (SA) e grau de inchamento (GI), as amostras de filme foram cortadas em discos (20 mm de diâmetro), pesadas e imersas em 50 mL de água destilada sob agitação em um agitador (Incu-Shake MIDI, SciQuip, Reino unido) a 60 rpm e à temperatura ambiente durante 24 h. As amostras de filme foram então removidas da solução, filtradas e pesadas. Especificamente para a determinação da solubilidade em água, essas amostras foram secas na estufa (GPS/50/CLAD/250/HYD, Leader, Reino unido) a 105 °C durante 24 h. Conhecendo-se a massa seca inicial do filme antes da imersão e a massa seca após a imersão, então pode-se calcular a SA com a eq. 8 (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992).

$$SA = \frac{m_i - m_s}{m_s} \quad \text{Eq. (8)}$$

Sendo, SA, a solubilidade em água, m_i , a massa seca inicial da amostra (g) antes da imersão e m_s , a massa final da amostra seca (g) após imersão em água por 24 h.

O grau de inchamento foi calculado com a eq. 9 (YOON, 2014).

$$GI = \frac{m_f - m_i}{m_i} \quad \text{Eq. (9)}$$

Sendo, GI, o grau de inchamento (g de água absorvida/g de filme), m_i , a massa do filme inicial (g) e m_f , a massa do filme final após 24 h de imersão em água (g).

5.10.4 Ângulo de contato de água

A molhabilidade da superfície do filme foi determinada usando o método da gota sessil, medindo o ângulo de contato de água em um Goniômetro *EasyDrop* (Krüss GmgH, Alemanha). Uma gota de água deionizada (~ 20 µL) foi colocada com uma seringa de precisão sobre a superfície horizontal dos filmes (30 x 30 mm) e a medida começou imediatamente, capturando-se imagens a cada 2 s durante 120 s. Análises de imagem foram feitas no software *Dropshape analysis* (Krüss, GmgH Alemanha), inserido no sistema do equipamento para medir o ângulo de contato de um perfil meridiano teórico entre a linha de base e a tangente ao borde da gota (MARCUIZZO et al., 2010).

5.10.5 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada gravimetricamente seguindo o método ASTM E96/E96M-05 (2005) com ligeiras modificações (BONILLA; SOBRAL, 2016). Discos de filmes (40 mm de diâmetro) foram colocados sobre células de alumínio contendo 10 mL de água destilada (100% UR), as quais foram dispostas em um dessecador que continha uma solução saturada de nitrato de magnésio (53% UR) e incubadas a 5 °C em uma estufa B.O.D. (Marconi MA-415, São Paulo, Brasil). O sistema composto pela célula e o filme era pesado diariamente durante 7 dias, com uma balança Scientech SA210 ($\pm 0,001$ g) até atingir uma permeação no estado estacionário. O coeficiente angular da relação linear da perda de peso em relação ao tempo foi determinado e a PVA foi calculada utilizando a eq. 10 (GONTARD et al., 1994).

$$PVA = [(w/t). (x/A. \Delta P)] \quad \text{Eq. (10)}$$

Sendo, PVA , a permeabilidade ao vapor de água, x , a espessura do filme (mm), A , a área de permeação ($0,0032 \text{ m}^2$), ΔP , a diferença de pressão de vapor parcial no gradiente de UR 100 - 53% de (2333 Pa, 5°C) e w/t , o coeficiente angular da regressão linear (g/s). Os resultados foram expressos como g/m.s.Pa.

5.10.6 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas por teste de tração (tensão na ruptura, alongação na ruptura e módulo de elasticidade) e por teste de perfuração (força e deformação na perfuração), respectivamente, utilizado o texturômetro TA XT2i (Stable Micro system, Surrey, Reino unido), de acordo com o método padrão da *American Society for Testing and Materials* D882-12 (ASTM, 2012) com ligeiras modificações.

Para o teste de tração, os filmes foram cortados em tiras de 15 mm de largura e 100 mm de comprimento. Posteriormente, as tiras foram fixadas em garras com uma distância inicial de separação (l_0) de 50 mm e testadas a uma velocidade de tração de 1,0 mm/s até a ruptura. Para essas análises, pelo menos 10 réplicas de cada filme foram utilizadas. A tensão na ruptura (TR) foi calculada como a tensão máxima que o filme pode suportar antes de se romper. A alongação na ruptura (ER) foi calculada como a porcentagem (%) de alteração no comprimento do filme original, e o módulo de elasticidade (ME) correspondeu ao coeficiente angular da parte linear da curva de tensão vs. deformação. Os valores de TR, ER e ME foram determinados diretamente

do software *Exponent Lite* v.4.0.13.0 (Stable Micro System, Reino unido) do equipamento (ASTM, 2012).

Para o teste de Perfuração, os filmes foram cortados em discos (40 mm de diâmetro), fixados em células de anel com abertura de 30 mm de diâmetro e depois perfurados com uma sonda (3 mm de diâmetro), movendo-se a uma velocidade de 1 mm/s. A força máxima de perfuração (FP) foi definida como o pico máximo da curva de força vs descolamento da sonda na perfuração e expressa em Newtons (N). A deformação na perfuração (DP) foi calculada a partir da distância percorrida pela sonda com a eq. 11 (KANATT et al., 2012).

$$DP(\%) = \frac{\sqrt{d^2 + r^2} - r}{r} * 100 \quad \text{Eq. (11)}$$

Sendo, DP , a deformação na perfuração (%), d , a distância percorrida pela sonda (mm) e r , o raio da amostra do filme (mm).

5.10.7 *Própriedades ópticas*

5.10.7.1 *Cor e opacidade*

Os parâmetros de cor da escala CieLab, sendo L^* , a luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco), a^* , variando do verde (-) ao vermelho (+) e b^* , variando do azul (-) ao amarelo (+), foram determinados conforme o método ASTM D2244-16 (ASTM, 2016), usando o colorímetro Miniscan EZ (HunterLab, Reston, EUA) no modo reflectância, com iluminante/observador D65/10° e uma abertura de medida de 30 mm controlada pelo software universal (Hunterlab Associates Laboratories, Reston, EUA) do equipamento. A diferença total de cor (ΔE^*) foi calculada utilizando a eq. 12 (ASTM, 2016).

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad \text{Eq. (12)}$$

Sendo, ΔL^* , Δa^* e Δb^* , a diferença entre os parâmetros da cor (L^* , a^* e b^*) de cada amostra e os parâmetros de cor (L_0^* , a_0^* e b_0^*) de uma placa padrão. Os valores padrões foram $L_0^* = 93,53$, $a_0^* = -1,06$ e $b_0^* = 1,37$.

Por outro lado, a opacidade foi calculada de acordo com a relação entre a opacidade da amostra sobre a placa padrão preta (Y_p) e sobre a placa padrão branca (Y_b) ($Y = Y_p/Y_b$),

utilizando-se o mesmo equipamento e software (Hunterlab Associates Laboratories, Reston, EUA) usados nas medidas de cor (SOBRAL et al., 2001).

5.10.7.2 Brilho

O brilho dos filmes foi medido nos ângulos de 20 e 60° conforme o método padrão ASTM D2457-03 (ASTM, 2003), utilizando-se o glossímetro Novo-Gloss™ 20/60 (Rhopoint, Reino Unido). Os resultados foram calculados como a média de 10 medidas aleatórias realizadas na superfície de secagem dos filmes.

5.10.8 Isotermas de absorção de vapor de água

As isotermas de absorção de vapor de água foram determinadas usando um analisador de sorção de vapor (VSA) AquaLab (AquaLab, Pullman, WA, EUA) totalmente automatizado à temperatura de 20 °C, usando o método dinâmico de ponto de orvalho (DDI) para uma umidade relativa (UR) entre 30% e 90%, com uma resolução de dados de 0,5% de UR (DECAGON DEVICES, 2016). Para esta análise foram pesadas amostras de filmes de aproximadamente 2 g, colocadas na célula e introduzidas no equipamento à temperatura controlada. A umidificação no VSA foi feita pela saturação do ar com água antes de que este entrasse na câmara e circulasse pela amostra, enquanto se media automaticamente a atividade de água com o sensor espelhado de ponto de orvalho patenteado pela Decagon company. Simultaneamente, se registrava a massa da amostra ao longo do processo de umidificação por meio de uma balança de força magnética de alta precisão ($\pm 0,0005$ g) incorporada no equipamento (ARTHUR et al., 2016). Os dados foram coletados no software *VSA Isotherm Generator* (AquaLab, EUA) do equipamento.

Quatro modelos (Tabela 5), entre eles, o modelo de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Eq.13) (BRUNAUER et al., 1938), Guggenheim-Anderson-Boer (GAB) (Eq. 14) (VAN DEN BERG; BRUIN, 1981), Peleg (Eq. 15) (PELEG, 1993) e Oswin (Eq.16) (OSWIN, 1946), foram ajustados aos dados experimentais para descrever o comportamento das isotermas de absorção de vapor de água dos filmes (ARTHUR et al., 2016; POLATOĞLU et al., 2011).

Tabela 5 - Modelos de isotermas de absorção

Modelo	Equação	
BET	$X_e = X_0 C_B Aa / [(1 - Aa)(1 - C_B \ln(1 - Aa))]$	Eq. (13)
GAB	$X_e = X_0 C_G K Aa / [(1 - K Aa)(1 - K Aa + C_G K Aa)]$	Eq. (14)
Peleg	$X_e = M_1 Aa^{N_4} + M_2 Aa^{N_1}$	Eq. (15)
Oswin	$X_e = A[Aa / (1 - Aa)]^B$	Eq. (16)

Sendo, X_e , a umidade de equilíbrio (g/g matéria seca), Aa , a Atividade de água (fração), X_0 , a umidade na monocamada (g/g matéria seca), C_B , constante de BET, C_G e K , constantes de GAB, A e B , constantes de Oswin e M_1 , M_2 , N_4 , e N_1 , parâmetros do modelo de Peleg.

Fonte: Polatoğlu et al. (2011).

5.10.9 Microestrutura dos filmes

5.10.9.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura dos filmes foi analisada utilizando-se o crio-microscópio eletrônico de varredura ambiental ESEM XL30 (Phillips, Japão). As amostras de filme foram inicialmente recobertas com platina no equipamento *Sputter SC7640* (Quorum Technologies, Reino unido) e posteriormente fixadas no suporte do microscópio usando uma fita adesiva de dupla face. Foram utilizadas diferentes amplitudes (até 10000x) para focar e micrografar a superfície dos filmes. A seção transversal foi observada com feixe de 10 kV e ampliações entre 250x e 1000x, em posições aleatórias ao longo da espessura dos filmes. Para análise da seção transversal dos filmes, as amostras precisaram ser crio-fraturadas após imersão em nitrogênio líquido (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014).

5.10.9.2 Microscopia de força atômica (MFA)

As análises de MFA foram realizadas utilizando-se o microscópio *Topview opticsTM Nanowizard* (JPK Instruments, Alemanha), equipado com uma ponta DP17/GP/NAI (μ masch) e operado no modo de contato, no qual as mudanças na amplitude de contato da ponta na superfície do filme forneceram sinais de *feedback* para medir a variação na topografia da superfície dos filmes. As amostras foram cortadas em 2×2 cm e coladas em uma lamínula de vidro. Todas as imagens do MFA (10×10 μ m) foram coletadas na superfície dos filmes em uma taxa de varredura fixa de 0,7 Hz, força de contato de 0.9 N/m e uma frequência de ressonância de 20 kHz. A rugosidade superficial dos filmes foi calculada com base na média da altura dos

picos e emitida pelo software JPKSPM *data processing* (Topview optics™ Nanowizard, JPK Instruments) do equipamento (MA et al., 2012).

5.10.10 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas de acordo com Bonilla e Sobral (2016), utilizando-se o espectrômetro FTIR Nicolet 380 (Thermo Scientific, Alemanha). Espectros de absorbância de amostras de filme foram determinadas à temperatura ambiente, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com uma resolução de 16 cm^{-1} durante 64 varreduras espectrais. Os dados foram coletados e tratados com o software *OMNIC* (Thermo Scientific, Alemanha) do equipamento.

5.10.11 Difração de raios X

As análises de cristalinidade dos filmes foram realizadas usando-se o difratômetro de raios-X Miniflex600 (Rigaku, Japão) com ânodo de Cu. As amostras foram cortadas (20 x 20 mm), colocadas sobre uma placa de vidro e o conjunto foi colocado dentro da câmara do equipamento. As medidas foram registradas à temperatura ambiente, 40 kV e corrente de 40 mA na região de 2θ , de 8° a 70°, com velocidade constante de 1°.min⁻¹, usando o software *Miniflex Guidance* (Rigaku, Japão) do equipamento (CHEN et al., 2016).

5.10.12 Calorimetria diferença de varredura (DSC)

As propriedades térmicas dos filmes foram determinadas usando um calorímetro diferença de varredura DSC TA2010 (TA Instruments, New Castle, EUA) controlado por um sistema TA5000 (TA Instruments, EUA) e um acessório de resfriamento criogênico. Aproximadamente 10 mg de filme foram pesados em uma balança *Analytical Plus 2500* de precisão ($\pm 0,00001$ g) (Ohaus, Suíça), condicionados em placas de alumínio hermeticamente fechadas, e aquecidos a 5°C/min em dupla corrida, de -50 a 100 °C em uma atmosfera inerte (45 mL/min N₂). Uma placa vazia foi usada como referência. O software *Universal Analysis V1.7F* (TA Instruments, EUA), do equipamento, foi utilizado para o cálculo da temperatura de transição vítrea (T_g), definida como o ponto de inflexão da linha de base, assim como para o cálculo da temperatura de fusão (T_m) e entalpia (ΔH_m) da transição sol-gel, as quais foram definidas como o ponto no qual ocorre o pico endotérmico e a área sobre esse pico endotérmico, respectivamente (ALEXANDRE et al., 2016; SOBRAL et al., 2001).

5.10.13 Propriedade de barreira à luz UV/visível

A transmitância à luz ultravioleta e visível, assim como a transparência dos filmes, foi determinada usando-se um espectrofotômetro UV-VIS *Orion AquaMate 8000* (Thermo Scientific, Alemanha), operado no modo transmitância em comprimentos de onda variando entre 200 e 900 nm, de acordo com Ahmad et al. (2012). As amostras de filme foram fixadas no lugar da cubeta, de modo que o feixe de luz pudesse atravessá-lo (BONILLA; SOBRAL, 2016).

O valor de transparência dos filmes foi calculado com a eq. 17:

$$\text{Transparência} = (-\log T_{600})/x \quad \text{Eq. (17)}$$

Sendo, T_{600} , a transmitância medida a 600 nm e x , a espessura do filme (mm). O maior valor de transparência representa a menor opacidade de filmes (AHMAD et al., 2012).

5.10.14 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada apenas contra a *P. aeruginosa* (ATCC 15692) e *L. monocytogenes* (ATCC 35152) pelo método de difusão em agar com base na metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com ligeiras modificações conforme Wayne (2006), em razão de que elas representam as principais bactérias deteriorante e patogênica, respectivamente, de produtos cárneos cozidos.

As cepas microbianas foram cultivadas em caldo BHI (Sigma Aldrich, Reino unido) e mantidas uma noite a 37 °C e 150 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 2000 rpm durante 10 min e lavadas em solução tampão salina estéril (pH 7,2) duas vezes. Suspensões com uma turbidez equivalente a um padrão de McFarland 0.5 (10^8 UFC/mL) foram inicialmente preparados, depois diluídos até uma concentração final de 10^5 UFC/mL com agar Mueller Hinton (Merck, Reino unido) e finalmente vertidos em placas petri após a mistura (plaqueamento em profundidade) (KAVOOSI et al., 2014). Após a solidificação do meio de cultura, os discos de filmes (diâmetro 20 mm) foram colocados assepticamente sobre a superfície do agar e as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A área da zona ao redor e embaixo dos discos de filme sem crescimento de bactéria foi calculada e relatada como a zona de inibição (SUNG et al., 2014b).

5.10.15 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes foi também medida utilizando os métodos de sequestro dos radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e o método de poder de redução do íon férrico (FRAP), descritos no item 5.2.2, com algumas modificações.

Para as análises de DPPH[•] e ABTS^{•+}, amostras de filmes (0,1 g) foram imersas em 10 mL de uma mistura hidro-alcoólica (1:1) e mantidas sob agitação a 80 rpm e 20°C durante a noite para estimular a extração dos agentes nanoencapsulados. Uma alíquota (1,5 mL) do filme previamente solubilizada e centrifugada (4000 rpm, 30 min) foi adicionada a 1,5 mL de solução de radical DPPH[•] (60 µM) e mantida no escuro durante uma hora. Após este período, determinou-se a absorbância da amostra a 515 nm no espectrofotômetro UV-Vis *Orion AquaMate* 8000 (Thermo Scientific, Alemanha) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Por outro lado, uma alíquota (100 µL) das amostras previamente solubilizadas e centrifugadas (4000 rpm, 30 min) foi adicionada à solução ABTS^{•+} (900 µL). A mistura foi mantida no escuro durante 6 minutos e a absorbância foi medida a 734 nm no espectrofotômetro UV-Vis *Orion AquaMate* 8000 (Thermo Scientific, Alemanha) (BONILLA; SOBRAL, 2016; RE et al., 1999).

Finalmente, amostras de filmes de 5 x 5 mm (~ 2,5 mg) foram colocadas em contato com 3 mL do reagente FRAP, previamente preparado, por 24 h. Após esse período, a absorbância da solução que continha o filme foi medida a 593 nm no espectrofotômetro UV-Vis *Orion AquaMate* 8000 (Thermo Scientific, Alemanha). A absorbância da solução FRAP (sem o filme) também foi medida e foi considerada como o branco (FERREIRA et al., 2014).

Nas três análises, a atividade antioxidante foi calculada e expressa como capacidade antioxidante equivalente Trolox TEAC (µmol/g filme seco).

5.11 Estudo de migração dos agentes ativos

Tendo em conta que a previsão de aplicação do filme ativo era entre fatias de mortadela refrigeradas, decidiu-se realizar a determinação da migração global e migração específica dos agentes ativos nanoencapsulados no filme usando-se o método de imersão total nos simuladores de alimentos aquosos não ácidos (A) e gordurosos (D) (ver item 2.4.2), conforme as normas padrões europeias EN 1186-1:2002 e EN 13130-1:2005 e a resolução GMC N° 32/10 de MERCOSUL adotada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, as

quais regulamentam a migração global e/ou específica de substâncias de materiais plásticos para simuladores de alimentos.

5.11.1 Ensaio de migração global

Amostras de filme (1 dm²) foram cortadas, colocadas em um suporte de aço inoxidável, perfurando os seus extremos, inseridas em um tubo de vidro fechado (tubo de migração) contendo 20 mL de cada solução simuladora, garantindo a total imersão da amostra no tubo. Os tubos de migração foram acondicionados em estufa B.O.D a 20 °C, durante 10 dias, de acordo com as recomendações da norma EN 1186-1:2002. Após esse período, amostras e o suporte foram retirados da estufa, sendo registrado o nível de simulador dentro do tubo. Em seguida, os diferentes simuladores foram transferidos para cápsulas de porcelana e estas foram levadas a uma estufa de secagem a 105 – 110 °C por 40 min. Após a completa evaporação dos simuladores, as cápsulas foram mantidas em dessecadores contendo sílica gel à temperatura ambiente, com o intuito de resfriá-las, e pesadas em uma balança de precisão EX2202 (±0,001 g) (Explorer, Ohaus, EUA) (EN 1186-1, 3:2002).

Os valores de migração global dos componentes migrantes dos filmes para cada simulador foram calculados usando a eq. 18 (EN 1186-3:2002).

$$M = \frac{(m_a - m_b) \times 1000}{S} \quad \text{Eq. (18)}$$

Sendo M , a migração global no simulador (mg/dm²), m_a , a massa do resíduo seco (g), m_b , a massa do resíduo no simulador branco (g) e S , a área da superfície da amostra (dm²).

5.11.2 Ensaio de migração específica

Amostras de filmes (12 cm²) foram cortadas e introduzidas em tubos de vidro fechados que continham 20 mL das soluções simuladoras de alimentos, mantidos a 20 °C durante 10 dias. Alíquotas foram retiradas de cada tubo nos tempos 0, 6, 12, 24 h, e 2, 4, 6, 8 e 10 dias, para quantificação dos componentes migrantes, empregando-se um UHPLC⁺ (Dionex Ultimate 3000, Thermo scientific, Alemanha), descrito em 5.7.1 (EN 13130-1:2005). Conhecida a concentração de cada agente migrante (α -t, Cin e/ou OEA), o coeficiente de partição (K) e a partição (α) foram calculados com as equações 19 e 20 (COLÍN-CHÁVEZ et al., 2013).

$$K_{f,s} = \frac{C_{f,\infty}}{C_{s,\infty}} \quad \text{Eq. (19)}$$

$$\alpha = \frac{V_s}{K_{f,s} V_F} \quad \text{Eq. (20)}$$

Sendo $K_{f,s}$, o coeficiente de partição, que é assumido constante a baixas concentrações e é calculado como a razão entre a concentração de α -t, Cin ou OEA no filme ($C_{f,\infty}$) e no simulador ($C_{s,\infty}$) quando se alcança o equilíbrio e V_s e V_F , os volumes do solvente simulador e do filme, respectivamente.

Além disso, foram calculados os coeficientes de difusão aparentes multicomponentes (D_{11} , D_{12} , D_{21} , D_{22}), que levam em consideração os efeitos principais e cruzados dos agentes migrantes, ajustando uma solução numérica da equação de Maxwell-Steffan (Eq. 21 – 24) com os dados experimentais (CUSSLER, 2009). Para esse ajuste, a otimização foi realizada usando o algoritmo de Levenberg-Marquardt no software *Multiphysics simulation* (COMSOL).

$$\frac{\partial w_i}{\partial t} = -\nabla \cdot j_i \quad \text{Eq. (21)}$$

Onde:

$$j_i = -(\rho w_i \sum_k D_{ik} \nabla x_k) \quad \text{Eq. (22)}$$

$$x_k = \frac{w_k}{M_k} M_n \quad \text{Eq. (23)}$$

$$M_n = \left(\sum_i \frac{w_i}{M_i} \right)^{-1} \quad \text{Eq. (24)}$$

Sendo, w_i e w_k , são as frações mássicas dos componentes "i" e "k", t , o tempo, j_i , o fluxo do componente "i" em relação à velocidade mássica média, ρ , a densidade, x_k , a fração molar do componente "k", M_k , massa molecular do componente "k", M_n , massa molecular média no meio de difusão, M_i , massa molecular do componente "i" e D_{ik} (m^2/s) são os coeficientes de difusão de Maxwell-Stefan para o par de componentes ik (D_{12} , D_{13} , D_{23}), que foram utilizados para calcular os coeficientes de difusão aparentes multicomponentes (D_{11} , D_{12} , D_{21} , D_{22}) com as equações 25 – 28.

$$D_{11} = \frac{\frac{y_1 + y_2 + y_3}{D_{12} + D_{23}}}{\frac{y_1}{D_{12}D_{13}} + \frac{y_2}{D_{12}D_{23}} + \frac{y_3}{D_{13}D_{23}}} \quad \text{Eq. (25)}$$

$$D_{12} = \frac{y_1 \left(\frac{1}{D_{13}} - \frac{1}{D_{12}} \right)}{\frac{y_1}{D_{12}D_{13}} + \frac{y_2}{D_{12}D_{23}} + \frac{y_3}{D_{13}D_{23}}} \quad \text{Eq. (26)}$$

$$D_{21} = \frac{y_2 \left(\frac{1}{D_{23}} - \frac{1}{D_{12}} \right)}{\frac{y_1}{D_{12}D_{13}} + \frac{y_2}{D_{12}D_{23}} + \frac{y_3}{D_{13}D_{23}}} \quad \text{Eq. (27)}$$

$$D_{22} = \frac{\frac{y_1 + y_3}{D_{13}} + \frac{y_2}{D_{12}}}{\frac{y_1}{D_{12}D_{13}} + \frac{y_2}{D_{12}D_{23}} + \frac{y_3}{D_{13}D_{23}}} \quad \text{Eq. (28)}$$

Sendo, y_i , a fração molar do componente i . Os coeficientes de difusão diagonais (D_{11} e D_{22}) (m/s^2) são chamados coeficientes de difusão principais, porque são comumente grandes e similares em magnitude aos valores binários. Enquanto D_{12} e D_{21} (m/s^2) são chamados de coeficientes de difusão cruzados. Cada termo cruzado dá uma medida do fluxo de um soluto que é gerado pelo gradiente de concentração de um outro soluto (CUSLER, 2009).

5.12 Aplicação do filme ativo em mortadela produzida com redução de aditivos

O filme ativo F_2 , incorporado com α -t e OEA nanoemulsificados, foi escolhido para ser aplicado entre fatias de mortadela, produzida sem o conservante Eritorbato de sódio nem alho em pó, mantidas em condições de varejo a 6 °C por até 7 dias.

5.12.1 Produção de mortadela

Três lotes de mortadela rica em Ômega 3, em razão da incorporação de óleo de *Echium*, foram fabricados de acordo com uma fórmula previamente produzida na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA, USP). A mortadela foi preparada na planta piloto de produtos cárneos da FZEA, utilizando técnicas e equipamentos de processamento industrial.

Os ingredientes utilizados na formulação da mortadela foram carne bovina (70 m/m%), óleo de *Echium* (15 m/m%), gelo (7,735 m/m%), amido de mandioca (5m/m%), sal (1 m/m%), condimento de mortadela (1 m/m%), tripolifosfato de sódio (0,25 m/m%) e nitrito de sódio (0,015 m/m%). Não se utilizaram eritorbato de sódio (conservante) e nem alho em pó, uma vez

que os filmes continham α -tocoferol e óleo essencial de alho, sendo justamente esse o interesse desta tese, que seria saber se os filmes ativos são suficientes para conservar o produto sem aqueles aditivos na formulação.

A carne bovina congelada foi transferida para o homogeneizador rotativo de bacia *Cutter Tecmafrig* (São Paulo, SP, Brasil) junto com o sal, o tripolifosfato de sódio, o nitrito de sódio e o condimento para mortadela e, posteriormente, misturada por 3 min. Após a fragmentação e mistura, foram adicionados o óleo de *Echium* e o gelo, seguidos de homogeneização por 2 min. Finalmente, foi adicionado o amido de mandioca e misturado por mais 1 minuto, atingindo uma temperatura ideal inferior a 12 °C. Em seguida, a massa foi embutida em tripas plásticas (Viskase, Brasil) de 50 mm $\times$ 100 mm de comprimento, utilizando-se a embutidora Sirman ISFV25 (Veneza, Itália), amarradas em ambas as extremidades e cozidas em uma estufa de defumação e cozimento Arprotec SL218 (Valinhos, SP, Brasil), com o seguinte ciclo de aquecimento: cozimento com vapor direto a 60 °C por 1 hora, seguido de 70 °C por 2 horas e finalizando a 80 °C por mais 1 hora, até que o centro geométrico da mortadela atingisse os 72 ± 1 °C, monitorado com um termopar.

Após o cozimento, a mortadela foi imediatamente resfriada em um banho de gelo até atingir a temperatura ambiente, quando foi cortada em fatias de espessura igual a 3 mm, com exceção das fatias para a análise sensorial que foram cortadas com 5 mm de espessura. As fatias de mortadela foram separadas com discos de filme ou não, embaladas em bandejas de poliestireno e recobertas com filme de poli(cloreto de vinila) (PVC).

As bandejas foram dispostas no expositor de refrigeração Auden (Araucária, PR, Brasil) a 6 ± 1 °C por 7 dias, simulando condições críticas de varejo do supermercado. O expositor estava iluminado por uma lâmpada fluorescente TL 80 de 32 Watts (Philips, Brasil), ou seja, as bandejas contendo as fatias de mortadela estavam expostas à radiação direta de luz branca na superfície. No estudo de vida útil, as amostras foram analisadas os dias 1, 3, 5 e 7 de estocagem conforme Viuda-Martos et al. (2011).

5.12.2 Análises de composição centesimal da mortadela

Para a determinação da umidade e cinzas, foi utilizada a metodologia dos métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC 950,46) e (AOAC 920,153), respectivamente. As proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl (AOAC 981,10). Os lipídios foram determinados pelo método a frio, usando-se um extrator Soxhlet (AOAC 991,36). Os carboidratos foram determinados por diferença de massa. Para as análises, amostras

de mortadela foram liofilizadas no liofilizador Heto R403B (Heto-Holten, Dinamarca) e posteriormente trituradas no processador de alimentos Mixer IBP50 (Electrolux, Brasil) por aproximadamente 2 min. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

5.12.3 Tratamentos testados nas análises da mortadela fatiada estocada a 6 °C por 7 dias

Três tratamentos foram considerados para o estudo de aceitação sensorial e o estudo de vida útil, sendo, tratamento T₁ (mortadela com filme ativo F₂), tratamento T₂ (mortadela com filme controle F₀) e tratamento T₃ (mortadela sem filme). No entanto, para a análise microbiológica, um quarto tratamento foi considerado como tratamento controle positivo (T₄) somente para as bactérias *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*. Esse tratamento T₄ correspondeu àquelas amostras de mortadela fatiada estocada a 6 °C por 7 dias inicialmente inoculadas com *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*, porém embaladas sem filme.

5.12.4 Estudo de aceitação sensorial da mortadela fatiada estocada a 6 °C

O estudo de aceitação sensorial da mortadela fatiada estocada a 6 °C foi realizado apenas no terceiro lote de mortadela produzido, após dois dias de estocagem, como parte da caracterização do produto.

A análise sensorial foi realizada após verificar a inocuidade microbiana das amostras com relação a microrganismos patogênicos ou presença visível de colônias indicativas de deterioração microbiana, conforme descrito por Fernandes et al. (2014). 110 consumidores potenciais de mortadela foram recrutados dentre alunos e funcionários da FZEA, com idade entre 18 e 38 anos (39% homens e 61% mulheres), no próprio dia da análise. Os consumidores receberam o formulário de consentimento livre e esclarecido para ser lido e assinado antes da realização da análise sensorial, o qual foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da FZEA, USP com protocolo CAAE 74600117.2.0000.5422 (Anexo I).

O teste de aceitação sensorial foi realizado utilizando-se uma escala hedônica de 9 pontos para avaliar os atributos sensoriais (sabor, aroma, textura, cor e qualidade global) das amostras. Para a avaliação, os consumidores foram situados em cabines individuais, iluminadas por luz branca em uma área controlada conforme a Norma ISO 11136 (2014). Fatias de mortadela com espessura de 5 mm foram servidas de forma monádica sequencial em pratos plásticos descartáveis codificados com números de três dígitos à temperatura ambiente. Cada consumidor degustou de forma independente as amostras dos três tratamentos apresentados em ordem aleatória, sendo que entre cada amostra foram fornecidas água, à temperatura ambiente,

e bolacha “*água e sal*” para limpar o paladar. Os atributos avaliados e seus descritores estão apresentados na ficha de avaliação sensorial apresentada no Apêndice A. Os resultados foram analisados estatisticamente conforme descrito na norma ISO 11136: 2014.

5.13 Estudo de vida útil da mortadela fatiada estocada a 6 °C por 7 dias

A vida útil das amostras de mortadela fatiada estocada a 6 °C por 7 dias, foi avaliada por meio de análises de cor, pH, Aa, oxidação de lipídios e análises microbiológicas das amostras coletadas nos dias 1, 3, 5 e 7 de estocagem.

5.13.1 Análises Físico-Químicas

5.13.1.1 Cor

As medidas de cor objetiva foram feitas em três diferentes pontos da superfície das fatias de mortadela imediatamente após a abertura da bandeja. Para isso, foi utilizado o colorímetro Miniscan EZ (HunterLab, Reston, EUA) no sistema de avaliação CIELab (CIE, 1986), conforme descrito no item **5.10.7**.

5.13.1.2 pH

Para a determinação do pH, 5 g de amostra de mortadela foram misturadas com 45 mL de água destilada usando-se o homogeneizador Ultra-Turrax® T25 (IKA, Labortechnik, Alemanha) a 5000 rpm durante 2 min. Em seguida, um pH-metro digital portátil (PG1400, Gehaka, Brasil) foi usado, com imersão direta do eletrodo na suspensão resultante (FERNANDES et al., 2014).

5.13.1.3 Atividade de água (Aa)

A Aa foi medida com uma amostra triturada, utilizando-se o medidor de atividade de água AquaLab CX-2 (Decagon Devices, Pullman, EUA), a 20 °C (LIU et al., 2012).

5.13.1.4 Oxidação de lipídios

A oxidação lipídica das fatias de mortadela, analisada segundo método descrito por Vyncke (1975). Essa análise foi baseada na determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), pela quantificação do malonaldeído (MAD), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados formado durante o processo oxidativo (Pires, 2017). Os valores de TBARs foram calculados usando uma

curva padrão de 1,1-3,3 tetraetoxipropano (TEP) e expressos como mg de MDA/kg de amostra (LIU et al., 2012).

5.13.2 Análise microbiológica

A vida útil das fatias de mortadela estocadas a 6 °C por 7 dias foi acompanhada por análises para determinação de bactérias deteriorantes de mortadela, entre elas coliformes totais, bactérias acidoláticas (BAL), mesófilos e psicotróficos aeróbicos. Contagem de bactérias *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* que foram inicialmente inoculadas por aspersão sobre um dos lados de cada fatia de mortadela, numa população inicial de 10^7 UFC/mL, também foi realizada.

As análises microbiológicas foram realizadas segundo metodologia descrita por Fernandes et al. (2014). Amostras de mortadela (25 g) foram cortadas, colocadas em sacos estéreis (3M company, Brasil) contendo 225 mL de solução de água peptonada estéril (0,1% m/v) (Merck, Brasil) e homogeneizadas em um *stomacher* (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) durante 2 min, a 100 rpm e temperatura ambiente. Para cada amostra, prepararam-se diluições decimais em série usando tubos de ensaio ou tubos *ependorf* contendo 9 mL ou 900 µL de solução de água peptonada (0,1 m/v%), respectivamente. 1 mL ou 0,1 mL destas diluições foram colocados sobre placas de agar seletivos.

Os microrganismos mesófilos aeróbicos foram determinados em placas Petrifilm™ (3M company, Brasil) contendo o agar *plate count* (PCA, Oxoid) e incubadas a 37 °C por 48 horas conforme o método padrão A.O.A.C. 989,10 (AOAC, 1991). Os psicotróficos aeróbicos foram determinados seguindo a metodologia descrita por Silva et al. (2010) com ligeiras modificações. Placas Petrifilm™ contendo o agar PCA, foram inoculadas com 1 mL das diluições da amostra e foram incubadas inicialmente a 17 °C por 16 horas e posteriormente a 7 °C por 3 dias para a contagem. As BAL foram identificadas em agar MRS incubado em microaerobiose a 37 °C por 48 h (SILVA et al., 2010). Os coliformes totais foram identificados utilizando placas Petrifilm™ incubadas a 37 °C durante 24 h seguindo as recomendações do fornecedor e do método A.O.A.C. 989,10 (AOAC, 1991).

A quantidade de UFC das cepas *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* inoculadas nas fatias de mortadela foi determinada usando o método proposto por Miles e Misra (1938) empregando o agar TSA e o agar *Listeria* Ottaviani e Agosti, respectivamente. Em ambos os casos, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

Os resultados das contagens microbiológicas foram expressos como logaritmo de número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (Log UFC/g).

5.14 Análises estatísticas

Os resultados das análises das caracterizações das nanoemulsões e dos filmes, foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística desses dados foi realizada por meio da análise de variância simples (ANOVA) utilizando o software *Statgraphics® centurion XVI* (STATPOINT, 2009). Os valores médios obtidos foram submetidos ao teste de intervalos múltiplos de Duncan e, em todos os casos, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Para os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas no estudo de vida útil da mortadela, foi feita uma ANOVA com dois fatores para cada resposta: tratamento e tempo de armazenamento. O teste de Duncan foi empregado para determinar a significância estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias. Para isso, utilizou-se o software *Statgraphics® XVI* (STATPOINT, 2009).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos agentes ativos

6.1.1 Atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM)

Considerando-se que o α -tocoferol é um agente exclusivamente antioxidante, essas análises foram realizadas apenas com os outros dois agentes ativos. Na Tabela 6 são apresentados os resultados da atividade antimicrobiana e da concentração inibitória mínima do cinamaldeído (Cin) e do óleo essencial de alho (OEA). Assim, observou-se que o Cin mostrou maior efeito inibitório do que o OEA contra todas as cepas testadas (Tabela 6). Sanla-Ead et al. (2012) identificaram efeito inibitório do cinamaldeído contra as mesmas bactérias testadas nesta tese. Os grupos funcionais da estrutura química do Cin são os principais responsáveis pela sua atividade antimicrobiana, uma vez que eles causam ruptura da membrana citoplasmática e coagulação do conteúdo celular, inibem a produção de enzimas essenciais às bactérias e provocam danos nas paredes celulares das mesmas (SANLA-EAD et al. 2012).

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) e atividade antimicrobiana dos agentes ativos contra diferentes bactérias*

Bactérias	Cinamaldeído		CIM ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Óleo E. de alho		CIM ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Cloranfenic. 2,5% w/v
	50% v/v	100%		50% v/v	100%		
<i>L. monocytog.</i>	++++	++++	NA	++++	++++	NA	++++
<i>P. aeruginosa</i>	++++	++++	NA	++++	++++	NA	++++
<i>S. aureus</i>	++++	++++	NA	+++	++++	NA	++++
<i>E. coli</i>	++++	++++	NA	—	—	NA	++++
<i>S. enteritidis</i>	++++	++++	NA	+	+	NA	++++
<i>L. monocytog.</i> ATCC 35152	++++	++++	0,1	++++	++++	5,0	++++
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692	++++	++++	0,125	++++	++++	10,0	++++

* Não atividade antimicrobiana (—); zona de inibição <1 mm, ligeira atividade antimicrobiana (+); Zona de inibição 2–3 mm, alta atividade antimicrobiana (+++); zona de inibição 6–9 mm, forte atividade antimicrobiana (++++); zona de inibição >9 mm. NA: Não avaliado. **Fonte:** Própria autoria.

Por outro lado, o OEA não apresentou atividade antimicrobiana frente à *E. coli* e mostrou uma ligeira inibição no crescimento da *S. enteritidis* (Tabela 6). Fujisawa et al. (2009) e Kim, Kim e Kyung (2004) também relataram que bactérias *Gram-negativas* foram menos sensíveis ao poder inibitório do OEA do que as *Gram-positivas* testadas pelos autores. Segundo

Perry et al. (2009), a resistência das bactérias *Gram-negativas* ao efeito do OEA e dos seus compostos sulfurosos, tal como a alicina, está relacionada à falha da penetração desses compostos na membrana externa que recobre a camada fina de peptidoglicano da célula em razão da presença e da característica de moléculas lipopolissacarídicas nessas células.

Embora o OEA não tenha apresentado efeito inibitório contra *E. coli* e tenha demonstrado um menor efeito contra *S. enteritidis*, pode-se afirmar que ambos os compostos atuaram como agentes antimicrobianos frente a uma ampla gama de bactérias, independentemente de serem *Gram-negativas* ou *Gram-positivas*, isto é, as bactérias analisadas foram sensíveis à ação do Cin e do OEA quando testadas em contato direto de forma pura (100%) ou em solução (50% v/v). O efeito inibitório do OEA e do Cin contra bactérias, vírus, fungos, leveduras e outros microrganismos tem sido amplamente investigado (CORZO-MARTÍNEZ; CORZO; VILLAMIEL, 2007; FUJISAWA et al., 2009; KYUNG, 2012; SANLA-EAD et al. 2012; WEI et al., 2011).

A CIM foi definida como a menor concentração do agente ativo que permitiu inibir o crescimento do número de células em até 99.9%, ou seja, com uma redução de 3 escalas logarítmicas da contagem inicial de UFC/mL (MILES; MISRA, 1938). Os valores de CIM obtidos para o cinamaldeído foram inferiores aos de óleo essencial de alho em ambos os microrganismos: 0,1 e 0,125 mg/g para *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*, respectivamente (Tabela 6). Esses valores aproximaram-se ao determinado por Goñi et al. (2009) para o óleo essencial de canela (0,05 mg/g) testado em *L. monocytogenes*, mas foram inferiores aos determinados por Sanla-Ead et al. (2012) e Unlu et al. (2010) para Cin e óleo essencial de canela, quando testados contra *L. monocytogenes* (6,25 e 0,56 mg/g) e *P. aeruginosa* (12,5 e 0,28 mg/g), respectivamente.

Por outro lado, os valores de CIM determinados nesta tese para OEA contra *P. aeruginosa* foram compatíveis com aqueles observados por Kallel et al. (2014) para extrato de alho (10 mg/g), porém, superiores às CIM determinadas por Razavi Rohani et al. (2011) e Sung et al. (2014b) para OEA quando testado contra *L. monocytogenes* (0,1 e 0,02 mg/g).

Na Figura 14 estão apresentadas imagens contendo placas com halos de inibição nas quais se demonstram a atividade antimicrobiana ou não do Cin (esquerda) e o OEA (direita) frente às bactérias testadas.

Figura 14 – Placas com halos de inibição do cinamaldeído (esquerda) e óleo essencial de alho (direita) frente a: A₁₋₂) *L. monocytogenes*; B₁₋₂) *P. aeruginosa*; C₁₋₂) *S. aureus*; D₁₋₂) *E. coli*; E₁₋₂) *S. enteritidis*; F₁₋₂) *L. monocytogenes* ATCC 35152; G₁₋₂) *P. aeruginosa* ATCC 15692, F₁₋₂) *L. monocytogenes* ATCC 35152; G₁₋₂) e *P. aeruginosa* ATCC 15692 *Continua...*

Fonte: Própria autoria.

Figura 14 – Placas com halos de inibição do cinamaldeído (esquerda) e óleo essencial de alho (direita) frente a: A₁₋₂) *L. monocytogenes*; B₁₋₂) *P. aeruginosa*; C₁₋₂) *S. aureus*; D₁₋₂) *E. coli*; E₁₋₂) *S. enteritidis*; F₁₋₂) *L. monocytogenes* ATCC 35152; G₁₋₂) *P. aeruginosa* ATCC 15692, F₁₋₂) *L. monocytogenes* ATCC 35152; G₁₋₂) e *P. aeruginosa* ATCC 15692 **Conclusão**

Fonte: Própria autoria.

6.1.2 Atividade antioxidante

Na Tabela 7 são apresentados os valores de atividade antioxidante do α -tocoferol, cinamaldeído e óleo essencial de alho. Conforme esperado, o α -t foi o agente ativo com maior atividade antioxidante ($p < 0,05$), nos três métodos testados. O valor EC₅₀ do α -t (7,6 μ g/mL) obtido nesta tese frente ao radical DPPH[•], foi similar àquele obtido para o BHA (7,5 μ g/mL) (HENDEL; LAROUS; BELBEY, 2016), porém, menor àqueles descritos para α -t (14,4 μ g/mL) e BHT (12,2 μ g/mL) (EL-BAROTY et al., 2010). A atividade de sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} é influenciada pela polaridade do meio de reação, a estrutura química do agente antioxidante e o pH da mistura de reação, portanto, essa diferença nos valores EC₅₀ dos agentes ativos pode ter sido em razão de um ou mais desses fatores (SHARMA; BHAT, 2009).

Tabela 7 - Capacidade de sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} e poder de redução do íon férrico FRAP dos agentes ativos*

Agentes ativos	DPPH [•]	ABTS ^{•+}		FRAP
	EC ₅₀ (μ L/mL)	EC ₅₀ (μ L/mL)	TEAC (mM/ μ L)	EC ₁ (μ L/mL)
α -tocoferol	0,008 $\pm$ 0,00 ^c	0,01 $\pm$ 0,00 ^c	1,86	0,002 $\pm$ 0,00 ^a
Cinamaldeído	2,48 $\pm$ 0,01 ^b	1,31 $\pm$ 0,03 ^b	0,008	1,07 $\pm$ 0,20 ^c
Óleo essencial de alho	74,34 $\pm$ 2,50 ^a	78,9 $\pm$ 1,8 ^a	0,00013	0,06 $\pm$ 0,01 ^b

*Valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. **Fonte:** Própria autoria.

Os três agentes avaliados foram capazes de reduzir mais do 50% os radicais estáveis DPPH[•] e ABTS^{•+} de cores púrpura e azul à forma DPPH-H e ABTS[•] de cor amarela (BOZIN et al., 2008). Os valores EC₅₀ atingidos na medição da redução desses cátions radicais foram superiores àqueles descritos por Bozin et al. (2008), Haripriya; Nadhiya e Vijayalakshmi (2013) e Lawrence e Lawrence (2011), para extratos de alho (1,03 – 6,01 µL/mL), Cin (0,38 µL/mL) e OEA (0,5 µL/mL), respectivamente, ao reduzirem o radical DPPH[•], ou superior àquele descrito por Re et al. (1999) para o α -t (0,97 $\pm$ 0,06 TEAC mM), ao reduzir o radical ABTS^{•+}.

No caso dos testes com o reagente FRAP, outro indicador significativo do poder antioxidante dos agentes ativos testados, a redução do íon Fe³⁺ a Fe²⁺ foi associada à atividade de doação de um elétron, importante mecanismo de ação antioxidante dos compostos fenólicos do α -t, Cin e OEA testados (HARIPRIYA; NADHIYA; VIJAYALAKSHMI, 2013). Haripriya; Nadhiya e Vijayalakshmi (2013) e Lawrence e Lawrence (2011) identificaram valores EC₁ de 0,46 e 0,003 µL/mL para o Cin e OEA, nessa ordem, valores esses maior e menor, respectivamente, que os determinados nesta tese.

6.2 Balanço hidrofílico-lipofílico dos emulsificantes

Para determinar o balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) da mistura adequada de emulsificantes, teve-se como referência a emulsão que apresentou maior estabilidade, ou seja, aquela que não apresentou aspecto grosseiro, nem separação de fases após a pré-emulsão e homogeneização no Ultra-Turrax[®], mantendo-se estável por 24 horas. A emulsão que se mostrou mais homogênea foi produzida com mistura Tween 20:Span 60 na relação 70:30, com um valor de BHL igual a 11,8 (N^o 7 na Figura 15). Neste caso, essa mistura ideal de emulsificantes ofereceu a máxima estabilidade aos sistemas emulsionados (N₁, N₂ e N₃), atuando como barreira à separação de fases (LEAL et al., 2013).

Figura 15 - Emulsões O/A preparadas com diferentes relações de Tween 20:Span 60

Fonte: Própria autoria.

6.3 Definição das condições ótimas de processo das nanoemulsões

A matriz do delineamento experimental para a otimização das condições de processo das nanoemulsões N₁, assim como os valores experimentais e previstos pelo modelo para cada uma das respostas, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Matriz do delineamento e valores experimentais e previstos do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N₁

Corrida	P, X ₁ (MPa)	Ciclos, X ₂	T, X ₃ (°C)	Diâmetro médio de gota (nm)		Polidispersidade		Estabilidade	
				Exper.	Prev.	Exper.	Prev.	Exper.	Prev.
1	20	3	41,1	148,7	160,5	0,14	0,14	0,6	0,5
2	60	3	42,5	118,6	106,7	0,19	0,19	0,6	0,7
3	60	3	42,5	107,8	106,7	0,20	0,19	0,6	0,7
4	100	1	70,0	124,5	124,0	0,14	0,14	0,7	0,7
5	100	3	15,0	76,3	77,6	0,17	0,18	0,7	0,7
6	20	2	39,8	181,2	174,4	0,15	0,15	0,6	0,6
7	20	1	70,0	235,9	235,5	0,13	0,12	0,1	0,1
8	60	1	28,8	152,7	145,8	0,20	0,18	0,5	0,5
9	20	2	66,0	175,9	179,8	0,11	0,11	0,3	0,4
10	100	3	70,0	86,7	89,3	0,12	0,13	0,7	0,6
11	64	2	15,0	98,7	103,5	0,18	0,18	0,7	0,7
12	60	1	28,8	140,3	145,8	0,17	0,18	0,6	0,5
13	60	1	28,8	141,2	145,8	0,17	0,18	0,5	0,5
14	100	2	19,4	87,9	87,9	0,17	0,16	0,6	0,6
15	100	1	15,0	119,7	118,6	0,16	0,15	0,5	0,5
16	41,2	3	15,0	102,0	103,0	0,18	0,18	0,6	0,6
17	56	2	70,0	109,6	110,8	0,13	0,13	0,5	0,5
18	20	1	15,0	191,2	190,0	0,14	0,14	0,2	0,2
19	20	3	70,0	188,8	183,3	0,09	0,09	0,2	0,2
20	60	3	42,5	99,0	106,7	0,19	0,19	0,7	0,7
21	41,2	3	15,0	109,0	103,1	0,18	0,18	0,6	0,6
22	100	2	45,3	83,8	80,6	0,16	0,16	0,7	0,7

Fonte: Própria autoria.

A matriz do delineamento experimental para a otimização das condições de processo das nanoemulsões N₂ e N₃, assim como os valores experimentais e previstos pelo modelo para cada uma das respostas, estão apresentados nas Tabelas 9 e 10. Cabe esclarecer que para as nanoemulsões N₂ e N₃ foi desenvolvido um segundo planejamento experimental em razão de que ao otimizar as condições de processo da nanoemulsão N₁, observou-se que 1 ciclo de homogeneização não teve efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a variabilidade das três respostas avaliadas no estudo, portanto, decidiu-se eliminar esse nível do fator número de ciclos e, conseqüentemente, reduzir o número de experimentos.

Tabela 9 - Matriz do delineamento e valores experimentais e previstos do do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N₂

Corrida	P, X ₁ (MPa)	Ciclos, X ₂	T, X ₃ (°C)	Diâmetro médio de gota (nm)		Polidispersidade		Estabilidade	
				Exper.	Prev.	Exper.	Prev.	Exper.	Prev.
1	60	2	15,0	108,3	109,4	0,17	0,14	0,5	0,5
2	100	2	42,5	97,2	104,1	0,16	0,19	0,6	0,5
3	60	2	42,5	114,4	118,4	0,16	0,19	0,4	0,5
4	60	3	70,0	101,9	103,8	0,16	0,14	0,6	0,5
5	60	3	42,5	103,8	104,7	0,18	0,18	0,5	0,5
6	20	3	70,0	158,1	159,5	0,14	0,15	0,4	0,4
7	100	3	15,0	90,6	93,1	0,17	0,12	0,6	0,6
8	20	2	70,0	182,2	181,4	0,14	0,18	0,4	0,4
9	60	3	15,0	102,8	102,4	0,18	0,11	0,5	0,5
10	60	2	70,0	125,8	124,1	0,16	0,13	0,5	0,5
11	20	2	42,5	173,2	172,3	0,15	0,18	0,4	0,4
12	60	3	42,5	110,5	104,7	0,17	0,18	0,5	0,5
13	20	3	15,0	151,1	151,4	0,16	0,18	0,4	0,4
14	100	3	70,0	88,6	87,7	0,16	0,16	0,6	0,7
15	100	2	15,0	102,1	98,5	0,17	0,15	0,6	0,6
16	100	2	42,5	109,1	104,1	0,18	0,18	0,5	0,5

Fonte: Própria autoria.

Tabela 10 - Matriz do delineamento e valores experimentais e previstos do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N₃

Corrida	P, X ₁ (MPa)	Ciclos, X ₂	T, X ₃ (°C)	Diâmetro médio de gota (nm)		Polidispersidade		Estabilidade	
				Exper.	Prev.	Exper.	Prev.	Exper.	Prev.
1	60	2	15,0	105,4	102,9	0,19	0,20	0,5	0,5
2	100	2	42,5	90,3	90,4	0,16	0,17	0,6	0,6
3	60	2	42,5	108,4	105,2	0,18	0,19	0,5	0,5
4	60	3	70,0	95,3	104,2	0,14	0,14	0,5	0,6
5	60	3	42,5	85,9	89,4	0,18	0,17	0,6	0,6
6	20	3	70,0	186,6	185,0	0,10	0,10	0,5	0,5
7	100	3	15,0	79,9	86,2	0,14	0,15	0,7	0,7
8	20	2	70,0	211,4	202,6	0,10	0,10	0,3	0,4
9	60	3	15,0	95,5	88,7	0,17	0,17	0,6	0,6
10	60	2	70,0	114,4	121,5	0,15	0,15	0,5	0,5
11	20	2	42,5	166,3	174,4	0,15	0,15	0,4	0,4
12	60	3	42,5	96,4	89,4	0,17	0,17	0,6	0,6
13	20	3	15,0	143,3	145,6	0,14	0,14	0,5	0,5
14	100	3	70,0	83,4	77,8	0,13	0,13	0,7	0,7
15	100	2	15,0	99,4	100,1	0,18	0,17	0,6	0,6
16	100	2	42,5	92,0	90,4	0,17	0,17	0,5	0,6

Fonte: Própria autoria.

Os resultados experimentais apresentados nas tabelas 8, 9 e 10 serão discutidos mais adiante, em 6.3.1, 6.3.2 e 6.3.3.

Os resultados das análises estatísticas, ou seja, da análise ANOVA, estão apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13. Pode-se observar nesses resultados que as equações polinomiais ajustadas representaram adequadamente os dados experimentais do diâmetro médio de gota, da polidispersidade e da estabilidade, com altos coeficientes de determinação ($R^2 > 0,90$). Os modelos quadráticos, ajustados aos dados experimentais, puderam explicar adequadamente mais de 90% da variabilidade dessas propriedades físico-químicas em função das condições de processamento das nanoemulsões (ANARJAN et al., 2011). O modelo estimado não apresentou falta de ajuste significativa ($p > 0,05$). Além disso, os resíduos padronizados seguiram uma distribuição normal e não foram detectadas observações atípicas.

Tabela 11 - Valor F e valor p dos coeficientes de regressão e coeficiente de determinação do modelo polinomial de segunda ordem para a nanoemulsão N₁

Efeito	Diâmetro médio de gota		Polidispersidade		Estabilidade	
	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
Regressão	54,06	< 0,0001	11,2	0,0003	11,11	0,0003
Pressão, X ₁	346,0	< 0,0001	9,3	0,0124	43,8	<0,0001
Ciclos, X ₂	77,72	< 0,0001	0,54	0,5971	13,9	0,0013
Temperatura, X ₃	19,54	0,0013	27,1	0,0004	3,63	0,086
X ₁ X ₂	1,87	0,2045	0,50	0,6204	4,41	0,0424
X ₁ X ₃	13,14	0,0047	0,012	0,9153	8,65	0,0148
X ₂ X ₃	4,18	0,0480	3,51	0,070	3,48	0,0712
X ₁ ²	21,27	0,0010	21,7	0,0009	2,26	0,1634
X ₃ ²	1,15	0,3095	13,0	0,0048	10,35	0,0092
Falta de ajuste	0,97	0,5146	0,47	0,786	1,79	0,269
R ²	0,98		0,93		0,92	

Fonte: Própria autoria.**Tabela 12** - Valor F e valor p dos coeficientes de regressão e coeficiente de determinação do modelo polinomial de segunda ordem para a nanoemulsão N₂

Efeito	Diâmetro médio de gota		Polidispersidade		Estabilidade	
	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
Regressão	73,2	< 0,0001	8,35	0,006	33,9	<0,0001
Pressão, X ₁	387,8	< 0,0001	26,7	0,001	223,1	<0,0001
Ciclos, X ₂	28,7	0,0011	2,4	0,169	5,9	0,046
Temperatura, X ₃	6,04	0,044	5,4	0,053	1,4	0,270
X ₁ X ₂	0,23	0,6494	2,79	0,139	1,73	0,230
X ₁ X ₃	2,6	0,1508	0,14	0,717	1,59	0,248
X ₂ X ₃	4,13	0,0816	2,15	0,186	0,13	0,724
X ₁ ²	65,3	<0,0001	13,2	0,008	0,29	0,609
X ₃ ²	0,37	0,5647	2,61	0,150	21,4	0,002
Falta de ajuste	0,26	0,9023	0,47	0,30	1,63	0,423
R ²	0,99		0,90		0,97	

Fonte: Própria autoria.

Tabela 13 - Valor F e valor p dos coeficientes de regressão e coeficiente de determinação do modelo polinomial de segunda ordem para a nanoemulsão N₃

Efeito	Diâmetro médio de gota		Polidispersidade		Estabilidade	
	Valor F	Valor p	Valor F	Valor F	Valor p	Valor F
Regressão	42,3	< 0,0001	33,2	< 0,0001	17,1	0,0006
Pressão, X ₁	198,2	< 0,0001	16,3	0,0049	64,3	<0,0001
Ciclos, X ₂	12,4	0,010	20,2	0,0028	56,7	0,0001
Temperatura, X ₃	8,8	0,021	75,7	< 0,0001	1,42	0,272
X ₁ X ₂	2,9e-03	0,960	0,34	0,580	33,0	0,0007
X ₁ X ₃	10,7	0,014	3,37	0,109	0,057	0,8182
X ₂ X ₃	0,07	0,803	3,97	0,087	0,31	0,593
X ₁ ²	39,9	0,0004	67,9	< 0,0001	0,78	0,406
X ₃ ²	2,31	0,172	15,5	0,006	0,20	0,664
Falta de ajuste	2,98	0,270	8,87	0,104	8,53	0,108
R ²	0,98		0,97		0,95	

Fonte: Própria autoria.

6.3.1 Diâmetro médio de gota

Nas Tabelas 8, 9 e 10 estão apresentados os valores do diâmetro médio de gotas das três nanoemulsões preparadas nas condições ótimas. Nessas tabelas observou-se que se produziu nanoemulsões em todos os delineamentos experimentais, considerando-se diâmetros de gotas menores que 100 nm (MASON et al., 2006; TALEGAONKAR et al., 2010). Nas emulsões N₁ e N₂, as nanoemulsões foram produzidas nas condições experimentais de 100 MPa e 2 ou 3 ciclos, nas temperaturas de evaporação estudadas, ao passo que na N₃ observou-se nanoemulsões nas condições experimentais também de 100 MPa e 2 ou 3 ciclos e 60 MPa e 3 ciclos, ou seja, aparentemente, foi mais fácil produzir nanoemulsões com essa formulação. Esse comportamento poderia estar associado a algum tipo de sinergia entre o OEA e o cinamaldeído, que pode ter afetado a densidade e/ou viscosidade da fase lipídica.

Para a nanoemulsão N₁, as variáveis com efeito significativo na redução do diâmetro médio de gota (Dm) foram a pressão de homogeneização e o número de ciclos ($p < 0,0001$), assim como a temperatura de evaporação, a interação entre pressão e temperatura, temperatura e número de ciclos e pressão ao quadrado ($p < 0,05$) (Tabela 11). Para a nanoemulsão N₂, as variáveis com efeito significativo foram a pressão de homogeneização e o seu quadrado

($p < 0,0001$), assim como o número de ciclos e a temperatura de evaporação ($p < 0,05$) (Tabela 12). Para a nanoemulsão N₃, as variáveis com efeito significativo foram a pressão de homogeneização ($p < 0,0001$), bem como o número de ciclos, a temperatura de evaporação, a interação entre pressão e temperatura e a pressão ao quadrado ($p < 0,05$) (Tabela 13).

As equações calculadas pela otimização do modelo quadrático, para o diâmetro médio das gotas, apenas com parâmetros significativos, estão apresentadas a seguir:

- **Nanoemulsão N₁**

$$D_{m(1 \text{ Ciclo})} = 153,3 - 43,2 X_I + 12,7 X_3 - 10,0 X_I X_3 + 18,2 X_I^2 \quad \text{Eq. (29)}$$

$$D_{m(2 \text{ Ciclos})} = 110,4 - 43,2 X_I - 1,1 X_3 - 10,0 X_I X_3 + 18,2 X_I^2 \quad \text{Eq. (30)}$$

$$D_{m(3 \text{ Ciclos})} = 106,7 - 43,2 X_I + 15,9 X_3 - 10,0 X_I X_3 + 18,2 X_I^2 \quad \text{Eq. (31)}$$

Sendo que D_m representa o diâmetro médio de gota (nm), X_I a pressão de homogeneização e X_3 a temperatura de evaporação.

- **Nanoemulsão N₂**

$$D_{m(2 \text{ Ciclos})} = 118,4 - 33,3 X_I + 4,02 X_3 + 19,8 X_I^2 \quad \text{Eq. (32)}$$

$$D_{m(3 \text{ Ciclos})} = 104,7 - 33,3 X_I + 4,02 X_3 + 19,8 X_I^2 \quad \text{Eq. (33)}$$

Sendo que D_m representa o diâmetro médio de gota (nm), X_I a pressão de homogeneização e X_3 a temperatura de evaporação.

- **Nanoemulsão N₃**

$$D_{m(2 \text{ Ciclos})} = 105,2 - 41,8 X_I + 8,52 X_3 - 11,9 X_I X_3 + 27,2 X_I^2 \quad \text{Eq. (34)}$$

$$D_{m(3 \text{ Ciclos})} = 89,4 - 41,8 X_I + 8,52 X_3 - 11,9 X_I X_3 + 27,2 X_I^2 \quad \text{Eq. (35)}$$

Sendo que D_m representa o diâmetro médio de gota (nm), X_I a pressão de homogeneização e X_3 a temperatura de evaporação.

De acordo com esses modelos (Eqs. 29-35), pode-se considerar que D_m será menor nas emulsões preparadas com maior número de ciclos, em razão das diferenças no resíduo. Por outro lado, observa-se que o aumento da pressão de homogeneização provoca diminuição de D_m , ao passo que o aumento somente da temperatura de evaporação produz um aumento não desejado ($p < 0,05$) nessa resposta, com exceção para N_1 e 2 ciclos (Eq. 30). Esses resultados estão de acordo com aqueles descritos por Anarjan et al. (2010, 2011); Cheong et al. (2008); Mehmood (2015); Tan e Nakajima (2005); Tang; Shridharan e Sivakumar (2013) e Yuan et al. (2008a,b), que, de forma geral, observaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de D_m com o aumento da pressão de homogeneização e/ou número de ciclos.

Em geral, o aumento da pressão de homogeneização e do número de ciclos provoca redução de D_m da nanoemulsão por causa da força de cisalhamento nas condições de turbulência na câmara de interação do equipamento, causando a ruptura das membranas interfaciais (MCCLEMENTS, 2012) e provocando reduções do tamanho de gota das emulsões (ANARJAN et al., 2010; MEHMOOD, 2015). De acordo com Anarjan et al. (2011), estes parâmetros de emulsificação são considerados os mais críticos para controlar o diâmetro médio de gota durante o preparo das nanoemulsões.

Outro fator que afetou significativamente ($p < 0,05$) o D_m foi a temperatura na etapa de evaporação do solvente, já que ela pode ter afetado a viscosidade e/ou a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa, assim como a estrutura molecular do emulsificante (FLOURY et al., 2003; YUAN et al., 2008a,b), o que pode ter controlado o tamanho e a forma das gotas de óleo (ANARJAN et al., 2010).

As superfícies 3-D dos modelos de regressão polinomial foram geradas para ilustrar o efeito interativo das variáveis independentes sobre a resposta D_m (Figura 16) e foram apresentadas somente para o máximo número de ciclos (3 ciclos) nas três nanoemulsões, tendo em conta que não houve muita variação com as superfícies obtidas para 1 e 2 ciclos. Essas superfícies ilustram o comportamento do diâmetro médio das gotas, que diminui quando se aplicam a maior pressão de homogeneização e a menor temperatura de evaporação, mantendo constante o máximo número de ciclos.

Figura 16 - Superfície de resposta 3-D para o diâmetro médio de gotas em função da pressão de homogeneização e temperatura de evaporação com 3 ciclos. A) Nanoemulsão N₁; B) Nanoemulsão N₂; C) Nanoemulsão N₃

Fonte: Própria autoria.

6.3.2 Polidispersidade (PD)

Os valores de polidispersidade (PD) apresentados nas Tabelas 8 – 10 para N₁, N₂ e N₃ variaram pouco entre experimentos (0,09 – 0,20), ou seja, todas as nanoemulsões tiveram PD muito baixa. Em todos os casos, os valores de PD mantiveram-se inferiores a 0,2, independentemente das condições de processo, portanto, pode ser inferido que as três nanoemulsões tiveram uma distribuição de tamanho de gotas estreita e monomodal.

Para as nanoemulsões N₁ e N₂, as variáveis com efeito significativo no valor de PD foram a pressão de homogeneização e a temperatura de evaporação, assim como a pressão e temperatura ao quadrado ($p < 0,05$) (Tabelas 11 e 12). Na polidispersidade, o número de ciclos não teve efeito significativo ($p > 0,05$). Os termos não significativos foram omitidos do modelo reduzido apresentado em termos de fatores codificados (Eq. 36 e 37).

- **Nanoemulsão N₁**

$$PD = 0,18 + 0,01 X_1 - 0,02 X_3 - 0,03 X_1^2 - 0,02 X_3^2 \quad \text{Eq. (36)}$$

Sendo que PD representa a polidispersidade, X_1 a pressão de homogeneização e X_3 a temperatura de evaporação.

- **Nanoemulsão N₂**

$$PD = 0,17 + 0,01 X_1 - 4,5 \times 10^{-03} X_3 - 5 \times 10^{-03} X_1^2 \quad \text{Eq. (37)}$$

Sendo que PD representa a polidispersidade, X_1 a pressão de homogeneização e X_3 a temperatura de evaporação.

Para a nanoemulsão N₃, as variáveis com efeito significativo no valor de PD foram a pressão de homogeneização, o número de ciclos e a temperatura de evaporação ($p < 0,0001$), assim como pressão ($p < 0,0001$) e temperatura ao quadrado ($p < 0,05$) (Tabela 13).

Pelo fato de o número de ciclos ter efeito significativo ($p < 0,05$) sobre PD, os valores codificados desse fator foram substituídos para se obter o modelo de regressão quadrática quando se testaram 2 e 3 ciclos de homogeneização no preparo desta nanoemulsão. Os modelos reduzidos para cada número de ciclo, em termos de fatores codificados, estão apresentados a seguir:

- **Nanoemulsão N₃**

$$PD_{(2 \text{ Ciclos})} = 0,19 + 9,3 \times 10^{-03} X_I - 0,02 X_3 + 0,03 X_I^2 \quad \text{Eq. (38)}$$

$$PD_{(3 \text{ Ciclos})} = 0,17 + 9,3 \times 10^{-03} X_I - 0,02 X_3 + 0,03 X_I^2 \quad \text{Eq. (39)}$$

Sendo que PD representa a polidispersidade, X_I a pressão de homogeneização e X_3 a temperatura de evaporação.

Analisando-se os modelos acima, independentemente do número de ciclos testados, as nanoemulsões com a distribuição de tamanho de gotas mais estreita (menor valor PD) foram aquelas obtidas com baixas pressões de homogeneização e altas temperaturas de evaporação do solvente. Estes resultados foram similares aos observados por Anarjan et al. (2010). Porém, esses autores descreveram que o aumento da pressão de homogeneização teve um efeito negativo ($p < 0,05$) sobre o valor de PD , contrariamente ao observado nesta tese. Cheong et al. (2008) também observaram influência significativa ($p < 0,05$) da pressão de homogeneização sobre PD , contudo, sem efeito significativo ($p > 0,05$) do número de ciclos, comportamento distinto ao observado em outros trabalhos (ANARJAN et al., 2011; CHU et al., 2007; FLOURY; DESRUMAUX; LARDIÈRES, 2000; TANG; SHRIDHARAN; SIVAKUMAR, 2013).

As superfícies 3-D dos modelos de regressão polinomial foram geradas para ilustrar o efeito interativo das variáveis independentes sobre a resposta polidispersidade (Figura 17) e foram apresentadas somente para o máximo número de ciclos (3 ciclos) nas três nanoemulsões, tendo em conta que não houve muita variação com as superfícies obtidas para 2 ciclos. Essas superfícies representam ótimos não necessariamente interessantes, pois são máximos, e se busca menores valores de PD . Assim, os menores valores de PD se apresentam quando empregam-se a maior ou menor pressão de homogeneização (100 e 20 MPa) e a maior temperatura de evaporação do solvente (70 °C) no preparo das nanoemulsões.

Figura 17 - Superfície de resposta 3-D para a polidispersidade em função da pressão de homogeneização e temperatura de evaporação com 3 ciclos. A) Nanoemulsão N₁; B) Nanoemulsão N₂; C) Nanoemulsão N₃

Fonte: Própria autoria.

6.3.3 Estabilidade

Nas Tabelas 8 – 10 estão apresentados os valores de estabilidade medidos nas três nanoemulsões. Nessas tabelas pode-se observar valores entre 0,1 a 0,7 para N_1 e 0,4 a 0,7 para N_2 e N_3 , sendo as nanoemulsões preparadas com maiores pressões e número de ciclos de homogeneização as que apresentaram os melhores valores de estabilidade por estar mais perto de 1,0, valor relacionado com a menor transmissão de luz através da amostra, por ter menor separação de fases e, portanto, maior estabilidade. De modo geral, os valores acima de 0,5 podem ser considerados adequados para descrever uma nanoemulsão como estável e geralmente esses valores correspondem àquelas nanoemulsões com menores valores de diâmetro médio de gotas e polidispersidade, como pode ser comprovado nas tabelas apresentadas anteriormente na seção 6.3.

Para a nanoemulsão N_1 , as variáveis com efeito significativo na estabilidade (E) foram a pressão de homogeneização ($p < 0,0001$), o número de ciclos ($p < 0,05$), assim como as interações entre pressão e temperatura, pressão e número de ciclos e a temperatura ao quadrado ($p < 0,05$) (Tabela 11). Para a nanoemulsão N_2 , as variáveis com efeito significativo foram a pressão de homogeneização ($p < 0,0001$), o número de ciclos, assim como a temperatura ao quadrado ($p < 0,05$) (Tabela 12). Para a nanoemulsão N_3 , as variáveis com efeito significativo foram a pressão de homogeneização ($p < 0,0001$), o número de ciclos, bem como a interação entre pressão e número de ciclos ($p < 0,05$) (Tabela 13).

Apesar da temperatura de evaporação não apresentar efeito principal ($p > 0,05$) sobre a estabilidade das nanoemulsões N_1 e N_2 , esta variável foi mantida nos modelos reduzidos para cada número de ciclo em termos de fatores codificados, como se apresenta a seguir:

- **Nanoemulsão N_1**

$$E_{(1 \text{ Ciclo})} = 0,54 + 0,21 X_1 - 0,05 X_3 + 0,07 X_1 X_3 - 0,12 X_3^2 \quad \text{Eq. (40)}$$

$$E_{(2 \text{ Ciclos})} = 0,69 + 0,05 X_1 - 0,05 X_3 + 0,07 X_1 X_3 - 0,12 X_3^2 \quad \text{Eq. (41)}$$

$$E_{(3 \text{ Ciclos})} = 0,69 + 0,13 X_1 - 0,05 X_3 + 0,07 X_1 X_3 - 0,12 X_3^2 \quad \text{Eq. (42)}$$

Sendo que E representa a estabilidade, X_1 a pressão de homogeneização e X_3 a temperatura de evaporação.

- **Nanoemulsão N₂**

$$E_{(2 \text{ Ciclos})} = 0,458 + 0,097 X_I + 0,0075 X_3 + 0,047 X_3^2 \quad \text{Eq. (43)}$$

$$E_{(3 \text{ Ciclos})} = 0,482 + 0,097 X_I + 0,0075 X_3 + 0,047 X_3^2 \quad \text{Eq. (44)}$$

Sendo que E representa a estabilidade, X_I a pressão de homogeneização e X_3 a temperatura de evaporação.

- **Nanoemulsão N₃**

$$E_{(2 \text{ Ciclos})} = 0,56 + 0,014 X_I \quad \text{Eq. (45)}$$

$$E_{(3 \text{ Ciclos})} = 0,60 + 0,11 X_I \quad \text{Eq. (46)}$$

Sendo que E representa a estabilidade e X_I a pressão de homogeneização.

De acordo com esses modelos (Eqs. 40-46), pode-se afirmar que, ao aumentar o número de ciclos e/ou a pressão de homogeneização no processo, obtém-se um efeito positivo ($p < 0,05$) na estabilidade das três nanoemulsões. Isto é, as emulsões tornaram-se mais estáveis frente à coalescência, agregação e/ou floculação com o aumento da pressão e número de ciclos no microfluidizador, uma vez que o seu tamanho e a distribuição de gotas foram reduzidos (MEHMOOD, 2015; RAO; MCCLEMENTS, 2012). Dias et al. (2014) também produziram nanoemulsões monodispersas com alta estabilidade pelo efeito do aumento da pressão de homogeneização. Do mesmo modo, Dybowska (2000) e Yuan et al. (2008a) relataram estabilidade crescente com o aumento da pressão de homogeneização. Por outro lado, Küchler et al. (2006) e Tang, Shridharan e Sivakumar (2013) observaram que o aumento do número de ciclos de homogeneização também resulta em nanoemulsões progressivamente mais estáveis, independentemente da pressão testada durante o processo de homogeneização.

As superfícies 3-D dos modelos de regressão polinomial foram geradas para ilustrar o efeito interativo das variáveis independentes sobre a estabilidade (Figura 18) e foram apresentadas somente para o máximo número de ciclos (3 ciclos) nas três nanoemulsões, tendo em conta que não houve muita variação com as superfícies obtidas para 2 ciclos. Pode-se observar nessas superfícies que a estabilidade aumenta quando se aplicam maiores pressões de homogeneização e menores temperaturas de evaporação, mantendo constante o máximo número de ciclos.

Figura 18 - Superfície de resposta 3-D para a estabilidade em função da pressão de homogeneização e temperatura de evaporação com 3 ciclos. A) Nanoemulsão N₁; B) Nanoemulsão N₂; C) Nanoemulsão N₃

Fonte: Própria autoria.

6.3.4 Otimização e validação dos parâmetros de preparo das nanoemulsões

Para a otimização das condições de homogeneização-evaporação no preparo das diferentes nanoemulsões, foi utilizado o método de função de conveniência proposto para otimização numérica na metodologia de superfície de resposta (MSR). Para isso, foram estabelecidas certas restrições nas diferentes respostas em relação às características desejadas para cada uma das nanoemulsões (Tabela 14).

Tabela 14 – Restrições de otimização para as variáveis respostas

Resposta	Límite inferior	Límite superior
Diâmetro médio de gota (nm)	Min.	100
Polidispersidade	0,1	0,2
Estabilidade	0,6	Máx.

Fonte: Própria autoria.

Assim, as condições ótimas de processo das nanoemulsões, que responderam conjuntamente às restrições definidas para as três respostas (Tabela 14), foram calculadas utilizando-se o software *Design-Expert* 8.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EUA) e apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Condições determinadas na otimização da combinação de níveis dos fatores de homogeneização-evaporação das nanoemulsões

Nano-emulsões*	Pressão (MPa)	Ciclos	Temperatura (°C)
N ₁	69	3	31
N ₂	100	3	65
N ₃	82	3	58

*Nanoemulsões incorporadas com N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α -tocoferol/cinamaldeído e óleo essencial de alho. **Fonte:** Própria autoria.

Observe-se que os valores otimizados foram diferentes para as três nanoemulsões, sendo que N₂ exige de maior pressão de homogeneização e temperatura de evaporação, provavelmente por ela conter o OEA e α -tocoferol na formulação, que são compostos altamente viscosos e

hidrofóbicos. Enquanto que aquela nanoemulsão que continha a mistura dos três agentes ativos (N₃), apresentou valores ótimos intermédios de pressão de homogeneização e temperatura de evaporação entre N₁ e N₂, provavelmente, pelo efeito do cinamaldeído nessa formulação.

Após a otimização das condições de processo, prepararam-se as nanoemulsões N₁, N₂ e N₃, descritas anteriormente, com o objetivo de caracterizá-las em termos de diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade. Os resultados obtidos experimentalmente, a título de validação de cada resposta, estão apresentados na Tabela 16, na qual se pode observar que os valores experimentais foram muito próximos àqueles previstos pelos modelos, com erros experimentais muito pequenos. Considera-se, portanto, que esses resultados demonstraram a validade e adequação dos modelos descritos na seção 6.3.1.

Tabela 16 - Validação das condições ótimas de processo das nanoemulsões comparando os valores experimentais* com aqueles previstos pelos modelos para cada resposta

Resposta	Nanoemulsão N ₁			Nanoemulsão N ₂			Nanoemulsão N ₃		
	Prev.	Experim.	Erro (%)	Prev.	Experim.	Erro (%)	Prev.	Experim.	Erro (%)
D _m (nm)	93,8	94,8 ± 1,3	1,0	92,5	99,2 ± 1,2	7,2	88,1	96,9 ± 1,4	10,0
PD	0,19	0,17 ± 0,01	10,5	0,17	0,15 ± 0,01	11,8	0,16	0,15 ± 0,01	6,2
Estabilid.	0,7	0,8 ± 0,0	14,3	0,6	0,7 ± 0,0	16,7	0,6	0,7 ± 0,0	16,7

*Valores da média ± desvio padrão (n=3). D_m: Diâmetro médio de gota, PD: polidispersidade.

Fonte: Própria autoria.

6.4 Características e propriedades das nanoemulsões preparadas nas condições ótimas

6.4.1 Diâmetro médio de gota e polidispersidade

Todas as nanoemulsões apresentaram distribuição monomodal do diâmetro médio de gotas, independentemente da temperatura e do tempo de estocagem, o que permite sugerir que as condições de processo para produção dessas emulsões, bem como as suas formulações, foram muito adequadas (Figura 19). Além disso, percebe-se nessas Figuras que os picos máximos dos diâmetros médios das gotas estão abaixo de 100 nm, corroborando suas características de nanoemulsões.

Os valores de diâmetro médio das gotas calculados para essas distribuições estão apresentados na Tabela 17.

Figura 19 –Distribuição do diâmetro médio de gotas nas nanoemulsões ativas. A, B) N₁; C, D) N₂; E, F) N₃ preparadas nas condições ótimas e armazenadas a 20 (A, C, E) e 4 °C (B, D, F)

Fonte: Própria autoria.

Tabela 17 - Diâmetro médio de gota, polidispersidade, potencial ζ e pH das nanoemulsões preparadas nas condições ótimas monitorados durante o armazenamento a 20 e 4 °C

Amostra*	Temper. (°C)	Tempo (dias)	Diâmetro médio de gota (nm)	Polidispersidade	Potencial ζ (mV)	pH
N ₁	20±2	0	95,07 ± 1,60 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	-12,81 ± 0,77 ^a	5,37 ± 0,02 ^a
		7	94,27 ± 1,24 ^{ab}	0,17 ± 0,01 ^a	-11,24 ± 0,55 ^b	5,22 ± 0,00 ^b
		15	93,35 ± 1,42 ^b	0,16 ± 0,01 ^a	-11,63 ± 0,64 ^b	5,01 ± 0,00 ^c
		22	94,00 ± 1,64 ^{ab}	0,17 ± 0,01 ^a	-12,50 ± 0,91 ^a	4,88 ± 0,00 ^d
		30	94,76 ± 1,34 ^a	0,17 ± 0,01 ^a	-11,39 ± 1,11 ^b	4,77 ± 0,00 ^e
	4±1	0	95,07 ± 1,60 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	-12,81 ± 0,77 ^a	5,37 ± 0,02 ^a
		30	94,33 ± 1,32 ^{ab}	0,16 ± 0,01 ^a	-12,76 ± 1,35 ^a	5,24 ± 0,01 ^b
		60	93,35 ± 1,54 ^b	0,17 ± 0,01 ^a	-11,34 ± 0,71 ^b	4,94 ± 0,01 ^c
		90	94,58 ± 1,43 ^{ab}	0,16 ± 0,01 ^a	-12,74 ± 1,38 ^a	4,76 ± 0,00 ^d
N ₂	20±2	0	98,83 ± 1,52 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	-12,66 ± 1,09 ^a	6,03 ± 0,01 ^a
		7	99,66 ± 1,59 ^a	0,16 ± 0,01 ^{ab}	-13,22 ± 2,56 ^{ab}	5,92 ± 0,00 ^b
		15	98,25 ± 1,16 ^a	0,15 ± 0,01 ^{ab}	-12,97 ± 0,55 ^{ab}	5,78 ± 0,01 ^c
		22	98,45 ± 1,57 ^a	0,15 ± 0,01 ^b	-14,24 ± 1,34 ^{bc}	5,58 ± 0,00 ^d
		30	99,21 ± 1,28 ^a	0,15 ± 0,01 ^b	-14,86 ± 1,22 ^c	5,20 ± 0,00 ^e
	4±1	0	98,83 ± 1,52 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	-12,66 ± 1,09 ^a	6,03 ± 0,01 ^a
		30	99,72 ± 3,16 ^a	0,18 ± 0,02 ^b	-15,93 ± 1,80 ^b	5,81 ± 0,01 ^b
		60	96,16 ± 1,69 ^c	0,15 ± 0,01 ^a	-15,52 ± 1,01 ^b	5,29 ± 0,01 ^c
		90	96,89 ± 1,77 ^{bc}	0,16 ± 0,01 ^{ab}	-18,54 ± 2,00 ^c	4,43 ± 0,02 ^d
N ₃	20±2	0	97,93 ± 1,33 ^a	0,15 ± 0,01 ^{ab}	-11,96 ± 0,74 ^a	5,70 ± 0,00 ^a
		7	96,39 ± 1,39 ^b	0,16 ± 0,01 ^b	-12,16 ± 0,64 ^a	5,35 ± 0,00 ^b
		15	96,65 ± 1,24 ^{ab}	0,14 ± 0,01 ^a	-11,54 ± 0,60 ^a	4,95 ± 0,00 ^c
		22	96,31 ± 1,43 ^b	0,14 ± 0,02 ^a	-13,32 ± 1,22 ^b	4,70 ± 0,00 ^d
		30	96,85 ± 1,43 ^{ab}	0,15 ± 0,01 ^{ab}	-13,43 ± 1,06 ^b	4,37 ± 0,00 ^e
	4±1	0	97,93 ± 1,33 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	-11,96 ± 0,74 ^a	5,70 ± 0,00 ^a
		30	94,63 ± 1,68 ^b	0,14 ± 0,01 ^a	-14,26 ± 1,65 ^b	5,05 ± 0,01 ^b
		60	95,17 ± 1,62 ^b	0,15 ± 0,01 ^a	-12,79 ± 1,62 ^{ab}	4,55 ± 0,01 ^c
		90	95,62 ± 1,94 ^b	0,15 ± 0,01 ^a	-16,44 ± 2,40 ^c	4,08 ± 0,00 ^d

* Valores da média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre médias. Nanoemulsões ativas contendo N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho.

Fonte: Própria autoria.

De modo geral, os valores de diâmetro médio de gota (D_m) e polidispersidade (PD) variaram muito pouco, entre 93 e 99 nm e 0,15 e 0,17, respectivamente, independentemente do tempo e da temperatura de armazenamento (Tabela 17). Esses resultados indicam que as nanoemulsões produzidas nas condições ótimas apresentaram boa estabilidade em ambas condições de armazenamento e, quando foram observadas diferenças significativas durante o armazenamento, o D_m diminuiu com o tempo, como no caso de N₂ e N₃ a 4 °C, em que D_m diminuiu de 98,9 para 96,9 nm e de 97,9 para 95,6 nm, respectivamente, ou seja, não houve fenômenos típicos de instabilidade, como aglomeração, floculação, etc, mas sim algum fenômeno que provocou a diminuição das gotas, o que poderia estar associado com o

mecanismo de maturação de Ostwald, no qual as gotas menores se tornam cada vez menores por alimentar gotas grandes em razão da difusão molecular através da fase contínua (LI; CHIANG, 2012; NAZARZADEH; ANTHONYPILLAI; SAJJADI et al., 2013).

Em relação a PD, pode-se observar que, embora tenham sido observadas diferenças significativas ($p > 0,05$), os valores permaneceram abaixo de 0,2 nas três nanoemulsões, com variações desprezíveis em termos tecnológicos. As diferenças significativas observadas nesse caso foram consequências da qualidade das medidas, que implicaram em baixíssimos erros relativos.

Uma nanoemulsão é considerada estável quando não ocorrem mudanças discerníveis na distribuição de tamanho de gotas, no estado de agregação ou na disposição espacial no sistema ao longo da escala de observação, que pode variar de horas até meses (DICKINSON, 2003). De acordo com esta teoria e com as respostas obtidas para D_m e PD, pode-se afirmar que as nanoemulsões produzidas neste experimento apresentaram uma excelente estabilidade física durante os 30 e 90 dias armazenadas a 20 e 4 °C, respectivamente.

6.4.2 Potencial ζ

O potencial ζ está diretamente relacionado à mobilidade eletroforética das nanogotas da emulsão, que neste caso encontraram-se carregadas negativamente (JO; KWON, 2014). Em todas as nanoemulsões preparadas, os valores de potencial ζ estiveram na faixa de -11,2 a -16,4 mV (Tabela 17), independentemente da redução do pH durante a estocagem. Esses valores estão muito baixo em relação aos valores considerados como limites de estabilidades (± 30 mV), de acordo com Jo e Kwon (2014). Entretanto, as nanoemulsões apresentaram estabilidade física durante o armazenamento. Uma razão que justificaria a alta estabilidade da nanoemulsão poderia estar associada ao uso da mistura dos surfactantes Tween 20/Span 60 no preparo das nanoemulsões, que atuaram sinergicamente para reduzir a tensão interfacial formando estruturas intercaladas na interface óleo/água e, portanto, emulsões mais estáveis (MEHMOOD, 2015).

Li e Chiang (2012) relataram valores de potencial ζ próximos a -20 mV para nanoemulsões de D-limoneno preparadas a um pH de 6,4. Porém, os autores observaram que esses valores aumentaram com a redução do pH e foram próximos de zero em pH em torno de 4,0. Por outro lado, Liu et al. (2006) também identificaram valores negativos de potencial ζ em nanoemulsões produzidas com a mistura Tween/Span e atribuíram esse resultado à adsorção de

íons hidroxílicos na interface óleo/água e ao subsequente desenvolvimento de ligações de hidrogênio entre esses íons e grupos de óxido de etileno do Tween utilizado.

6.4.3 pH

Os valores de pH das nanoemulsões apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo nas duas temperaturas de armazenamento, variando entre 6,0 e 4,0 (Tabela 17). Esse comportamento de pH coincide com aquele identificado por Cheong; Tan e Nyam (2017), que também observaram uma redução de pH de nanoemulsões de óleo de semente de *Kenaf* (*Hibiscus cannabinus* L.) em água, armazenadas à temperatura ambiente, o que poderia estar associado à perda do α -tocoferol das nanoemulsões durante a estocagem, conforme apresentado na Tabela 18. Os valores de pH corresponderam com aqueles relatados por Hsu e Nacu (2003) e Nejadmansouri et al. (2016), que afirmaram que o valor ideal de pH para emulsões O/A deve ser superior a 4,0 para garantir a sua estabilidade contra a agregação, como resultado de suficientes repulsões eletrostáticas entre as gotas carregadas negativamente.

6.4.4 Eficiência de encapsulação (EE)

Na Tabela 18 estão apresentadas nanoemulsões com porcentagens de encapsulação de aproximadamente 100% para o cinnamaldeído (Cin) e para o óleo essencial de alho (OEA) e porcentagens de encapsulação do α -tocoferol (α -t) entre 48 e 76% imediatamente após o processamento, o que revela uma perda considerável desse último agente ativo desde o preparo das nanoemulsões. Portanto, o Cin e o OEA apresentaram maior eficiência de encapsulação (EE) do que α -t.

A quantidade de Cin encapsulado nas nanoemulsões N₁ e N₃ foi de 100% no dia zero e manteve-se quase constante independentemente do tempo e da temperatura de armazenamento, portanto, pode-se considerar que praticamente não houve perda durante a emulsificação, a evaporação do solvente ou a estocagem das amostras. Por outro lado, as nanoemulsões N₂ e N₃ apresentaram perdas dos agentes ativos α -t e OEA durante o preparo das nanoemulsões e uma redução significativa ($p < 0,05$) da concentração inicialmente encapsulada durante o tempo de estocagem para as duas temperaturas. De acordo com Cheong et al. (2008) e Tan e Nakajima (2005), essa perda poderia estar associada à alta pressão e ao número de ciclos utilizados no preparo das nanoemulsões, que provavelmente geram uma volatilidade parcial ou algumas mudanças na estrutura química desses agentes ativos, particularmente no α -t, que é altamente sensível à temperatura de evaporação utilizada e a outros fatores como luz, calor e oxigênio,

presentes nas etapas de preparo das nanoemulsões (CHEONG et al., 2008). Em um estudo similar, Flores et al. (2011) prepararam uma nanoemulsão O/A com óleo essencial de folha de *Melaleuca alternifolia* usando a técnica de emulsificação-evaporação. Os autores também observaram perda de frações voláteis do óleo essencial e atribuíram esse fenômeno à etapa de evaporação do solvente.

Tabela 18 - Retenção dos agentes ativos nas nanoemulsões preparadas nas condições ótimas monitorada durante o armazenamento a 20 e 4 °C

Amostra*	Temperatura (°C)	Tempo (Dias)	Cinamaldeído (%)	α -tocoferol (%)	Óleo essencial de alho (%)
N ₁	20±2	0	100 ± 0,0 ^a	76,4 ± 1,2 ^a	---
		7	100 ± 0,0 ^a	70,9 ± 1,3 ^c	---
		15	100 ± 0,0 ^a	73,8 ± 0,0 ^b	---
		22	100 ± 0,0 ^a	41,7 ± 0,8 ^d	---
		30	100 ± 0,0 ^a	39,0 ± 0,7 ^e	---
	4±1	0	100 ± 0,0 ^a	76,4 ± 1,2 ^a	---
		30	100 ± 0,0 ^a	42,9 ± 0,2 ^b	---
		60	100 ± 0,0 ^a	36,6 ± 0,4 ^c	---
		90	100 ± 0,0 ^a	27,3 ± 1,4 ^d	---
N ₂	20±2	0	---	50,2 ± 0,6 ^a	98,2 ± 0,1 ^a
		7	---	44,0 ± 0,2 ^c	95,1 ± 0,4 ^b
		15	---	47,3 ± 0,4 ^b	92,5 ± 0,6 ^c
		22	---	41,6 ± 2,1 ^c	90,9 ± 1,0 ^d
		30	---	34,9 ± 1,3 ^d	85,8 ± 0,3 ^e
	4±1	0	---	50,2 ± 0,6 ^a	98,2 ± 0,1 ^a
		30	---	42,9 ± 1,4 ^b	86,1 ± 0,5 ^b
		60	---	47,8 ± 0,2 ^a	87,1 ± 0,3 ^b
		90	---	38,6 ± 0,9 ^c	79,3 ± 1,4 ^c
N ₃	20±2	0	100 ± 0,0 ^a	47,4 ± 0,3 ^a	100 ± 0,0 ^a
		7	98,6 ± 0,2 ^b	43,2 ± 1,4 ^b	95,1 ± 0,1 ^b
		15	93,9 ± 1,6 ^c	43,5 ± 0,1 ^b	92,6 ± 1,9 ^b
		22	86,1 ± 0,1 ^d	35,4 ± 1,6 ^c	77,7 ± 0,4 ^c
		30	94,9 ± 1,6 ^c	33,1 ± 0,8 ^c	76,4 ± 1,1 ^c
	4±1	0	100 ± 0,0 ^a	47,4 ± 0,3 ^a	100 ± 0,0 ^a
		30	100 ± 0,0 ^a	45,1 ± 1,5 ^a	100 ± 0,0 ^a
		60	100 ± 0,0 ^a	44,4 ± 0,3 ^a	97,7 ± 0,8 ^b
		90	94,0 ± 0,6 ^b	31,1 ± 1,6 ^b	95,5 ± 1,7 ^b

* Valores da média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre amostras. Nanoemulsões ativas contendo N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho.

Fonte: Própria autoria

6.4.5 Estabilidade das nanoemulsões

Os valores de estabilidade e velocidade de cremeação das nanoemulsões preparadas nas condições ótimas são apresentados na Tabela 19. Esses dados foram obtidos no equipamento

LUMiSizer® simulando diferentes condições de estocagem, que incluíram condições críticas a 45 °C durante 6 meses e condições de estocagem a 20 e 4 °C durante 1 ano. Neste teste utilizou-se a aceleração centrífuga para causar separação de fases e incrementar a velocidade de cremação das nanogotas nas nanoemulsões N₁, N₂ e N₃ preparadas nas condições ótimas.

Os resultados experimentais do ensaio de estabilidade demonstraram que o incremento da temperatura de ensaio afetou diretamente a taxa de separação de fases das nanoemulsões independentemente do tempo de estocagem simulado, sendo aquelas nanoemulsões centrifugadas a 4 °C as que apresentaram as menores velocidade de cremação ($p < 0,05$) (0,5 – 1,0 mm/h) e, portanto, os maiores valores de estabilidade no tempo (0,84 – 0,88). Por outro lado, conforme esperado, as nanoemulsões avaliadas simulando as condições críticas de separação sob força gravitacional durante o armazenamento (45 °C, 6 meses) corresponderam com as maiores velocidades de cremação (3,8 – 9,8 mm/h) e maior instabilidade. Essa diferença significativa ($p < 0,05$) entre as velocidades de cremação de N₁, quando comparadas com as velocidades de cremação de N₂ e N₃, reflete uma nanoemulsão mais estável frente a fenômenos de instabilidade física.

Tabela 19 – Estabilidade e velocidade de cremação das nanoemulsões preparadas nas condições ótimas monitoradas no LUMiSizer a 45, 20 e 4 °C simulando 6 meses e 1 ano

Amostra	Estabilidade			Velocidade de Cremação (mm/h)		
	45 °C	20 °C	4 °C	45 °C	20 °C	4 °C
	x 6 meses	x 1 ano	x 1 ano	x 6 meses	x 1 ano	x 1 ano
N ₁	0,72 ± 0,01 ^a	0,82 ± 0,00 ^a	0,88 ± 0,00 ^a	3,85 ± 0,05 ^c	1,07 ± 0,00 ^c	0,49 ± 0,00 ^c
N ₂	0,68 ± 0,00 ^b	0,71 ± 0,00 ^b	0,86 ± 0,00 ^b	9,77 ± 0,08 ^a	2,14 ± 0,01 ^a	0,99 ± 0,02 ^a
N ₃	0,67 ± 0,00 ^b	0,69 ± 0,00 ^c	0,84 ± 0,00 ^c	9,73 ± 0,09 ^b	1,59 ± 0,02 ^b	0,75 ± 0,01 ^b

* Valores da média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. Nanoemulsões ativas contendo N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho.

Fonte: Própria autoria

De acordo com Dammak e Sobral (2017) e Lerche (2002), a aceleração centrífuga permite que a estabilidade física possa ser quantificada mais rapidamente e com maior precisão do que o emprego do olho nu ou de um método analítico baseado na separação pela gravidade. Esta análise acelerada forneceu dados qualitativos e quantitativos muito úteis do comportamento da estabilidade e de separação de fase das nanoemulsões, as quais são relatadas como sendo mais estáveis à cremação durante o armazenamento quando comparadas, por exemplo, com as microemulsões (LERCHE, 2002).

6.4.6 Tensão superficial e interfacial e densidade das nanoemulsões

Observou-se que a tensão superficial (TS) e a tensão interfacial (TI) das nanoemulsões variavam com o tempo de medida. Assim, considerou-se como valores dessas propriedades aqueles valores atingidos no equilíbrio após 3500 s de medição, os quais variaram entre 22 – 33 mN/m e 30 – 34 mN/m, para TI e TS, respetivamente, nesse caso, sem efeito claro da temperatura (Tabela 20). Os valores da TI das nanoemulsões ativas N₁, N₂ e N₃ foram inferiores àquele valor de TI determinado para uma emulsão preparada somente com óleo de canola e água usando os mesmos surfactantes ($44,33 \pm 0,03$ mN/m), para fins de comparação. Esse comportamento demonstra que, além dos surfactantes Tween 20 e Span 60, os agentes ativos α -t, Cin e OEA também tiveram efeito na redução da tensão entre as fases aquosa e oleosa que faziam parte de cada nanoemulsão O/A.

Tabela 20 - Densidade, tensão interfacial, tensão superficial e viscosidade das nanoemulsões preparadas

Amostra	Densidade (g/cm ³)	Tensão interfacial (mN/m)	Tensão superficial (mN/m)		Viscosidade * 10 ³ (Pa.s)	
			20 °C	4 °C	20 °C	4 °C
N ₁	$0,994 \pm 0,00^b$	$33,06 \pm 0,02^a$	$33,81 \pm 0,01^a$	$33,76 \pm 0,01^a$	$2,8 \pm 0,2^a$	$4,4 \pm 0,0^a$
N ₂	$0,997 \pm 0,00^a$	$22,21 \pm 0,09^c$	$31,40 \pm 0,01^c$	$30,49 \pm 0,01^c$	$2,8 \pm 0,0^a$	$4,0 \pm 0,0^a$
N ₃	$0,997 \pm 0,00^a$	$27,15 \pm 0,01^b$	$33,47 \pm 0,03^b$	$32,70 \pm 0,02^b$	$2,8 \pm 0,0^a$	$4,1 \pm 0,0^a$

* Valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. Nanoemulsões ativas contendo N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho.

Fonte: Própria autoria

A utilização de dois tipos de surfactantes (Tween 20 e Span 60) no preparo das nanoemulsões influenciou a tensão interfacial e, portanto, a mobilidade das interfaces óleo-água em que as gotas de óleo foram formadas, resultando em organizações estruturais mais apropriadas das moléculas de surfactante e, portanto, na formação de gotas de óleo mais finas dentro do sistema (NEJADMANSOURI et al., 2016). Esses resultados confirmaram os dados de estabilidade das nanoemulsões (Tabela 19). Resultados similares para os valores de TI foram previamente descritos por Galvão (2015) para nanoemulsões O/A contendo eugenol ($43,1 \pm 0,01$ mN/m) e extrato de pimenta dedo-de-moça ($39,3 \pm 0,01$ mN/m) elaboradas com mistura dos tensoativos Tween 80 e Span 80.

As nanoemulsões apresentaram valores de densidade ($0,994 - 0,997 \text{ g/cm}^3$) e viscosidade ($2,8 \times 10^{-3} \text{ mPa.s}$) bem próximas à densidade ($0,9982 \text{ g/cm}^3$) e viscosidade (10^{-3} Pa.s) da água (Tabela 20). Esse fato poderia ser explicado pelo alto conteúdo de água (85 % v/v) que compõe a fase contínua de cada uma das nanoemulsões preparadas.

6.4.7 Comportamento reológico das nanoemulsões

Todas as nanoemulsões mostraram um comportamento de fluxo newtoniano e apresentaram valores de viscosidade entre $2,8$ e $4,4 \times 10^{-3} \text{ mPa.s}$ (Tabela 20). Esse comportamento reológico pode ser correlacionado com a estabilidade física das nanoemulsões, as quais não apresentaram instabilidade visual, como separação de fases ou agregados durante o armazenamento (GALVÃO, 2015; LIANG et al., 2012).

Segundo Flourey, Desrumaux e Lardières (2000), emulsões contendo menos de 20% (m/m) na fase dispersa apresentam comportamento newtoniano independentemente da pressão de homogeneização aplicada no seu preparo. Os resultados de viscosidade das nanoemulsões foram muito próximos à viscosidade da água e, em termos práticos, esse comportamento pode ser considerado interessante em razão de a água ser o solvente geralmente utilizado na tecnologia de produção de filmes à base de polímeros biodegradáveis, que é um dos objetivos desta tese. Alexandre et al. (2016) identificaram um comportamento reológico semelhante com valores de viscosidade muito próximos para nanoemulsões O/A carregadas com óleo essencial de gengibre (10^{-3} mPa.s).

6.4.8 Microestrutura e morfologia

6.4.8.1 Microscopia óptica e microscopia confocal de varredura laser (MCVL) das emulsões grossas

Para a produção de nanoemulsões, era necessário produzir uma emulsão grossa, que consistiu na mistura das duas fases com a ajuda de um homogeneizador de alta velocidade Ultra-Turrax® IKA T25 em razão da resolução limitada dos microscópios. O produto dessa etapa do processamento foi analisado por microscopia óptica e microscopia confocal de varredura laser, o que permitiu verificar a dispersão da fase lipídica na fase aquosa, em gotas com tamanho micrométrico. A estrutura das emulsões grossas, inicialmente preparadas com uso apenas do Ultra-Turrax®, foi definida sob a forma de pequenas gotas esféricas suspensas em uma fase líquida contínua, conforme descrito por Kurukji (2015).

As micrografias obtidas no microscópio ótico revelaram uma estrutura bem definida da gota de óleo circular dentro da emulsão (Figura 20), porém, com tamanho muito heterogêneo, possivelmente por causa de algum fenômeno de instabilidade ocorrido durante o armazenamento ou durante a análise microscópica.

Figura 20 - Imagens da morfologia das emulsões grossas obtidas por microscopia óptica. A) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; B) N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; C) N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho

Fonte: Própria autoria.

Por outro lado, nas imagens da Figura 21, observam-se as gotas de óleo de canola, que encapsulavam os diferentes agentes ativos, com tamanhos relativamente homogêneos de aproximadamente 10 µm e uma distribuição de tamanho de gotas polidisperso. Essas micrografias da emulsão grossa O/A obtidas no microscópio confocal confirmaram a morfologia esférica das gotas formadas na fase dispersa, as quais foram reveladas em diferentes cores, como resultado da emissão fluorescente do corante aromático hidrofóbico *Nile red*.

Figura 21 - Imagens da morfologia das emulsões grossas obtidas por MCVL usando um corante fluorescente (*Nile red*) na fase óleo. A) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído B) N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho C) N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho

Fonte: Própria autoria.

6.4.8.2 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA) das nanoemulsões*

As imagens do MEV (Figura 22) e MFA (Figura 23) das nanoemulsões N₁, N₂ e N₃ revelaram gotas esféricas com tamanho uniforme na escala nano (<100 nm), conforme a classificação de Mason et al. (2006).

A nanoestrutura das gotas foi observada no MEV como pequenos pontos brilhantes que corresponderam às gotas de óleo dispersas na fase aquosa ultracongelada, representada pelos cristais de gelo maiores das imagens. Observações similares foram verificadas por Klang et al. (2012), Salvia-Trujillo et al. (2013), Troncoso, Aguilera e McClements (2012) e Yin, Zhang e Yao (2015), quando analisaram nanoemulsões por microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 22 - Imagens da microestrutura das nanoemulsões obtidas por MEV. A) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; B) N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; C) N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho

Fonte: Própria autoria.

Por outro lado, as micrografias do MFA também revelaram nanogotas com estrutura bem definida sobre a superfície da mica após a secagem da fase aquosa da nanoemulsão (Figura 23). Essas imagens confirmaram claramente uma morfologia esférica das gotas de óleo com tamanho < 100 nm, assim como homogeneidade na distribuição do tamanho médio de gota nas nanoemulsões, conforme medido pela técnica de dispersão dinâmica de luz no equipamento *Zetasizer* (Tabela 17) e observado na Figura 19.

Figura 23 - Imagens da microestrutura das nanoemulsões obtidas por MFA. A) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; B) N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; C) N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho

Fonte: Própria autoria.

6.4.9 Atividade antimicrobiana das nanoemulsões

Na Tabela 21, são apresentados os resultados da atividade antimicrobiana das nanoemulsões N₁, N₂ e N₃ preparadas nas condições ótimas. Nessa Tabela, observa-se que houve uma redução considerável no crescimento das cepas de *P. aeruginosa* ATCC 15692 e *L. monocytogenes* ATCC 35152 após 24 horas em contato com as nanoemulsões ativas. Pode-se considerar que as nanoemulsões carregadas com Cin ou OEA (N₁ ou N₂) ou com ambos agentes ativos (N₃) podem ser consideradas como um sistema potencial de entrega de agentes antimicrobianos.

A *P. aeruginosa* apresentou uma forte redução na população inicialmente inoculada de até 4 escalas logarítmicas (99,99% de número de células) após 24 horas em contato com a nanoemulsão N₃, provavelmente em virtude de um efeito sinérgico dos agentes ativos contra esta bactéria. Já a *L. monocytogenes* apresentou uma redução máxima de 3 escalas logarítmicas (99,9% de número de células) quando em contato por 24h com a nanoemulsão N₁.

Tabela 21 - Atividade antimicrobiana das nanoemulsões ativas preparadas nas condições ótimas contra *P. aeruginosa* and *L. monocytogenes*

Amostra	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692		Redução (%)
	0 h	24 h	
N ₁	4 x 10 ⁸ UFC/mL	2 x 10 ⁵ UFC/mL	99,9
N ₂	4 x 10 ⁸ UFC/mL	6 x 10 ⁶ UFC/mL	99,0
N ₃	4 x 10 ⁸ UFC/mL	6 x 10 ⁴ UFC/mL	99,99
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152		
	0 h	24 h	
N ₁	8 x 10 ⁸ UFC/mL	3 x 10 ⁵ UFC/mL	99,9
N ₂	8 x 10 ⁸ UFC/mL	9 x 10 ⁶ UFC/mL	99,0
N ₃	8 x 10 ⁸ UFC/mL	8 x 10 ⁶ UFC/mL	99,0

* Nanoemulsões ativas contendo N₁: α-tocoferol/cinamaldeído; N₂: α-tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α-tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho.

Fonte: Própria autoria.

Donsì et al. (2012) averiguaram que nanoemulsões carregadas com cinamaldeído também apresentaram efeito inibitório contra as bactérias *Escherichia coli* e *Saccharomyces*

cerevisiae, causando uma completa inativação após 24 h em contato, ao passo que, para *Lactobacillus delbrueckii*, causaram uma redução de 1 a 2 escalas logarítmicas após 2 h e uma inativação quase completa após 24 h em contato.

A atividade antimicrobiana das nanoemulsões N₁, N₂ e N₃ preparadas nas condições ótimas contra a *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* foi verificada pelos halos de inibição ao redor dos discos impregnados com as nanoemulsões ativas (Figura 24) com valores em torno de 2 a 14 mm (Tabela 22).

Figura 24 - Efeito de inibição das nanoemulsões ativas contendo A₁₋₂) N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; B₁₋₂) N₂: α -tocoferol/óleo de alho; C₁₋₂) N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo de alho contra *P. aeruginosa* (esquerda) e *L. monocytogenes* (direita)

Fonte: Própria autoria.

Tabela 22 – Atividade antimicrobiana* das nanoemulsões ativas contra às bactérias *P. aeruginosa* ATCC 15692 e *L. monocytogenes* ATCC 35152 baseada nos halos de inibição

Amostra	Bactéria	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>
N ₁	++	++++
N ₂	++	+
N ₃	++	+
Controle + (Cloranfenicol)	++++	++++

* Ligeira atividade antimicrobiana (+); Zona de inibição 2–3 mm, moderada atividade antimicrobiana (++); Zona de inibição 4–6 mm, forte atividade antimicrobiana (++++); zona de inibição >9 mm. Nanoemulsões ativas contendo N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho

Fonte: Própria autoria.

6.4.10 Atividade antioxidante das nanoemulsões

Na Tabela 23 são apresentados os resultados de atividade antioxidante das nanoemulsões adicionadas com os agentes ativos e preparadas nas condições ótimas de processo. A nanoemulsão N₁, carregada com α -t e Cin, apresentou a maior capacidade de sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} ($p < 0,05$) entre todas as emulsões, com valores EC₅₀ de $24,2 \pm 0,5$ e $45,2 \pm 0,5$ $\mu\text{L/mL}$, respectivamente. Por outro lado, a nanoemulsão N₂, carregada com α -t e OEA, foi a que apresentou o maior efeito redutor de FRAP com valor EC₁ de $26,0 \pm 0,4$ $\mu\text{L/mL}$. Entretanto, apesar dessas diferenças significativas, pode-se considerar que todas as nanoemulsões produzidas neste experimento apresentaram considerável atividade antioxidante frente aos radicais livres DPPH[•] e ABTS^{•+} e ao reagente FRAP. Comparando com outros estudos onde avaliou-se a atividade antioxidante dos óleos essenciais de alecrim e manjerição puros, compostos ativos considerados de alta capacidade antioxidante, pode-se inferir que as concentrações de nanoemulsão N₁, N₂ e N₃ testadas nesta tese apresentaram menores valores EC₅₀ para os agetes ativos encapsulados ($0,72 - 0,88$ $\mu\text{L/mL}$) e, portanto, maior atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•], quando comparadas com o óleo de alecrim (EC₅₀ = $3,53$ $\mu\text{L/mL}$) (HENDEL; LAROUS; BELBEY, 2016) e o óleo de manjerição (EC₅₀ = $1,38$ $\mu\text{L/mL}$) (POLITEO; JUKIC; MILOS, 2007).

Tabela 23 - Atividade antioxidante das nanoemulsões expressa como poder de sequestro dos radicais ABTS^{•+}, DPPH[•] e de inibição do reagente FRAP

Amostra	DPPH [•] radical	ABTS ^{•+} radical		FRAP assay	
	EC ₅₀ (μL/mL)	EC ₅₀ (μL/mL)	TEAC (Mol/mL)	EC ₁ (μL/mL)	TEAC (μL/mL)
N ₁	24,22 ± 0,47 ^b	45,19 ± 0,50 ^b	2,93 ± 0,05 ^a	31,87 ± 0,65 ^{ab}	50,80 ± 1,59 ^a
N ₂	28,22 ± 1,29 ^a	46,72 ± 0,69 ^b	2,59 ± 0,05 ^b	26,02 ± 0,41 ^b	38,66 ± 1,16 ^b
N ₃	29,61 ± 0,14 ^a	57,71 ± 1,05 ^a	2,17 ± 0,14 ^c	35,33 ± 0,08 ^a	52,58 ± 0,25 ^a

* Valores da média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre amostras. Nanoemulsões ativas contendo N₁: α-tocoferol/cinamaldeído; N₂: α-tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α-tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho.

Fonte: Própria autoria.

6.5 Características e propriedades de nanoemulsões produzidas sem uso de solvente orgânico

As nanoemulsões preparadas sem o uso de solvente orgânico, de interesse na produção de filmes ativos por serem *environmentally friendly*, foram armazenadas por um período de 90 dias a 4 °C e caracterizadas em termos de eficiência de encapsulação, diâmetro médio de gota, polidispersidade, potencial ζ e pH. A eficiência de encapsulação foi determinada nos tempos zero e 90 dias e as outras propriedades foram estudadas a cada 30 dias. Uma nanoemulsão foi produzida sem os agentes ativos para servir de controle no experimento com filmes.

6.5.1 Eficiência de encapsulação

Na Tabela 24, são apresentados os resultados de eficiência de encapsulação (EE) dos agentes ativos nas diferentes nanoemulsões preparadas sem o uso do solvente orgânico. As nanoemulsões N₁ e N₂ foram as que apresentaram as maiores EE ($p < 0,05$) dos agentes Cin e OEA com valores relativamente estáveis até 90 dias de armazenamento, quando comparados com o α-tocoferol. Por outro lado, a nanoemulsão N₃ apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na quantificação dos agentes encapsulados imediatamente pós-emulsificação e após os 90 dias de armazenamento. Portanto, o fato de encapsular três compostos simultaneamente afeta claramente sua EE.

A eficiência de encapsulação do α-t não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre as nanoemulsões pós-emulsificação. No entanto, o tempo de armazenamento teve um efeito na redução deste agente nas nanoemulsões ($p < 0,05$), o que poderia ser explicado pela

sensibilidade dessa molécula (NHAN; HOA, 2013). Mais uma vez, foi remarcável a perda de α -t no processo de produção das emulsões.

6.5.2 Diâmetro médio de gota, polidispersidade, potencial ζ e pH

Como nos experimentos anteriores, as nanoemulsões contendo os agentes ativos (N_1 , N_2 e N_3) apresentaram dispersão de tamanho de gotas monomodais, mas, neste caso, com um volume estreito de diâmetro médio de gotas ocorrendo acima de 100 nm sem efeito do tempo de armazenamento, o que sugere que essas emulsões apresentaram boa estabilidade física nas condições estudadas (Figura 25).

Figura 25 - Distribuição do volume do tamanho médio de gotas das nanoemulsões finais preparadas nas condições ótimas e armazenadas a 4 °C. A) N_1 ; B) N_2 ; C) N_3 ; e D) N_4

Fonte: Própria autoria.

A diferença daquelas nanoemulsões ativas N_1 , N_2 e N_3 preparadas nas condições ótimas utilizando solvente orgânico na sua formulação (seção 6.4) e estas novas nanoemulsões N_1 , N_2 e N_3 produzidas sem o uso de solvente orgânico apresentaram valores de diâmetro médio de

gotas (D_m) e polidispersidade (PD) em torno de 111,0 – 130,0 nm e 0,14 – 0,20, respectivamente, permanecendo inalterados ao longo do armazenamento (Tabela 24). Essas emulsões poderiam também serem consideradas como nanoemulsões, segundo classificação de McClements (2002) e Tadros et al. (2004), que consideram nanoemulsões aquelas com diâmetro médio de gotas entre 100 e 500 nm e com excelente estabilidade física durante a estocagem a 4 °C.

Considerando os resultados anteriores, pode-se inferir que a etapa de evaporação do solvente orgânico utilizado para a dissolução da fase oleosa foi importante, já que contribuiu para a redução do diâmetro médio das gotas abaixo de 100 nm e para a obtenção de uma distribuição de tamanho de gotas mais estreita. Esse efeito do hexano pode ter sido provocado pela diminuição da viscosidade aparente da fase dispersa, bem como da tensão interfacial, pela diluição com aquele solvente, facilitando assim a formação de pequenas gotas durante a homogeneização, assim como durante sua evaporação. Troncoso, Aguilera e McClements (2012) também observaram uma redução de até 20% do diâmetro médio de gotas de nanoemulsões de óleo de milho em água após evaporar o solvente orgânico (hexano) utilizado na dissolução da fase dispersa. Esses autores confirmaram o importante papel do solvente na composição da fase orgânica para a formação da emulsão e para a dispersão das nanogotas.

Em relação ao potencial ζ e pH, as nanoemulsões N₁, N₂ e N₃ apresentaram valores destas propriedades em torno de -12,0 – -16,0 mV e acima de 4,0, respectivamente, apresentando uma redução significativa ($p < 0,05$) em ambos os parâmetros ao longo do armazenamento (Tabela 24). Apesar de o potencial ζ estar acima de -30 mV, as diferenças de carga eletrostática resultantes foram capazes de contribuir em uma alta estabilidade das nanoemulsões contra fenômenos de agregação durante a estocagem a 4 °C (MULLER; JACOBS; KAYSER, 2001; YIN et al., 2009). Jo e Kwon (2014) e Li e Chiang (2012) relataram valores negativos de potencial ζ similares aos obtidos neste trabalho para nanoemulsões formuladas com D-limoneno (-14 mV) e β -caroteno (-7,6 – -12,4 mV), as quais também apresentaram boa estabilidade durante o armazenamento.

A nanoemulsão N₄, sem agentes ativos encapsulados, apresentou o maior diâmetro médio de gotas ($p < 0,05$), polidispersidade, potencial ζ e pH entre todas as amostras produzidas (Tabela 24), porém com valores de pH invariável ($p > 0,05$) durante o armazenamento. Na Figura 25D, pode-se constatar que os valores de PD para N₄ acima de 0,20 correspondem com o ligeiro deslocamento da curva do diâmetro médio de gota, representado por um segundo pico na faixa de 8 μ m, demonstrando assim uma distribuição de tamanho de gotas bimodal.

Tabela 24 - Eficiência de encapsulação dos agentes ativos e valores de diâmetro médio de gotas, polidispersidade, potencial ζ e pH das nanoemulsões finais preparadas nas condições ótimas em função do tempo de armazenamento a 4 °C

Amostra	Tempo (dias)	Eficiência de encapsulação			Diâmetro médio de gotas (nm)	Polidispersidade	Potencial ζ (mV)	pH
		Cin (%)	α -t (%)	OEA (%)				
N ₁	0	100 $\pm$ 0,0 ^{aA}	57,1 $\pm$ 1,1 ^{aA}	----	123,1 $\pm$ 1,5 ^{aB}	0,16 $\pm$ 0,01 ^{aB}	-14,2 $\pm$ 0,5 ^{aC}	5,3 $\pm$ 0,0 ^{aD}
	30	----	---	----	121,5 $\pm$ 0,6 ^{aC}	0,16 $\pm$ 0,04 ^{aB}	-12,3 $\pm$ 0,3 ^{bC}	5,1 $\pm$ 0,0 ^{bC}
	60	----	---	----	121,9 $\pm$ 2,7 ^{aC}	0,15 $\pm$ 0,01 ^{aB}	-13,7 $\pm$ 0,9 ^{aC}	4,7 $\pm$ 0,1 ^{cC}
	90	99,7 $\pm$ 0,3 ^{aA}	46,6 $\pm$ 0,4 ^{bB}		122,4 $\pm$ 2,5 ^{aC}	0,15 $\pm$ 0,01 ^{aBC}	-13,7 $\pm$ 1,0 ^{aC}	4,6 $\pm$ 0,0 ^{dB}
N ₂	0	----	52,4 $\pm$ 0,4 ^{aA}	92,2 $\pm$ 1,9 ^{aA}	111,0 $\pm$ 2,0 ^{aC}	0,16 $\pm$ 0,0 ^{aB}	-15,9 $\pm$ 0,7 ^{abB}	6,0 $\pm$ 0,0 ^{aB}
	30	----	---	---	112,5 $\pm$ 2,4 ^{aD}	0,14 $\pm$ 0,02 ^{aB}	-15,5 $\pm$ 0,6 ^{abA}	5,4 $\pm$ 0,0 ^{bB}
	60	----	---	---	111,2 $\pm$ 1,9 ^{aD}	0,14 $\pm$ 0,01 ^{aB}	-16,0 $\pm$ 0,8 ^{aB}	4,9 $\pm$ 0,0 ^{cB}
	90	----	47,8 $\pm$ 0,2 ^{bA}	88,5 $\pm$ 2,7 ^{aA}	111,5 $\pm$ 1,9 ^{aD}	0,14 $\pm$ 0,01 ^{aC}	-15,0 $\pm$ 0,9 ^{bB}	4,3 $\pm$ 0,0 ^{dB}
N ₃	0	93,9 $\pm$ 2,6 ^{aA}	56,7 $\pm$ 3,1 ^{aA}	70,9 $\pm$ 2,0 ^{aB}	124,8 $\pm$ 1,4 ^{bB}	0,15 $\pm$ 0,01 ^{bB}	-14,4 $\pm$ 0,7 ^{aC}	5,5 $\pm$ 0,0 ^{aC}
	30	---	---	---	126,4 $\pm$ 2,2 ^{bB}	0,16 $\pm$ 0,02 ^{bB}	-13,7 $\pm$ 0,4 ^{bB}	4,9 $\pm$ 0,0 ^{bD}
	60	---	---	---	130,0 $\pm$ 1,1 ^{aB}	0,20 $\pm$ 0,01 ^{aC}	-13,8 $\pm$ 0,5 ^{abC}	4,7 $\pm$ 0,0 ^{cC}
	90	89,6 $\pm$ 0,6 ^{bB}	45,2 $\pm$ 0,3 ^{bC}	61,6 $\pm$ 0,1 ^{bB}	126,6 $\pm$ 3,0 ^{bB}	0,16 $\pm$ 0,02 ^{bB}	-14,5 $\pm$ 0,6 ^{aBC}	4,5 $\pm$ 0,0 ^{dC}
N ₄	0	----	---	----	157,0 $\pm$ 4,1 ^{aA}	0,19 $\pm$ 0,02 ^{bA}	-17,3 $\pm$ 0,6 ^{aA}	6,1 $\pm$ 0,0 ^{abA}
	30	----	---	----	158,2 $\pm$ 2,9 ^{aA}	0,20 $\pm$ 0,02 ^{bA}	-16,0 $\pm$ 1,4 ^{bA}	6,0 $\pm$ 0,0 ^{bcA}
	60	----	---	----	161,2 $\pm$ 5,9 ^{aA}	0,23 $\pm$ 0,02 ^{aA}	-17,2 $\pm$ 0,9 ^{abA}	6,1 $\pm$ 0,0 ^{aA}
	90	----	---	----	156,9 $\pm$ 4,7 ^{aA}	0,21 $\pm$ 0,02 ^{bA}	-18,1 $\pm$ 1,0 ^{aA}	6,0 $\pm$ 0,0 ^{cA}

* Valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras e letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre dias de estocagem das nanoemulsões contendo N₁: α -tocoferol/cinamaldeído; N₂: α -tocoferol/óleo essencial de alho; N₃: α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho; N₄: sem agente ativo.

Fonte: Própria autoria.

6.6 Características e propriedades dos filmes ativos

Na Figura 26, estão apresentadas imagens dos filmes incorporados ou não das diferentes nanoemulsões produzidas nas condições otimizadas, porém sem o uso de solvente orgânico. Todos os filmes foram visualmente homogêneos e não apresentaram fissuras, áreas quebradiças, bolhas ou separação de fases após a etapa de secagem.

Figura 26 - Aspecto visual de filmes à base de Gelatina–Quitosana. A) F₀: filme controle, sem nanoemulsão; B) F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); C) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); D) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/ cinamaldeído/óleo essencial de alho); E) F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)

Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 25, são apresentados os resultados obtidos para a espessura, umidade, solubilidade em água e grau de inchamento dos filmes à base de blenda gelatina-quitosana (G-Q) incorporados ou não das nanoemulsões N₁, N₂, N₃ ou N₄.

Tabela 25 - Espessura, umidade, solubilidade em água e grau de inchamento de filmes ativos à base de Gelatina-Quitossana

Amostra*	Espessura (mm)	Umidade base seca (%)	Solubilidade em água (%)	Grau de inchamento (g/g)
F ₀	0,082 ± 0,001 ^a	22,30 ± 1,24 ^a	50,80 ± 0,70 ^a	26,90 ± 2,76 ^b
F ₁	0,081 ± 0,002 ^a	22,23 ± 2,75 ^a	43,96 ± 2,06 ^c	27,37 ± 2,51 ^{ab}
F ₂	0,081 ± 0,002 ^a	20,98 ± 3,14 ^a	43,07 ± 2,35 ^c	30,32 ± 1,48 ^a
F ₃	0,082 ± 0,001 ^a	22,37 ± 3,91 ^a	48,88 ± 0,91 ^{ab}	25,25 ± 0,84 ^b
F ₄	0,081 ± 0,002 ^a	21,72 ± 2,71 ^a	47,54 ± 0,58 ^b	30,63 ± 0,59 ^a

* Valores da média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α-tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α-tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α-tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F₄: filme com N₄ (sem agente ativo).

Fonte: Própria autoria.

6.6.1 Espessura

A espessura dos filmes foi controlada eficientemente e permaneceu constante ($p > 0,05$) em $0,080 \pm 0,002$ mm (Tabela 25). Segundo Benbettaieb et al. (2014), o controle deste parâmetro tem um papel fundamental nas propriedades físicas e de barreira dos filmes.

6.6.2 Umidade

O conhecimento da umidade (U) é importante por causa do enorme efeito plastificante das moléculas de água, que podem afetar as principais propriedades do material. As amostras de filmes não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) de U, permanecendo em torno de 18% (Tabela 25). Pode-se inferir que a fração de fase oleosa das nanoemulsões não foi suficiente para afetar a higroscopicidade dos filmes, que foi predominantemente definida pela matriz dos biopolímeros e pelo plastificante, e não pelos componentes lipofílicos incorporados.

6.6.3 Solubilidade em água e grau de inchamento

A solubilidade dos filmes em água é uma característica importante que pode afetar a integridade dos filmes eventualmente em contato com alimentos muito úmidos, bem como a migração dos agentes ativos que eles encapsulam (COZMUTA et al., 2015). Todos os filmes carregados com nanoemulsões (F₁, F₂, F₃ ou F₄) apresentaram solubilidade em água (43,1 e 48,9%) ligeiramente inferior ($p < 0,05$) à apresentada pelo filme controle F₀ (50,8%), sendo que

os filmes F_1 e F_2 foram os que exibiram os menores valores de SA entre as amostras com agentes ativos, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$) (Tabela 25).

Ahmad et al. (2012) relataram uma redução na SA de filmes à base de gelatina após a incorporação de óleo de Bergamota e Erva-cidreira. Segundo esses autores, os componentes não polares desses óleos resultaram em uma interferência física substancial no arranjo das cadeias de polipeptídios de gelatina dentro da matriz, o que pode ter levado a um bloqueio significativo na capacidade da gelatina de interagir com as moléculas de água (AHMAD et al., 2012; HOSSEINI et al., 2013).

Gomez-Estaca et al. (2010) e Ma et al. (2012) constataram valores similares de SA àqueles obtidos nesta pesquisa para filmes à base de gelatina-quitosana (44,7%) ou gelatina (41,1%) carregados com gotas de óleo de cravo ou azeite de oliva nanoemulsificados em água, respectivamente. Gómez-Estaca et al. (2010) atribuíram esses resultados à aparição de interações proteína-polifenóis do óleo essencial usado, que fortaleceram os arranjos que estabilizam a rede da gelatina. Por outro lado, Jridi et al. (2014) obtiveram maiores valores de SA para filmes à base de G-Q (85,6%), ao passo que Benbettaieb et al. (2014) e Hosseini et al. (2013) verificaram menores valores para filmes de G-Q (37,8 - 39,1%) ou G-Q carregados com óleo essencial de cravo (29,5%).

Com relação ao grau de inchamento (GI), pode-se observar que essa característica dos filmes não dependeu da incorporação (ou não) dos agentes lipofílicos nanoemulsificados dentro da matriz, e sim da alta capacidade de absorção de água da gelatina (KAVOOSI et al., 2013). Observou-se que, embora F_0 tenha sido o filme mais solúvel em água ($p < 0,05$), este apresentou o menor grau de inchamento (26,9 g/g) entre todas as amostras (Tabela 25).

6.6.4 Ângulo de contato de água

Na Figura 27, são apresentados os valores médios de ângulo de contato na interface superfície dos filmes-ar com análises comparativas por um tempo de 60 segundos após a gota de água entrar em contato com a superfície da amostra.

Os filmes F_0 e F_4 apresentaram os maiores valores de ângulo de contato (91 e 87°, respectivamente) quando comparados com os filmes contendo os agentes ativos ($p < 0,05$), os quais apresentaram uma maior capacidade de molhabilidade. Esse fenômeno está diretamente associado à orientação dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície da matriz após a secagem, bem como à rugosidade da superfície de F_1 , F_2 e F_3 , em razão da incorporação das nanoemulsões. Pode-se inferir que os valores de ângulo de contato puderam ter sido controlados

principalmente pela gelatina e pelo glicerol, que promoveram fenômenos de adsorção rápida de água e inchamento (MARCUIZZO et al., 2010).

Figura 27 - Imagens representativas do ângulo de contato de gotas de água sobre a superfície dos filmes: A) F₀: filme controle, sem nanoemulsão; B) F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); C) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); D) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); E) F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)

Fonte: Própria autoria.

Apesar de a incorporação das nanoemulsões ter implicado em alterações significativas ($p < 0,05$) nos valores de ângulo de contato dos filmes, verificou-se que todos eles, exceto F₂, podem ser classificados como de superfície hidrofóbica por terem um ângulo de contato (θ) maior que 65° . Segundo Kurek, Galus e Debeaufort (2014) e Vogler (1998), $\theta > 65^\circ$ geralmente representa uma superfície hidrofóbica, enquanto $\theta < 65^\circ$ reflete uma superfície hidrofílica. Contrariamente às expectativas, pode-se observar que o maior ângulo de contato nos filmes e, consequentemente, a maior hidrofobicidade, não se produzem pela adição dos agentes ativos, sobre os quais se conhece que têm uma baixíssima afinidade pela água (BONCUORE; CONTE; DEL NOBILE, 2005). Possivelmente, a presença dos emulsificantes nos filmes ativos também pode ter afetado essa propriedade.

Alexandre et al. (2016) e Sasaki, Mattoso e de Moura (2016) também obtiveram filmes à base de gelatina ou pectina carregadas com nanoemulsões de óleo de gengibre ou óleo de cravo, respectivamente, com uma superfície hidrofóbica. De acordo com Sasaki; Mattoso e de

Moura (2016), a presença de nanogotas de óleo nas matrizes poliméricas, dispersas de maneira mais homogênea, ajuda a incrementar a hidrofobicidade dos filmes. Por outro lado, Hosseini et al. (2016) identificaram valores de $\theta = 61$ e 70° para um filme à base de gelatina-quitosana incorporado com óleo essencial de orégano, os quais foram consistentes com os valores determinados nesta tese para os filmes ativos (Figura 27).

6.6.5 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) estão apresentados na Tabela 26. Observou-se que a PVA dos filmes não foi afetada ($p > 0,05$) pela incorporação das nanoemulsões, permanecendo em torno de 8×10^{-12} g/m.s.Pa. Resultados similares de PVA foram ilustrados por Alexandre et al. (2016) e Atarés, Bonilla e Chiralt (2010) quando trabalharam com filmes à base de gelatina e caseinato de sódio incorporados com nanoemulsões de óleo de gengibre e canela, respectivamente. Por outro lado, Ahmad et al. (2012) e Hosseini et al. (2016) identificaram maiores valores de PVA para filmes nanocompósitos à base de gelatina ou gelatina/quitosana quando incorporados com diferentes concentrações dos óleos essenciais de Bergamota e Erva-cidreira ($1,0 - 1,9 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa) ou óleo essencial de orégano ($1,4 - 1,9 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa), respectivamente. Segundo Gontard et al. (1994) e Wang et al. (2013), a PVA dos filmes deve ser tão baixa quanto for possível, uma vez que a embalagem de alimentos visa evitar ou, pelo menos, diminuir a transferência de umidade entre o alimento e a atmosfera circundante, ou entre dois componentes de um produto alimentar heterogêneo.

Tabela 26 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana

Amostra*	PVA x 10^{12} (g/m.s.Pa)
F ₀	$8,0 \pm 0,5^a$
F ₁	$8,9 \pm 0,5^a$
F ₂	$8,6 \pm 0,2^a$
F ₃	$8,6 \pm 0,4^a$
F ₄	$8,0 \pm 1,0^a$

* Valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F₄: filme com N₄ (sem agente ativo).

Fonte: Própria autoria.

A princípio, era de se esperar que a adição dos compostos hidrofóbicos melhorasse as propriedades de barreira ao vapor de água da matriz biopolimérica (G–Q), uma vez que os compostos lipofílicos dispersos poderiam limitar a difusão do vapor de água através do filme, em decorrência do aumento da tortuosidade que impedia a transferência de água pelas descontinuidades do filme (TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2014b). Porém, a transferência de massa em sistemas dispersos ocorre por meio da fase contínua, neste caso, pela matriz polimérica. Então, à medida em que essa fase contínua ocupa a maior parte das fases em massa, o espaço ocupado pelas gotas de óleo é muito baixo e não consegue retardar a taxa de transferência de vapor de água significativamente. Portanto, a permeabilidade não pode ser reduzida pela adição de tais quantidades de nanoemulsão (ALEXANDRE et al., 2016).

6.6.6 Propriedades mecânicas

Na Tabela 27, são apresentados os resultados das propriedades mecânicas dos diferentes filmes à base de G–Q incorporados ou não das nanoemulsões N₁, N₂, N₃ ou N₄.

Tabela 27 - Propriedades mecânicas de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana

Amostra	TR (MPa)	ER (%)	ME (MPa)	FP (N)	DP (%)
F ₀	19,0 ± 2,1 ^a	89,1 ± 6,4 ^d	101,4 ± 4,5 ^a	12,9 ± 0,8 ^a	10,4 ± 1,1 ^d
F ₁	11,4 ± 1,0 ^b	108,7 ± 2,2 ^c	37,3 ± 2,5 ^b	6,6 ± 0,2 ^c	11,4 ± 0,4 ^c
F ₂	8,9 ± 0,9 ^c	111,7 ± 4,8 ^{bc}	30,1 ± 4,9 ^c	7,3 ± 1,1 ^b	14,4 ± 0,9 ^a
F ₃	9,8 ± 3,7 ^{bc}	113,2 ± 2,1 ^b	39,2 ± 3,6 ^b	7,8 ± 1,1 ^b	13,6 ± 0,6 ^b
F ₄	10,0 ± 1,1 ^{bc}	123,3 ± 1,3 ^a	29,0 ± 3,6 ^c	6,9 ± 0,7 ^c	14,1 ± 0,9 ^{ab}

* Valores da média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). TR = Tensão na ruptura, ER = Elongação na ruptura, ME = Módulo elástico, FP = Força máxima de perfuração, DP = Deformação na perfuração. **Fonte:** Própria autoria.

O filme F₀ exibiu a maior TR ($p < 0,05$) e menor ER entre todas as amostras, com valores de 19,0 MPa e 89,1%, respectivamente. Por outro lado, os filmes carregados com nanoemulsões apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na TR, bem como um aumento significativo na ER, quando comparados com F₀, comportamento típico de efeito plastificante (SOBRAL et al., 2001). Esse fenômeno corroborou estudos anteriores que relataram que a adição de

compostos lipofílicos, tais como óleos essenciais ou ácidos graxos, diminui os valores de TR de filmes de gelatina (LIMPISOPHON; TANAKA; OSAKO, 2010; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2013) quitosana (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; RUBILAR et al., 2013) ou proteína de soro de leite (SOAZO; RUBIOLO; VERDINI, 2011), como resultado da incapacidade dos lipídios para formar matrizes contínuas e coesivas (PÉROVAL et al., 2002; RUBILAR et al., 2013). Como os princípios ativos estavam com dimensões manométricas, eles podem ter atuado como lubrificantes quando encontraram espaço entre macromoléculas adjacentes e o efeito lubrificante simularia o efeito plastificante.

Kavoosi et al. (2013) e Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2014b) determinaram valores comparáveis de ER para filmes à base de gelatina (128% e 114%, respectivamente). Nesses casos, uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de TR foi obtida quando carvacrol ou óleos essenciais de manjerição e limão foram incorporados nos filmes. Por outro lado, Hosseini et al. (2016) relataram um aumento significativo ($p < 0,05$) do valor de ER, atingindo um valor de 151,8% em filmes à base de gelatina-quitosana emulsionados com óleo de orégano (0,4% m/v), assim como uma redução de 69% no valor inicial da TR. Esse comportamento foi atribuído à natureza química da mistura dos biopolímeros e ao efeito plastificante do óleo essencial incorporado na matriz, que resultou no aprimoramento das propriedades dúcteis dos filmes (HOSSEINI et al., 2016; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2012).

A adição das nanoemulsões na matriz polimérica levou a uma redução significativa ($p < 0,05$) na rigidez dos filmes, de modo que a maior redução do ME foi observada em F₄ (71,4%), enquanto a menor redução foi apresentada por F₃ (61,3%), quando comparada com F₀ (Tabela 25). Hosseini et al. (2016) e Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2014b) também relataram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no ME de filmes à base de G-Q ou gelatina, em comparação com os filmes controle (sem óleos essenciais), quando foram incorporados com óleo essencial de orégano ou óleos essenciais de manjerição e limão.

Com relação ao teste de perfuração, os resultados indicaram que os filmes carregados com nanoemulsões apresentaram uma redução considerável ($p < 0,05$) na FP, bem como um aumento na DP quando comparados com F₀ (Tabela 27), o que ocorreu em razão do efeito lubrificante/plastificante dos compostos lipofílicos nanoemulsificados (HOSSEINI et al., 2016). Esses resultados estão em concordância com aqueles discutidos anteriormente para TR e ER. Nesse sentido, os filmes mais resistentes e deformáveis à perfuração após a incorporação dos agentes ativos foram F₃ com um valor FP de $7,8 \pm 1,1$ N e F₂ com um valor DP de $14,4 \pm 0,9\%$ ($p < 0,05$), respectivamente. Os valores de FP foram superiores àqueles relatados por

Kanatt et al. (2012) para Filmes à base de blenda poli(vinil álcool)-quitosana com extratos naturais ($1,3 \pm 0,2$ N) e inferiores aos relatados por Alexandre et al. (2016), Reyes et al. (2017) e Wang et al. (2009) para filmes à base de gelatina incorporados com nanoemulsões de óleo essencial de gengibre ($24,8 \pm 0,5$ N), óleo essencial de cravo e manjerição (11 – 19 N) e óleo de milho (15,7 – 28,5 N), respectivamente. Esses autores também identificaram valores de DP entre 3,8 e 5,9% para esses filmes.

6.6.7 Propriedades ópticas

Na Tabela 28, são apresentados os resultados de cor, opacidade e brilho medidas para os diferentes filmes à base de G–Q incorporados ou não das nanoemulsões N₁, N₂, N₃ ou N₄.

Tabela 28 - Propriedades ópticas de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana

Amostra	Parâmetros de cor				Opacidade	Brilho	
	L^*	a^*	b^*	ΔE^*		60°	20°
F ₀	$91,1 \pm 0,9^a$	$-1,1 \pm 0,2^d$	$4,6 \pm 0,5^c$	$4,0 \pm 0,5^d$	$0,6 \pm 0,0^d$	$143,8 \pm 1,8^a$	$39,4 \pm 4,9^a$
F ₁	$89,9 \pm 0,2^b$	$-4,0 \pm 0,6^a$	$12,2 \pm 1,8^a$	$11,8 \pm 1,2^a$	$2,0 \pm 0,1^c$	$118,1 \pm 1,5^b$	$17,2 \pm 0,9^b$
F ₂	$90,9 \pm 0,1^{ab}$	$-1,6 \pm 0,1^c$	$5,6 \pm 0,3^{bc}$	$4,8 \pm 0,4^c$	$2,9 \pm 0,2^b$	$31,2 \pm 0,9^d$	$5,7 \pm 0,4^{cd}$
F ₃	$90,3 \pm 0,0^{ab}$	$-2,2 \pm 0,1^b$	$7,1 \pm 0,1^b$	$5,7 \pm 0,1^b$	$2,4 \pm 0,0^c$	$47,6 \pm 2,1^c$	$7,2 \pm 1,2^c$
F ₄	$91,2 \pm 0,2^a$	$-1,8 \pm 0,1^{bc}$	$5,9 \pm 0,3^b$	$5,2 \pm 0,2^c$	$5,6 \pm 0,4^a$	$26,4 \pm 2,3^e$	$3,0 \pm 0,3^d$

* Valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F₄: filme com N₄ (sem agente ativo).

Fonte: Própria autoria.

6.6.7.1 Cor

Apesar da ligeira diferença ($p < 0,05$) observada na luminosidade (L^*), esses valores se mantiveram em torno de 90 para todos os filmes, valor típico de filmes claros (Tabela 28). Valores similares de L^* foram relatados por Bonilla e Sobral (2016), Jridi et al. (2014), Pereda et al. (2011) e Rivero et al. (2009), trabalhando com filmes à base de gelatina-quitosana.

O filme F₀ apresentou os menores valores ($p < 0,05$) de a^* (-1,1) e b^* (4,6), enquanto F₁ apresentou os maiores valores para esses parâmetros (Tabela 28). Os valores de a^* foram reduzidos, enquanto os de b^* aumentaram significativamente ($p < 0,05$) nos filmes incorporados com os agentes ativos, quando comparados com os filmes controles F₀ e F₄. Esse resultado revelou uma tendência verde-amarelada nos filmes F₁, F₂ e F₃ como resultado dos agentes

nanoemulsificados (Cin, OEA e α -t) (TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2014b). Por outro lado, a diferença total de cor (ΔE^*) dos filmes também apresentou um incremento quando as nanoemulsões foram incorporadas, sendo N_1 a que originou filmes mais coloridos (F_1) com valores de $\Delta E^* = 11,8 \pm 1,2$. A título de comparação, filmes de gelatina plastificados com glicerol tem $\Delta E^* \rightarrow 0$ (SOBRAL, 1999).

Alexandre et al. (2016) e Dammak et al. (2017a) apontaram uma tendência semelhante para o a^* (amarelado) em filmes de gelatina quando incorporados com nanoemulsões O/A encapsulando rutina ou óleo essencial de gengibre, respectivamente. Por outro lado, Peng e Li (2014) e Tongnuanchan; Benjakul e Prodpran (2014b) relataram que a incorporação de óleos essenciais em filmes à base de quitosana ou de gelatina também aumentou os valores de b^* e ΔE^* , ao passo que o valor de L^* diminui quando comparados com o filme controle (sem óleos essenciais). Em geral, as medidas obtidas para estes parâmetros estão em concordância com as determinadas por Ahmad et al. (2012), Atarés et al. (2010) e Atarés, Bonilla e Chiralt (2010), que relataram efeitos significativos ($p < 0,05$) dos compostos lipofílicos adicionados sobre as propriedades ópticas de filmes à base de gelatina, proteína de soja ou caseinato de sódio, respectivamente.

6.6.7.2 Opacidade

A incorporação de nanoemulsões teve um efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a difração de luz e, consequentemente, sobre o incremento da opacidade dos filmes (Tabela 28). Esse impacto pode ter sido regido pela diferença de tamanho de gotas de óleo e distribuição dessas gotas ou pela dispersão de luz nas interfaces das gotas inseridas na matriz polimérica (ATARÉS; CHIRALT, 2016; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2014b). O filme F_4 apresentou o maior valor de opacidade ($5,6 \pm 0,4$), coincidindo com o filme de menor valor de transmitância, conforme será apresentado na Figura 35, enquanto o filme F_1 apresentou o menor valor de opacidade ($2,0 \pm 0,1$) de todas as amostras que continham agentes ativos nanoemulsificados. Dammak et al. (2017a) obtiveram valores de opacidade ($2,87 \pm 0,03$) para filmes à base de gelatina incorporados com nanoemulsões O/A encapsulando rutina, que coincidem com aqueles apresentados na Tabela 28. Por outro lado, Alexandre et al. (2016), Atarés et al. (2010), López-Mata et al. (2013), Sánchez-González et al. (2009), Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2014a) e Yuan et al. (2015) confirmaram que filmes emulsionados à base de diferentes biopolímeros carregados com compostos lipofílicos tornaram-se mais opacos, provavelmente pela presença de uma fase dispersa não miscível na matriz polimérica que

aumentou a opacidade em função da diferença no índice de refração das fases (ALEXANDRE et al., 2016; VILLALOBOS et al., 2005).

6.6.7.3 Brilho

A norma ASTM D523 (1999) define o brilho como a relação entre o fluxo luminoso refletido de uma amostra e o fluxo luminoso refletido a partir de uma superfície padrão sob as mesmas condições geométricas, ou seja, trata-se de uma propriedade de superfície em função de sua textura. De acordo com Ward e Nussinovitch (1996), a incorporação de óleo em uma matriz polimérica produz um aumento na sua heterogeneidade e, portanto, um aumento da rugosidade superficial, que normalmente se associa à diminuição do brilho da matriz polimérica. Este fenômeno é explicado pela migração das gotas de óleo ou seus agregados para a superfície do filme durante a secagem, diminuindo assim a refletância especular na interface superfície-ar e, portanto, reduzindo o brilho do filme (ATARÉS; CHIRALT, 2016).

Na Tabela 28, pode-se observar que a incorporação de nanoemulsões afetou de forma negativa ($p < 0,05$) o brilho dos filmes, testado nos ângulos 20° e 60°, em razão principalmente do incremento na rugosidade superficial dos mesmos, pelo efeito das nanoemulsões. Em geral, as variações nas respostas do brilho seguem a mesma tendência em ambos os ângulos, em que o filme F₀ foi o mais brilhante com valores de $143,8 \pm 1,8$ e $39,4 \pm 4,9$, e F₄ foi o menos brilhante com valores de $26,4 \pm 2,3$ e $3,0 \pm 0,3$, para 60° e 20°, respectivamente. Esse comportamento pode estar associado ao tamanho de gotas e à distribuição do tamanho de gotas da nanoemulsão N₄, previamente discutido em 6.5.2, assim como à microestrutura e rugosidade desse filme.

Um comportamento similar na redução do brilho foi amplamente descrito por Alexandre et al. (2016), Bitencourt et al. (2014), Bonilla e Sobral (2016), Dammak et al. (2017a,b), Fabra et al. (2011) e Sánchez-González et al. (2009) para filmes à base de biopolímeros, em virtude da incorporação de nanoemulsões O/A e extratos ou outros compostos lipofílicos. Todos esses autores atribuíram esse efeito à presença de irregularidades nas superfícies do filme, as quais reduziram a difração especular da luz (VILLALOBOS et al., 2005).

6.6.8 Isotermas de absorção de vapor de água

As isotermas de absorção de vapor de água de todos os filmes, determinadas a 20 °C, apresentaram forma sigmoideal (Figura 28), que representa uma isoterma Tipo II de acordo com a classificação de Brunauer et al. (1938). Esse mesmo comportamento de isotermas de absorção de vapor de água foi descrito por Ayala-Valencia (2017), Jiménez et al. (2013), Sobral e

Habitante (2001) e Wolf, Sobral e Telis (2009), trabalhando com filmes à base de gelatina, amido ou colágeno, plastificados com glicerol e a 25 °C.

Observou-se que a incorporação das nanoemulsões resultou em uma menor absorção de vapor de água em função da Aa e, portanto, em uma redução da umidade de equilíbrio (UE) dos filmes, sendo o filme F₀ o mais higroscópico e os filmes F₂ e F₃ os menos higroscópicos, enquanto os filmes F₁ e F₄ se mantiveram em uma região intermédia (Figura 28). Resultados similares foram obtidos por Fabra, Talens e Chiralt (2010), Kim e Ustunol (2001) e Soazo, Rubiolo e Verdini (2011), que informaram que a incorporação de lipídios na matriz polimérica reduziu ligeiramente a UE dos filmes emulsionados à base de caseína ou proteína do soro de leite quando comparados com os filmes elaborados à base das proteínas puras (controle). Segundo esses autores, a incorporação de lipídios na matriz dos filmes promoveu uma barreira ao vapor de água, modificando as relações entre UE e atividade de água. Por outro lado, Zinoviadou, Koutsoumanis e Biliaderis (2009) constataram que a incorporação de baixas concentrações de óleo essencial de orégano em filmes à base de proteína isolada de soro de leite não afetou significativamente ($p>0,05$) a UE dos filmes.

Figura 28 – Exemplos de isotermas de absorção de vapor de água dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)

Fonte: Própria autoria.

Os modelos teóricos de BET e GAB (BRUNAUER et al., 1938; VAN DEN BERG; BRUIN, 1981) e os modelos empíricos de Peleg e Oswin (PELEG, 1993; OSWIN, 1946) foram ajustados aos dados experimentais das isotermas de absorção de vapor de água (Teor de água vs. atividade de água). Pode-se observar na Figura 29 que todos esses modelos descreveram satisfatoriamente o comportamento das isotermas de absorção de vapor de água dos filmes, no domínio de Aa estudado. Os parâmetros dessas equações, calculados por regressão não linear ($R^2 > 0,99$), estão apresentados na Tabela 29. De acordo com os valores do desvio padrão estimado, o modelo com melhor ajuste às isotermas de absorção de vapor de água foi o modelo de GAB. Portanto, recomendaria-se o uso deste modelo para representar a capacidade absorção de vapor de água de filmes à base de blenda de gelatina-quitosana incorporados ou não de nanoemulsões contendo agentes lipofílicos.

Figura 29 - Ajuste de modelos aos dados experimentais das isotermas de absorção de vapor de água dos filmes. A) F₀: filme controle sem nanoemulsão; B) F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); C) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); D) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/ cinamaldeído/óleo essencial de alho); E) F₄: filme com N₄ (sem agente ativo) *Continua....*

Figura 29 - Ajuste de modelos aos dados experimentais das isotermas de absorção de vapor de água dos filmes. A) F₀: filme controle sem nanoemulsão; B) F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); C) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); D) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/ cinamaldeído/óleo essencial de alho); E) F₄: filme com N₄ (sem agente ativo) *Continuação....*

Figura 29 - Ajuste de modelos aos dados experimentais das isotermas de absorção de vapor de água dos filmes. A) F₀: filme controle sem nanoemulsão; B) F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); C) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); D) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/ cinamaldeído/óleo essencial de alho); E) F₄: filme com N₄ (sem agente ativo) **Conclusão....**

Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 29, pode-se observar que aqueles filmes incorporados com as nanoemulsões N₂ e N₃, que continham o óleo essencial de alho na sua formulação, foram os que apresentaram uma maior redução de umidade na monocamada (X₀) dos modelos de BET e GAB, com valores de X₀ para F₂ = 15,1 ou 15,6 (g H₂O/100 g filme b.s.) e F₃ = 14 ou 16 (g H₂O/100 g filme b.s.), portanto, foram os menos higroscópicos. Todos os valores de X₀ estiveram acima dos descritos por Ayala-Valencia (2017), Jimenez et al. (2013), e Sobral e Habitante (2001), para filmes à base de diferentes biopolímeros plastificados com glicerol, os quais estiveram em torno de 9,0 a 13,0 g H₂O/100 g b.s. Porém, os valores de X₀ para o filme controle F₀, que apresentou maior higroscopicidade, estiveram na ordem àqueles relatados por Jangchud e Chinnan (1999) para filmes à base de proteína de amendoim plastificados com glicerol (21 – 24 g H₂O/100 g b.s.).

Por outro lado, a constante da multicamada K do modelo de GAB foi praticamente igual para todos os filmes (Tabela 29). Esse valor correspondeu aos valores de K descritos por Kim e Ustunol (2001), Soazo, Rubiolo e Verdini (2011) e Sobral e Habitante (2001).

Ao comparar os valores da umidade na monocamada (X_0) com os valores de umidade do filme em base seca ($X_{b.s.}$), pode-se observar que os filmes incorporados com os agentes ativos nanoemulsificados (F_1 , F_2 e F_3) apresentaram $X_{b.s.} = 21 - 22$ (Tabela 25), portanto, maiores que as respectivas umidades da monocamada, $X_0 = 14 - 17$ g $H_2O/100$ g filme b.s (Tabela 29). Isso deve ser considerado na conservação dos princípios ativos nos filmes na estocagem, pois pode haver aumento da taxa de reação de oxidação dos componentes lipofílicos dos filmes, uma vez que a taxa de oxidação mínima ocorre na umidade da monocamada, conforme o Diagrama de estabilidade dos alimentos (LABUZA et al., 1972).

Na Tabela 29, pode-se observar também que as constantes dos modelos de BET (C_B), GAB (C_G), Peleg (M_1 , M_2 , N_4 e N_1) e Oswin (A e B) apresentaram valores bastante distintos entre cada filme. Porém, esses modelos representaram adequadamente os dados experimentais medidos das isotermas de absorção de vapor de água dos filmes, independentemente de serem teórico ou empírico, em razão dos seus elevados coeficientes de determinação ($R^2 > 0,99$).

Tabela 29 - Parâmetros dos modelos de BET, GAB, Peleg e Oswin ajustados aos dados experimentais das isotermas de absorção de água

Modelo	Parâmetro	Amostra				
		F_0	F_1	F_2	F_3	F_4
BET	X_0	21,6	17,3	15,1	14,0	16,9
	C_B	20,4	15,6	29,1	66,5	71,5
	DP	0,004	1,62	0,40	0,58	0,64
GAB	X_0	23,2	18,4	15,6	16,0	20,3
	C_G	13,1	10,2	18,8	9,1	10,9
	K	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9
	DP	0,004	0,003	0,004	0,009	0,002
Peleg	M_1	54,3	201,8	37,1	185,4	53,1
	N_4	0,6	9,2	0,5	9,1	0,7
	M_2	199,4	60,5	134,0	55,4	111,8
	N_1	5,4	0,7	5,5	1,0	5,6
	DP	0,37	1,39	0,18	1,03	0,20
Oswin	A	42,5	36,1	29,7	27,4	35,0
	B	0,53	0,6	0,6	0,7	0,6
	DP	0,66	3,15	0,70	1,48	0,48

DP = Desvio padrão estimado, BET= Brunauer-Emmett-Teller, GAB = Guggenheim-Anderson-Boer. X_0 = Teor de água na monocamada (g $H_2O/100$ g filme b.s.), C_B = constante de BET, C_G e K = constante de GAB, M_1 , M_2 , N_4 e N_1 = parâmetros do modelo de Peleg e A e B = constantes de Oswin. F_0 : filme sem nanoemulsão; F_1 : filme com N_1 (α -tocoferol/cinamaldeído); F_2 : filme com N_2 (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F_3 : filme com N_3 (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F_4 : filme com N_4 (sem agente ativo).

Fonte: Própria autoria.

6.6.9 Microestrutura dos filmes

6.6.9.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias do MEV para a morfologia de superfície dos filmes revelaram microestruturas contínuas, sem riscos ou porosidades dentro da matriz (Figura 30a). Porém, uma certa rugosidade na superfície e na seção transversal dos filmes adicionados com as nanoemulsões N₁, N₂, N₃ e N₄ foi observada e posteriormente confirmada com as análises de microscopia de força atômica (MFA). Um incremento da rugosidade na seção transversal também foi relatado por Hoque, Benjakul e Prodpran (2011) e Hosseini et al. (2016) em filmes à base de gelatina ou gelatina-quitosana quando estes foram incorporados com extratos de canela, cravo ou anis, ou com óleo essencial de orégano, respectivamente.

Dentre todas as amostras, F₄ apresentou a maior rugosidade superficial e transversal (Figura 30). Portanto, pode-se inferir que os agentes ativos nanoemulsificados proporcionaram menor rugosidade do filme quando incorporados na matriz de F₁, F₂ e F₃. Acevedo-Fani et al. (2015) e Chen et al. (2016) também identificaram uma melhora na microestrutura de filmes à base de alginato de sódio quando emulsionados com óleos essenciais, processo esse diferente do utilizado nesta tese, ou à base de quitosana quando aditivados com uma nanoemulsão de cinamaldeído, respectivamente.

Com relação à estrutura interna analisada na seção transversal dos filmes (Figura 30b), pode-se observar que os filmes F₁, F₂, F₃ e F₄ apresentaram uma microestrutura menos homogênea, como se estivessem folheadas, quando comparados com o filme controle F₀. Esse comportamento pode ter sido provocado pela presença das nanogotas das emulsões que, de certa forma, implicaram na formação da matriz biopolimérica durante a secagem da SFF. Resultados similares foram descritos por Bonilla et al. (2012) para filmes à base de quitosana nanoemulsificados com óleos essenciais de manjerição e tomilho, cujas matrizes apresentaram microfraturas quando adicionadas com os óleos essenciais, enquanto o filme controle apresentou uma microestrutura compacta e contínua sem a presença desses óleos.

Figura 30 – Imagens representativas da microestrutura de A) superfície e B) seção transversal dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁; F₂: filme com N₂; F₃: filme com N₃; F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)

Fonte: Própria autoria.

6.6.9.2 Microscopia de força atômica (MFA)

As imagens topográficas da superfície dos filmes estão apresentadas em 3-D e 2-D na Figura 31. As análises de MFA permitiram observar filmes à base de gelatina-quitosana controle com topografia regular e filmes adicionados com as nanoemulsões com topografia bastante irregular. Estes resultados confirmam aqueles descritos na seção **6.6.9.1**.

A incorporação das nanoemulsões na matriz biopolimérica provocou um incremento acentuado tanto na rugosidade média (R_a) quanto na rugosidade média quadrática (R_q) dos filmes, provavelmente como resultado de irregularidades nas superfícies dos filmes, provocadas pelas gotas de lipídios das nanoemulsões, na etapa de secagem (MA et al., 2012), embora nossa hipótese é que estariam bem dispersas na matriz pelo tamanho manométrico das mesmas. O R_q aumentou drasticamente de 11 nm (Filme F_0) até um valor máximo de 59 nm, para o filme F_1 , com nanoemulsão sem agentes ativos. Os valores de R_a mostraram uma tendência similar, aumentando de 7 nm até 44 nm (Tabela 30). Atarés, Bonilla e Chiralt (2010), Hosseini et al. (2016) e Ma et al. (2012) também identificaram um aumento na rugosidade com valores similares de R_q e R_a como resultado da incorporação de óleos de gengibre, de orégano ou azeite em filmes à base de caseinato de sódio, gelatina-quitosana ou gelatina, respectivamente.

Esses resultados de aumento de rugosidade de superfície dos filmes F_1 , F_2 , F_3 e F_4 em razão da incorporação de uma fração lipídica na matriz polimérica corroboram aqueles resultados de aumento da molhabilidade e redução na difração especular da luz (brilho) para esses filmes, conforme discutido previamente nas seções **6.6.4** e **6.6.7.3**, respectivamente.

Tabela 30 - Parâmetros de rugosidade da superfície de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana

Amostra*	R_a (nm)	R_q (nm)
F_0	7	11
F_1	31	40
F_2	39	54
F_3	32	43
F_4	44	59

* F_0 : filme controle sem nanoemulsão; F_1 : filme com N_1 (α -tocoferol/cinamaldeído); F_2 : filme com N_2 (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F_3 : filme com N_3 (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F_4 : filme com N_4 (sem agente ativo). R_a : rugosidade média; R_q : rugosidade média quadrática.

Fonte: Própria autoria.

Figura 31 – Imagens representativas da rugosidade dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁; F₂: filme com N₂; F₃: filme com N₃; F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). A) Topografia em 3D; b) Topografia em 2D

Fonte: Própria autoria.

6.6.10 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros obtidos no FTIR (Figura 32) revelaram vibrações em 1239 cm^{-1} , 1549 cm^{-1} e 1634 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento dos grupos C-N, N-H (amida I) e carbonila (C=O), respectivamente (FERREIRA et al., 2014; RUBILAR et al. 2013). Bandas características dos grupos amida II e amida III e estiramentos do grupo C-H e O-H também foram observadas entre 2800 e 3300 cm^{-1} (PEREDA et al., 2011). Os espectros dos filmes F₁, F₂, F₃ e F₄ exibiram as mesmas bandas características do filme F₀, portanto, pode-se inferir que não ocorreram mudanças químicas, tais como interações covalentes, na estrutura da matriz polimérica por causa das nanoemulsões (FERREIRA et al., 2014). Porém um ligeiro deslocamento das bandas de 2863 e 2923 cm^{-1} e uma nova banda localizada em 1741 cm^{-1} foram detectados em F₁, F₂, F₃ e F₄, quando comparados com F₀, provavelmente como resultado de um grupo carboxílico ou um grupo carbonila de tri-acilglicerídeos presentes nas blendas gelatina-quitosana, incorporadas com as nanoemulsões (FERREIRA et al., 2014). Mudanças na posição dos picos em uma matriz de gelatina-quitosana também foram constatadas por Pereda et al. (2011), inferindo que as ligações de hidrogênio ou outros estiramentos desempenham uma função na formação do complexo G-Q.

Ferreira et al. (2014) e Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2014a) também relataram uma banda localizada em 1742 cm^{-1} para filmes à base de quitosana e gelatina, respectivamente, quando incorporados com óleos essenciais. Segundo esses autores, essa nova banda surgiu das vibrações dos grupos carbonilo (C=O) de tri-acilglicerídeos. Por outro lado, Chen et al. (2016) também observaram bandas nos comprimentos de onda 2863 e 2923 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de estiramento dos grupos -CH₂, assim como bandas na faixa de $3200 - 3600\text{ cm}^{-1}$, atribuídas a vibrações de estiramento do grupo -OH correspondente às interações intra e intermoleculares de H, como descrito nesta tese.

Figura 32 - Espectros FTIR dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)

Fonte: Própria autoria.

6.6.11 Difração de raios X (DRX)

Todos os filmes exibiram um padrão DRX característico de um material parcialmente cristalino com dois picos de difração bem definidos (Figura 33), o primeiro na região de $2\theta = 10^\circ$, correspondente tanto à estrutura da tripla hélice cristalina de gelatina quanto à rede relativamente cristalina da quitosana, e o segundo em uma banda mais ampla em $2\theta = 20^\circ$, correspondente a uma fase amorfa (PEREDA et al., 2011; VALENCIA et al., 2016). Os picos observados ao redor de $2\theta = 32^\circ$ podem ser atribuídos ao plano de difração (020) dos cristais hidratados da quitosana e se relacionam com o processo de preparo dos filmes, isto é, com a dissolução da quitosana na solução de ácido acético ou com a estrutura química dos agentes ativos incorporados (PEREDA et al., 2011).

Os agentes ativos nanoemulsificados reduziram ligeiramente a intensidade dos picos em F₁, F₂ e F₃, mas, em geral, o perfil dos espectros de difração desses filmes foi semelhante aos obtidos para F₀ e F₄. O aumento da intensidade do pico a 10° e $29,5^\circ$ em F₂ revela que a incorporação do OEA na matriz polimérica induziu a um aumento na cristalinidade dos filmes (Figura 33). Rubilar et al. (2013) também constataram um incremento na cristalinidade de

filmes à base de quitosana quando incorporaram carvacrol. Em contrapartida, Valenzuela, Abugoch e Tapia (2013) relataram que a introdução de óleo de girassol em um revestimento à base de proteína de quinoa-quitosana produziu uma estrutura menos cristalina. Por outro lado, Alexandre et al. (2016) não identificaram efeito algum sobre a cristalinidade de filmes à base de gelatina quando incorporaram óleo essencial de gengibre nanoemulsionado.

Figura 33 - Difrátograma de raios X dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)

Fonte: Própria autoria.

6.6.12 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Em geral, todos os filmes exibiram termogramas similares (Figura 34). Na primeira varredura, observou-se um pico endotérmico ocorrendo em baixas temperaturas, associado à fusão da fração lipídica, obviamente, exceto nos filmes sem emulsão (F₀), seguido de outro pico endotérmico bem definido, associado a uma transição sol-gel (SOBRAL et al., 2001; VALENCIA et al., 2016). Na segunda varredura, após resfriamento com nitrogênio líquido, foram observados apenas os picos endotérmicos da fusão da fração lipídica, que demonstraram

que não houve um fenômeno cooperativo, mas sim uma simples fusão do óleo nos filmes, seguida de uma transição vítrea. Não se observou a transição sol-gel na fração rica em gelatina na segunda varredura, pois não houve formação de zonas cristalinas durante o resfriamento com nitrogênio líquido, ou seja, a matriz biopolimérica estava completamente amorfa (ALEXANDRE et al., 2016).

Figura 34 - Termogramas DSC* dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). *Linhas retas e em traços correspondem à 1ª e à 2ª varreduras, respectivamente

Fonte: Própria autoria.

Na Figura 34, observou-se que apenas os filmes incorporados com nanoemulsões (F₁, F₂, F₃ e F₄) exibiram um pico endotérmico adicional àqueles da transição sol-gel em torno de -18 °C em ambas as varreduras. Para fins de reconhecimento por comparação, foi realizado uma análise de DSC do óleo de canola utilizado para carrear os agentes ativos e verificou-se que sua temperatura de fusão ocorreu em cerca de -20 °C (Termograma em Anexo II), demonstrando-se assim, que a primeira T_m observada nos termogramas dos filmes (Figura 34), correspondia de fato, à fusão da fração lipídica da emulsão. De maneira similar, Ma et al. (2012) analisaram filmes à base de gelatina nanoemulsificados com azeite de oliva e observaram um termograma

com um pico endotérmico a -8°C . Esses autores explicaram esse comportamento em função da T_m (-6°C) do azeite de oliva.

Na Tabela 31, estão apresentados os valores das temperaturas (T_{m1} e T_{m2}) e a entalpia (ΔH_{g1} e ΔH_{g2}) de fusão, calculados dos termogramas da primeira varredura, assim como a temperatura de transição vítrea (T_g), determinada na segunda varredura dos filmes à base de Gelatina-Quitosana. As temperaturas e entalpias de fusão da fração lipídica dos filmes se mantiveram entre -16 e -19°C e 5 e 8 J/g ($p < 0,05$), respectivamente. A temperatura de transição sol-gel e a respectiva entalpia, da fração rica em gelatina, mantiveram-se ao redor de 54°C e entre 9 e 12 J/g , respectivamente, sendo que nesses casos, observou-se diferença ($p < 0,05$) entre os resultados dos filmes controle e dos filmes contendo nanoemulsões.

Tabela 31 - Propriedades térmicas de filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana

Amostra	1 ^{ra} Varredura			2 ^{da} Varredura	
	T_{m1} ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_{g1} (J/g)	T_{m2} ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_{g2} (J/g)	T_g ($^{\circ}\text{C}$)
F ₀	---	---	$54,9 \pm 0,8^a$	$12,1 \pm 0,8^a$	$20,2 \pm 1,4^a$
F ₁	$-19,0 \pm 0,3^a$	$5,2 \pm 0,1^a$	$54,4 \pm 0,2^a$	$9,0 \pm 0,1^b$	$17,6 \pm 0,7^b$
F ₂	$-17,7 \pm 1,1^{b,c}$	$5,5 \pm 0,2^a$	$53,2 \pm 0,6^b$	$9,6 \pm 0,8^b$	$17,9 \pm 1,4^b$
F ₃	$-18,3 \pm 0,7^{a,b}$	$5,2 \pm 1,1^a$	$54,6 \pm 0,2^a$	$9,3 \pm 0,5^b$	$14,7 \pm 0,6^c$
F ₄	$-16,4 \pm 0,1^c$	$8,2 \pm 0,3^b$	$53,5 \pm 0,2^b$	$9,3 \pm 0,9^b$	$21,6 \pm 0,1^a$

* Valores da média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). T_g : Temperatura de transição vítrea; T_m : Temperatura de fusão; ΔH_g : Entalpia de fusão. (g/g de amostra total).

Fonte: Própria autoria.

Na segunda varredura, picos endotérmicos associados à fusão da fração lipídica foram observados, ocorrendo praticamente na mesma temperatura (T_{m1}) e com a mesma entalpia de fusão (ΔH_{g1}) que na primeira varredura (Tabela 31). Finalmente, observou-se ainda, a transição vítrea (T_g) da fração rica em gelatina, ocorrendo na forma de inflexão na linha de base dos termogramas (Figura 34). T_g variou entre 14 e 21°C ($p < 0,05$), diminuindo em função da adição dos agentes ativos, sendo que o menor valor foi determinado nos filmes contendo os três agentes ativos misturados (F₃). Esses valores de T_g foram inferiores àqueles descritos por Alexandre et al. (2016) e Reyes (2017) para filmes à base de gelatina incorporados com óleos essenciais de

gengibre (52 °C) ou de cravo e manjeriço (32 – 35 °C), respectivamente. Porém, corresponderam aos valores de Tg (16 – 22 °C) descritos por Dammak et al. (2017b) para filmes à base de gelatina incorporados com micropartículas de quitosana carregadas com rutina, também determinados na segunda varredura.

Por outro lado, a entalpia de fusão (ΔH_g) dos filmes associada à transição sol-gel foi significativamente ($p < 0,05$) reduzida de 12,1 J/g (F_0) até 9,0 J/g após a incorporação das nanoemulsões nos filmes F_1 , F_2 , F_3 e F_4 (Tabela 31), possivelmente em razão de um efeito de diluição dos biopolímeros pela adição das nanoemulsões. Esse fenômeno melhorou a resistência à tração de F_0 (Tabela 27). É possível que as distâncias entre as cadeias das macromoléculas de gelatina tenham aumentado nos filmes incorporados com N_1 , N_2 , N_3 e N_4 , portanto, o arranjo dessas cadeias diminuiu na matriz G–Q e aumentou a mobilidade molecular, reduzindo assim a entalpia de fusão. Alexandre et al. (2016) também observaram uma redução em ΔH_g de filmes à base de gelatina quando incorporados com nanoemulsões carregadas com óleo essencial de gengibre. Enquanto Jridi et al. (2014) identificaram maiores resultados para a Tg (64,7 °C) e ΔH_g (66,4 J/g) em filmes à base de G–Q, em virtude, talvez, de uma melhor interação intermolecular entre a gelatina e a quitosana.

6.6.13 Propriedades de barreira à luz UV/visível

Filmes transparentes são tipicamente desejáveis por sua maior aplicabilidade e aceitação nos sistemas de embalagem de alimentos. Porém, a incorporação dos agentes ativos nanoemulsificados tem uma influência direta na dispersão da luz e portanto, na percepção de sua cor e nas propriedades de barreira à luz dos filmes resultantes (AHMAD et al., 2012). Na Figura 35, estão apresentados os espectros UV/visíveis dos filmes à base de Gelatina-Quitosana obtidos em uma faixa de número de onda entre 250 – 800 nm. Nessa figura, pode-se observar que a incorporação dos agentes ativos nanoemulsificados provocou uma redução significativa ($p < 0,05$) da transmitância nos filmes F_1 , F_2 e F_3 na faixa de 250-280 nm, em comparação com o filme controle F_0 (23 %) e o filme F_4 (9 %), que continham também uma nanoemulsão, porém, sem agente ativo. De acordo com esses resultados, pode-se inferir que os filmes carregados com os agentes ativos nanoemulsificados têm as melhores barreiras à radiação na região de luz ultravioleta (UV). A capacidade protetora desses filmes à luz UV é dada pelos anéis aromáticos de resíduos de aminoácidos da molécula de gelatina e reforçada pela estrutura química dos agentes ativos emulsionados que contêm vários grupos fenólicos (BONILLA; SOBRAL, 2016; DAMMAK et al., 2017a). Gómez-Estaca et al. (2009) e Wu et al. (2013) também verificaram

excelentes propriedades de barreira à luz UV na faixa de 200 a 350 nm para filmes à base de gelatina incorporados com extratos de orégano ou chá verde, respectivamente.

Figura 35 - Espectros UV/Vis dos filmes F₀: filme controle sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho) e F₄: filme com N₄ (sem agente ativo)

Fonte: Própria autoria.

Na faixa de comprimento de onda visível (350 – 800 nm), F₀ apresentou a maior transmissão de luz (80 – 97%) quando comparado com F₁, F₂, F₃ ou F₄ ($p < 0,05$). Jridi et al. (2014) relataram valores próximos de transmissão de luz na mesma faixa (72,6 – 90,9%) para filmes à base de gelatina-quitosana, ao passo que Dammak et al. (2017a) observaram menores valores (45 – 56%) para filmes à base de gelatina. Em geral, pode-se inferir que a quitosana quando misturada com a gelatina teve uma contribuição significativa em termos de transmissão de luz na faixa visível (Jridi et al., 2014).

Com relação à transparência, que está diretamente associada à opacidade do filme, F₀ e F₄ apresentaram o menor ($0,29 \pm 0,01$) e maior ($0,96 \pm 0,02$) valor de transparência, portanto, foram os filmes com a menor e a maior opacidade, respectivamente, conforme ilustrado na

Tabela 28. Os valores de transparência dos filmes diferiram significativamente ($p < 0,05$) à medida em que as diferentes nanoemulsões foram incorporadas. Isso ocorreu, possivelmente, pelo efeito dos compostos lipofílicos que foram capazes de impedir ou dispersar a transmissão de luz através dos filmes (TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2012) ou pela formação de complexos poli-ânion/cátion entre a matriz de gelatina-quitosana e as nanoemulsões (JRIDI et al., 2014). Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2012) também observaram um incremento na opacidade de filmes à base de gelatina em razão do efeito da dispersão da luz provocada por gotas de óleos essenciais emulsionados na matriz polimérica. Por outro lado, Rivero et al. (2009) identificaram valores de transparência para filmes bi-camada à base de G-Q entre 0,68 e 0,99, os quais estiveram muito próximos àqueles obtidos nesta tese para F₁, F₂, F₃ e F₄, enquanto Jridi et al. (2014) constataram valores de transparência de $0,99 \pm 0,12$ para filmes à base de blenda G-Q (4:1) muito maiores que aqueles obtidos para o filme controle F₀ preparados com a blenda G-Q na mesma relação.

6.6.14 Atividade antimicrobiana

Na Figura 36a, observa-se uma zona clara sem crescimento de microrganismos somente embaixo dos filmes F₁, F₂ e F₃ após a sua remoção das placas inoculadas com *L. monocytogenes*. Neste caso, apenas as colônias em contato direto com os filmes ativos puderam ser inibidas. Em razão de a formação de halo de inibição ao redor dos filmes não ter sido evidente nas placas inoculadas com *L. monocytogenes*, pode-se inferir que houve uma limitada difusão dos agentes ativos no agar (PEREDA et al., 2011; PONCE et al., 2008) provavelmente pelo fato de que os agentes antimicrobianos estavam duplamente encapsulados, inicialmente nas nanogotas das emulsões e posteriormente na matriz do filme. Otoni et al. (2014), Seydim e Sarikus (2006) e Sung et al. (2014b) identificaram efeito antimicrobiano contra *L. monocytogenes* ao utilizar filmes à base de blendas de pectina/purê de mamão, proteína de soro de leite e polietileno de baixa densidade/acetato de etileno-vinil nanoemulsificados com cinamaldeído ou óleo essencial de alho, respectivamente.

Por outro lado, uma ligeira formação de halo em torno de todos os filmes foi observada para a *P. aeruginosa*, que revelou maior sensibilidade aos agentes ativos difundidos no agar, quando comparada com *L. monocytogenes* (Figura 36b). O efeito antimicrobiano dos filmes controle F₀ e F₄ contra a *P. aeruginosa* pode ter sido causado pela presença da quitosana na blenda, que tem sido referenciado como polissacarídeo antimicrobiano, pelo efeito dos grupos aminos carregados positivamente na sua estrutura, os quais interagem com as membranas

celulares carregadas negativamente dos microrganismos e levam ao vazamento de compostos proteicos e outros constituintes intracelulares (ELSABEE; ABDOL, 2013; PEREDA et al., 2011, PRANOTO; RAKSHIT; SALOKHE, 2005).

Figura 36 – Efeito de inibição dos filmes F₀, F₁, F₂, F₃ e F₄ contra A) *L. monocytogenes* ATCC 35152 e B) *P. aeruginosa* ATCC 15692 testado pelo método de difusão em disco

Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 32, está apresentada a atividade antimicrobiana dos filmes ativos à base da blenda G-Q frente à *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes*, de acordo com o diâmetro médio da zona de inibição medido nos halos ao redor dos discos dos filmes testados.

Tabela 32 – Atividade antimicrobiana* dos filmes ativos à base de Gelatina-Quitosana contra *P. aeruginosa* ATCC 15692 e *L. monocytogenes* ATCC 35152 baseada nos halos de inibição

Amostra	Bactéria	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>
F ₀	+	–
F ₁	+	–
F ₂	++	–
F ₃	++	–
F ₄	++	–

* Não atividade antimicrobiana (–), ligeira atividade antimicrobiana (+); Zona de inibição 2–3 mm, moderada atividade antimicrobiana (++); Zona de inibição 4–6 mm. F₀: filme sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α-tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α-tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α-tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F₄: filme com N₄ (sem agente ativo).

Fonte: Própria autoria.

Hafsa et al. (2016) e Kavooosi et al. (2014) também constataram efeito inibitório contra a *P. aeruginosa* quando testaram filmes à base de quitosana ou gelatina incorporados com óleo essencial de *Eucalyptus* ou *Zataria multiflora*, respectivamente. Segundo Paparella et al. (2008), a atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais se deve à sua interação com enzimas localizadas na parede celular ou à degradação dos fosfolipídios presentes na membrana celular, que resulta na permeabilidade da célula e, portanto, no vazamento do citoplasma.

6.6.15 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes foi expressa como equivalente trolox (μmol TE/g filme seco) frente aos radicais DPPH• e ABTS^{•+} ou ao reagente FRAP (Tabela 33). Como esperado, o filme F₀ não apresentou efeito antioxidante contra os radicais testados e o F₄ não apresentou efeito antioxidante contra os radicais DPPH• e ABTS^{•+}. Somente os filmes ativos F₁, F₂ e F₃ foram capazes de atuar como doadores de átomos de hidrogênio ou elétrons até se obter a redução das cores púrpura e azul dos radicais estáveis DPPH• e ABTS^{•+} à cor amarela da forma DPPH-H ou ABTS•, respectivamente (BOZIN et al., 2008), sendo F₁ o filme que apresentou a maior atividade antioxidante frente a esses radicais, com valores de $0,22 \pm 0,02$ e $2,63 \pm 0,12$ μmol TE/g, respectivamente. Essa atividade antioxidante está diretamente relacionada com o poder antioxidante que possuem os agentes ativos (Cin e α-t) incorporados nesse filme ativo, como discutido no item 6.1.2. A capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+} pelos filmes F₁, F₂ e F₃ foi comparável àquela relatada por Bonilla e Sobral (2016), para filmes à base de gelatina-quitosana com extratos de boldo ou guaraná.

Com relação ao reagente FRAP, o filme F₂ foi o que apresentou a maior capacidade de redução do íon férrico ($p < 0,05$), com uma redução de 91% quando comparado com F₀. Essa atividade antioxidante de F₁, F₂ e F₃ pode ser atribuída principalmente aos ácidos fenólicos e aos terpenóides provenientes do cinamaldeído, do óleo essencial de alho e, principalmente, do α -tocoferol, os quais são capazes de eliminar radicais livres pela formação de radicais de fenoxila estabilizados por ressonância (DUDONNÉ et al., 2009), ou também aos grupos amina residuais livres da molécula de quitosana, que reagem com os radicais livres formando radicais macromoleculares estáveis, e aos grupos de amônio, que também contribuem na atividade antioxidante dos filmes (YEN; YAN; MAU, 2008; YUAN; CHEN; LI, 2016).

Tabela 33 - Atividade antioxidante de filmes ativos à base de Gelatina-Quitossana expressa como equivalente Trolox

Amostra	ET ($\mu\text{mol ET/g}$ filme seco)		
	DPPH•	ABTS• ⁺	FRAP
F ₀	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^d	6,88 $\pm$ 0,38 ^e
F ₁	0,22 $\pm$ 0,02 ^a	2,63 $\pm$ 0,12 ^a	49,88 $\pm$ 1,21 ^c
F ₂	0,10 $\pm$ 0,00 ^b	2,58 $\pm$ 0,03 ^a	81,51 $\pm$ 2,21 ^a
F ₃	0,11 $\pm$ 0,00 ^b	2,33 $\pm$ 0,05 ^b	68,25 $\pm$ 2,85 ^b
F ₄	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	1,33 $\pm$ 0,00 ^c	39,82 $\pm$ 0,22 ^d

* Valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. F₀: filme sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). ET = Equivalente Trolox.

Fonte: Própria autoria.

6.7 Estudo de migração dos agentes ativos

6.7.1 Migração global em simuladores de alimentos

Na Tabela 34, são apresentados os valores de resíduo não volátil do material dos filmes após a evaporação dos simuladores A e D (item 2.4.2) no ensaio de migração global. Os resultados mostraram que, nesses dois simuladores, todos os filmes excederam o limite de migração global estabelecido pela legislação (5 mg/L ou 1 mg/dm² para A, ou 3 mg/dm² para D). Esse fenômeno pode estar associado à solubilidade dos filmes em ambas as soluções utilizadas, nas quais, além de migrarem os agentes ativos encapsulados, também migrou uma

quantidade considerável de gelatina que é considerada hidrofílica e altamente solúvel em água (KROCHTA, 2002).

Tabela 34 - Migração global dos componentes não voláteis derivados de filmes ativos à base de Gelatina-Quitossana em simuladores de alimentos

Amostra	A (Água destilada) (mg/dm ²)	D (Etanol 950mL/L) (mg/dm ²)
F ₀	129,5 ± 0,6	32,5 ± 0,3
F ₁	96,1 ± 0,4	28,2 ± 0,4
F ₂	123,7 ± 0,5	32,5 ± 0,3
F ₃	120,8 ± 3,9	21,7 ± 1,1
F ₄	131,5 ± 1,5	26,6 ± 0,7

* Valores da média ± desvio padrão (n=3). F₀: filme sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). A: simulador de alimento aquoso; D: simulador de alimento gorduroso. **Fonte:** Própria autoria.

6.7.2 Migração específica em simuladores de alimentos

Nos testes de migração específica, os agentes ativos dos filmes F₁, F₂ e F₃ migraram em níveis muito baixos nos simuladores A e D (Tabela 35). Porém, o α -tocoferol apresentou a maior migração em ambas as soluções.

O α -tocoferol e o cinamaldeído tiveram alta migração no simulador de alimento aquoso “A”, apesar de sua baixa solubilidade em água. Explicar por que esses dois componentes, de caráter lipofílico, migraram mais que o OEA não é simples, merecendo estudos mais detalhados. Entretanto, do ponto de vista tecnológico, um comportamento dessa natureza é interessante, pois esses filmes podem, em tese, serem aplicados em alimentos de alta umidade.

Conforme esperado, o óleo essencial de alho teve uma alta migração no simulador de alimento gorduroso “D”, por causa da solubilidade deste composto lipídico na solução apolar de etanol (95% v/v). De acordo com Ramos et al. (2014), uma maior ou menor migração observada em simuladores de alimentos pode ser atribuída a dois fatores principais: 1) alta afinidade dos compostos migrantes nos solventes utilizados e 2) fenômeno de inchaço da matriz polimérica quando os filmes entram em contato com os simuladores.

A massa inicial de cada agente ativo incorporado nos filmes foi utilizada para calcular as quantidades liberadas nos dois simuladores e as quantidades ainda retidas nos filmes após

alcançar o equilíbrio. Esses valores serviram para construir a cinética de migração, conforme discutido por Benbettaïeb, Chambin e Karbowiak (2016).

Tabela 35 - Migração específica e valores de coeficiente de partição ($K_{f,s}$) e partição (α) dos agentes ativos incorporados em filmes ativos à base de Gelatina-Quitossana

Amostra	Agente ativo	Migração		$K_{f,s}$		α	
		A (Água destilada) (mg/Kg)	D Etanol (950 mL/L) (mg/Kg)	A (g/g _f)	D (g/g _f)	A	D
F ₁	α -t	33,95 $\pm$ 0,05	26,25 $\pm$ 0,31	9,5	12,6	21,1	15,9
	Cin	11,78 $\pm$ 0,09	4,30 $\pm$ 0,03	105,1	289,8	1,9	0,7
F ₂	α -t	32,41 $\pm$ 0,64	27,50 $\pm$ 0,05	9,1	10,9	22,0	18,4
	OEA	12,08 $\pm$ 0,48	25,85 $\pm$ 0,01	91,1	42,0	2,2	4,8
F ₃	α -t	35,46 $\pm$ 0,09	29,84 $\pm$ 0,08	9,0	10,9	22,1	18,3
	Cin	5,39 $\pm$ 0,04	2,74 $\pm$ 0,16	107,9	213,1	1,9	0,9
	OEA	12,89 $\pm$ 0,09	14,99 $\pm$ 0,85	33,4	28,6	6,0	7,0

* Valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3). F₀: filme sem nanoemulsão; F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho); F₄: filme com N₄ (sem agente ativo). α -t: α -tocoferol; Cin: cinamaldeído; OEA: óleo essencial de alho. **Fonte:** Própria autoria.

Segundo Tehrany, Mouawad e Desobry (2007), a polaridade dos agentes migrantes e dos simuladores, o material da embalagem, assim como a solubilidade do migrante no simulador, determinam o coeficiente de partição ($K_{f,s}$). Neste estudo, o $K_{f,s}$ foi maior do que 1 em ambos os simuladores, para todos os agentes ativos (Tabela 35). Colín-Chávez et al. (2013) também descreveram altos valores de $K_{f,s}$ para filmes bicamada à base de polietileno de baixa/alta densidade ($K_{f,s}$ =18) e filmes monocamada de baixa densidade ($K_{f,s}$ =55) carregados com astaxantina, quando testados em simulador de alimento gorduroso. Conforme esses autores, um $K_{f,s} > 1$ indica que uma grande concentração do agente migrante permanece no polímero em relação àquela que migrou ao simulador, após alcançar o equilíbrio.

As cinéticas de liberação do α -t, Cin e OEA nos dois simulantes (A e D) apresentaram um comportamento *Fickiano* (Figura 37).

Figura 37 – Ajuste das cinéticas de liberação (linhas) dos agentes ativos α -t, Cin e OEA dos filmes. A) F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); B) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); C) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho). Sim. A: água destilada, Sim. D: etanol (95 % v/v)

Continua...

Figura 37 – Ajuste das cinéticas de liberação (linhas) dos agentes ativos α -t, Cin e OEA dos filmes. A) F₁: filme com N₁ (α -tocoferol/cinamaldeído); B) F₂: filme com N₂ (α -tocoferol/óleo essencial de alho); C) F₃: filme com N₃ (α -tocoferol/cinamaldeído/óleo essencial de alho). Sim. A: água destilada, Sim. D: etanol (95 % v/v)

Conclusão...

Fonte: Própria autoria.

As cinéticas de liberação dos agentes ativos incorporados em F₁ e F₂ foram utilizadas para a determinação dos coeficientes de difusão multicomponentes D_{11} , D_{12} , D_{21} , D_{22} dos agentes migrantes, considerando-os como sistemas ternários formados por dois agentes ativos mais uma base biopolimérica plastificada com glicerol. Além disso, foram consideradas as seguintes condições:

- 1) O filme foi considerado um sistema ternário constituído por gelatina-quitosana, Cin ou OEA e α -t;
- 2) Ausência de reação química;
- 3) Difusão unidimensional na direção da espessura;
- 4) Fluxo convectivo desprezível;
- 5) Peso molecular dos filmes igual ao peso molecular da gelatina (450 KDa).

As curvas da Figura 38 representam um bom ajuste dos dados experimentais à solução numérica da equação de Maxwell-Steffan utilizada para calcular os coeficientes de difusão multicomponente durante a liberação dos agentes ativos.

Figura 38 - Otimização do modelo de acordo com o perfil de liberação dos agentes ativos dos filmes F₁: A) α -tocoferol; B) Cinamaldeído e F₂: C) α -tocoferol; D) óleo essencial de alho

Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 36, são apresentados os coeficientes de difusão binária para o Cin ou o OEA (D_{11}) e o α -t (D_{22}), assim como os seus coeficientes de difusão cruzados (D_{12} e D_{21}) calculados das cinéticas nos dois simuladores de alimentos (A e D). Nessa tabela, pode-se observar que, para ambos os filmes (F₁ e F₂), a difusão dos agentes ativos foi de 10^{-15} m²/s e 10^{-14} m²/s no simulador de alimento aquoso “A” e de alimento gorduroso “D”, respectivamente. Essa maior difusão no simulador D pode ter sido impulsionada principalmente pela alta afinidade dos

agentes ativos lipofílicos no solvente etanol (950 mL/L) usado neste caso como simulador de alimento gorduroso.

Tabela 36 - Coeficientes de difusão principais e cruzados dos agentes ativos α -t e Cin liberados dos filmes ativos à base de Gelatina-Quitossana

Coeficientes*	Simulador A ($10^{15} \text{ m}^2/\text{s}$)	Simulador D ($10^{14} \text{ m}^2/\text{s}$)
Filme F1: α -tocoferol e Cinamaldeído		
D ₁₁	$1,4 \pm 0,0$	$3,4 \pm 0,0$
D ₁₂	$-5,2 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,0$
D ₂₁	$0,1 \pm 0,0$	$-0,03 \pm 0,0$
D ₂₂	$6,6 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,0$
Filme F2: α -tocoferol e óleo essencial de alho		
D ₁₁	$2,0 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,0$
D ₁₂	$-1,9 \pm 0,7$	$2,3 \pm 0,0$
D ₂₁	$0,2 \pm 0,0$	$-0,1 \pm 0,0$
D ₂₂	$4,1 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,0$

* D₁₁ e D₂₂: Coeficientes de difusão principais α -tocoferol e Cinamaldeído ou α -tocoferol e óleo essencial de alho, respectivamente. D₁₂ e D₂₁: Coeficientes de difusão cruzados.

Fonte: Própria autoria.

6.8 Aplicação do filme ativo na conservação de mortadela produzida com redução de aditivos

Como etapa final desta tese decidiu-se aplicar o filme ativo F₂ entre fatias de mortadela produzida com redução de conservantes e embaladas em bandeijas de poliestireno, com o objetivo de avaliar sua efetividade na conservação durante a estocagem a 6 °C por 7 dias. Para a escolha de F₂, foram levadas em consideração que a composição do filme (α -tocoferol e óleo essencial de alho) estava ligada à formulação da mortadela e que o filme F₂ apresentou baixa solubilidade em água e higroscopicidade, boas propriedades mecânicas e boas propriedades de barreira ao vapor de água e à radiação na região de luz ultravioleta, além de propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

6.8.1 Composição centesimal da mortadela

Os resultados da composição centesimal da mortadela, expressos em base úmida, foram os seguintes: 51,6 % de umidade, 13,7% de lipídios, 26,7% de proteína e 3 % de cinzas. Esses resultados correspondem àqueles limites estabelecidos na legislação brasileira para mortadela: máximo 65% de umidade, máximo 30% de lipídios e mínimo 12% de proteínas.

6.8.2 Aceitação sensorial

Os valores médios do atributo qualidade global, que representam o grau de aceitação sensorial das amostras de mortadela fatiada estocada a 6 °C por 7 dias, são apresentados na Tabela 37. Esses resultados estiveram diretamente relacionados com as respostas obtidas para os atributos sabor, aroma, textura e cor, também avaliados nas amostras.

Tabela 37 - Grau de aceitação da mortadela fatiada estocada a 6 °C medido através do atributo qualidade global

Tratamento	Atributo
	Qualidade global
T ₁	6,0 ± 1,5 ^b
T ₂	6,5 ± 1,4 ^a
T ₃	6,8 ± 1,2 ^a

* Valores da média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras. T₁: mortadela embalada com filme ativo F₂; T₂: mortadela embalada com filme controle F₀; T₃: mortadela embalada sem filme.

Fonte: Própria autoria.

As fatias de mortadela embaladas sem filme (T₃) foram aquelas de maior aceitação sensorial em termos de qualidade global ($p < 0,05$). Porém, nos três tratamentos, as respostas de todos os atributos se mantiveram entre os descritores 6 - “gostei ligeiramente” e 7 - “gostei moderadamente” da escala hedônica (Apêndice A) e, de um ponto de vista prático, estas respostas são ainda aceitáveis.

As amostras de T₁ e T₂ foram as menos aceitas no que diz respeito à cor e textura na avaliação dos consumidores (Figura 39). Por outro lado, o sabor e a qualidade global, foram os atributos com maior variação de aceitação entre tratamentos, sendo o T₃ o mais preferido pelos consumidores. Essa menor aceitação dos atributos sensoriais sabor e aroma para as amostras de T₁ pode estar associada ao forte gosto e odor gerado pelos compostos dissulfeto de dialilo,

trisulfeto de dialilo, dissulfeto de alil propilo e a uma pequena quantidade de polissulfeto dialílico, presentes no óleo essencial de alho que foi incorporado no filme ativo F₂ (SUNG et al., 2014a), os quais se supõe que foram liberados nas fatias em contato com o filme F₂ e implicou na reduzida aceitação desses atributos por parte dos provadores.

Figura 39 - Atributos sensoriais analisados no teste de aceitação de mortadela fatiada embalada com T₁ (filme ativo), T₂ (filme controle) e T₃ (sem filme) estocada a 6 °C por 7 dias

Fonte: Própria autoria.

Embora T₁ tenha sido o tratamento menos preferido como sistema de embalagem para mortadela fatiada, são necessários mais estudos para elucidar se os filmes carregados com o α -tocoferol e o óleo essencial de alho nanoemulsificados (F₂) usados neste tratamento são efetivos para conservar ou prolongar a vida útil da mortadela fatiada estocada a 6 °C por 7 dias do ponto de vista fisicoquímico e microbiológico.

6.9 Estudo de vida útil da mortadela fatiada estocada a 6 °C por 7 dias

6.9.1 Análises físico-químicas

6.9.1.1 Cor

Na mortadela, a cor é o principal atributo que interfere na aceitação dos consumidores. Geralmente, uma tonalidade de cor rosa e um brilho particular são esperados neste tipo de

produto cárneo (GARCÍA; CÁCERES; SELGAS, 2007; VIUDA-MARTOS et al., 2011). Esta afirmação pode ser confirmada pela aceitação sensorial do atributo cor na escala hedônica (Figura 39). O tempo de armazenamento não teve efeito ($p>0,05$) na luminosidade (L^*) das fatias de mortadela nos três tratamentos, porém, as amostras de T₁ e T₂ apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) no que diz respeito à L^* quando comparadas com aquelas de T₃ (Tabela 38). Os filmes usados nos tratamentos T₁ e T₂ ofereceram efeito protetor às amostras contra o oxigênio, fato que pode explicar a falta de diferenças nos valores de L^* entre essas amostras (FERNÁNDEZ-GINÉS et al., 2003).

Tabela 38 - Parâmetros físicoquímicos monitorados durante 7 dias no estudo de vida útil da mortadela fatiada estocada a 6 °C

Parâmetro	Tratamento	Tempo (dias)			
		1	3	5	7
L^*	T ₁	52,1 ± 1,7 ^{aB}	51,9 ± 1,9 ^{aB}	51,6 ± 1,7 ^{aB}	52,1 ± 2,1 ^{aB}
	T ₂	51,8 ± 2,0 ^{aB}	52,5 ± 1,5 ^{aB}	51,1 ± 2,7 ^{aB}	51,6 ± 2,0 ^{aB}
	T ₃	55,8 ± 2,0 ^{aA}	56,5 ± 2,2 ^{aA}	55,8 ± 2,3 ^{aA}	55,9 ± 2,7 ^{aA}
a^*	T ₁	16,1 ± 0,8 ^{aB}	14,5 ± 1,9 ^{bA}	13,3 ± 1,7 ^{bB}	10,6 ± 2,2 ^{cB}
	T ₂	17,1 ± 1,3 ^{aA}	14,7 ± 1,3 ^{bcA}	15,3 ± 1,4 ^{bA}	14,1 ± 1,9 ^{cA}
	T ₃	15,0 ± 0,9 ^{aC}	14,9 ± 0,8 ^{aA}	14,3 ± 1,1 ^{aB}	13,3 ± 2,0 ^{bA}
b^*	T ₁	13,7 ± 0,7 ^{cB}	14,6 ± 0,9 ^{bA}	15,0 ± 0,9 ^{abB}	15,6 ± 1,6 ^{aA}
	T ₂	14,3 ± 0,8 ^{bA}	15,0 ± 1,1 ^{abA}	15,7 ± 1,3 ^{aA}	15,3 ± 1,0 ^{aA}
	T ₃	13,2 ± 0,6 ^{bB}	13,7 ± 0,4 ^{abB}	14,0 ± 0,6 ^{aC}	14,2 ± 1,3 ^{aB}
pH	T ₁	6,6 ± 0,1 ^{aA}	6,6 ± 0,1 ^{aA}	6,6 ± 0,1 ^{aA}	6,6 ± 0,1 ^{aA}
	T ₂	6,6 ± 0,1 ^{aA}	6,6 ± 0,0 ^{aA}	6,6 ± 0,1 ^{aA}	6,7 ± 0,1 ^{aA}
	T ₃	6,4 ± 0,0 ^{aB}	6,3 ± 0,0 ^{aB}	6,3 ± 0,1 ^{aB}	6,4 ± 0,1 ^{aB}
Aa	T ₁	0,96 ± 0,0 ^{aB}	0,96 ± 0,0 ^{aB}	0,96 ± 0,0 ^{aB}	0,96 ± 0,0 ^{aB}
	T ₂	0,96 ± 0,0 ^{aB}	0,96 ± 0,0 ^{aB}	0,96 ± 0,0 ^{aB}	0,96 ± 0,0 ^{AB}
	T ₃	0,97 ± 0,0 ^{aA}	0,97 ± 0,0 ^{aA}	0,97 ± 0,0 ^{aA}	0,97 ± 0,0 ^{aA}
TBARs (mg MAD/kg amostra)	T ₁	0,1 ± 0,0 ^{dB}	0,3 ± 0,0 ^{cB}	0,8 ± 0,1 ^{bC}	1,8 ± 0,3 ^{aC}
	T ₂	0,1 ± 0,0 ^{dB}	0,3 ± 0,1 ^{cB}	1,1 ± 0,1 ^{bB}	2,0 ± 0,3 ^{aB}
	T ₃	0,2 ± 0,0 ^{dA}	0,6 ± 0,1 ^{cA}	1,2 ± 0,2 ^{bA}	2,1 ± 0,2 ^{aA}

* Valores da média ± desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre amostras e letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre tratamentos. T₁: mortadela embalada com filme ativo F₂; T₂: mortadela embalada com filme controle F₀; T₃: mortadela embalada sem filme.

Fonte: Própria autoria.

Os valores de a^* variaram significativamente ($p < 0,05$) entre tratamentos e dias de amostragem (Tabela 38). As amostras de T_1 foram as que apresentaram maior variação da cor vermelha ao final do estudo de vida útil quando comparadas com as amostras do restante de tratamentos, provavelmente, pela ligeira desidratação que apresentou a amostra em contato com o filme ativo, que implicou em uma medida de cor menos avermelhada na mortadela após 7 dias do armazenamento. Segundo Fernández-López et al. (2005), esse parâmetro pode ser também afetado pela integridade estrutural do alimento, assim como pelo conteúdo e disposição dos pigmentos hidro ou lipossolúveis e pela disponibilidade de água na superfície da mortadela.

Os valores de b^* variaram significativamente ($p < 0,05$) entre tratamentos e dias de amostragem. Neste parâmetro, as amostras de todos os tratamentos apresentaram um incremento progressivo da amarelagem durante o armazenamento. As amostras de T_1 também foram as que apresentaram maior variação da cor amarela ao final do armazenamento quando comparadas com aquelas de T_2 e T_3 . Esse comportamento pode ter sido provocado pela pigmentação amarela dos agentes ativos lipofílicos (OEA e α -t) encapsulados nos filmes ativos, que de certa forma implicaram na cor da superfície da fatia de mortadela quando estes migraram à amostra.

6.9.1.2 pH

Não se observou uma variação de pH ($p > 0,05$) para os três tratamentos ao longo do armazenamento. Porém, houve diferença significativa ($p < 0,05$) no pH das amostras de T_1 e T_2 quando comparadas com aquelas de T_3 (Tabela 38). Esse menor valor de pH na mortadela embalada sem filme pode estar relacionado com o incremento da acidez, provavelmente pela presença de bactérias ácido lácticas (BAL) nas amostras, conforme será discutido na seção **6.9.2**. Dykes, Cloete e Von Holy (1991) e Viuda-Martos et al. (2011) identificaram uma redução do pH de produtos cárneos durante o armazenamento decorrente da ação de bactérias ácido lácticas (BAL). Vale a pena ressaltar que os valores de pH das amostras de T_1 permaneceram invariáveis ao longo do armazenamento, provavelmente pelo efeito inibitório do filme ativo F_2 contra as BAL. Resultados similares foram constatados por Correa et al. (2017), que também relataram valores de pH invariáveis no tempo para presunto cozido embalado com filmes de polihidroxibutirato/policaprolactona ativados com nisina.

6.9.1.3 Atividade de água (Aa)

Apesar de não ter havido variações nas medidas de Aa ($p>0,05$) nos três tratamentos ao longo do armazenamento, os valores de Aa das amostras embaladas com os filmes ativo e controle foram ligeiramente menores ($p<0,05$) que os valores daquelas embaladas sem filme (Tabela 38). A ligeira desidratação e, conseqüentemente, a redução de Aa das amostras de mortadela fatiada estocada a 6 °C durante 7 dias pode ter ocorrido pela alta capacidade de hidratação e inchaço que apresentam os filmes F₂ e F₀ à base de gelatina-quitosana utilizados nos tratamentos T₁ e T₂, respectivamente, conforme discutido em 6.6.7.

6.9.1.4 Oxidação de lipídios

A oxidação lipídica foi significativamente afetada ($p<0,05$) tanto pelo tempo de armazenamento quanto pelos tratamentos (Tabela 38). Pode-se observar que houve um incremento progressivo nos valores de TBARs das amostras ao longo do armazenamento, variando entre 0,1 e 2,0 mg de MAD/kg amostra para os três tratamentos. Contudo, vale a pena ressaltar que os filmes ativos utilizados em T₁ ajudaram a manter os valores de TBARs da mortadela abaixo de 1,0 mg de MAD/kg amostra até o dia 5 de armazenamento, sendo esse valor o considerado como limite aceitável para detectar a rancidez de um produto cárneo, do ponto de vista sensorial (AMARAL et al., 2015; DAS et al., 2008). Portanto, pode-se inferir que o filme ativo atuou como protetor da mortadela, reduzindo a oxidação lipídica e extendendo a sua vida útil até o dia 5 de armazenamento, por causa principalmente dos agentes ativos (α -t e OEA) nanoencapsulados na matriz polimérica, os quais migraram para o interior das fatias ao entrar em contato com elas (CONTINI et al., 2014).

Por outro lado, conforme esperado, as amostras de T₃ apresentaram valores de oxidação significativamente maiores ($p<0,05$) entre tratamentos durante todo o armazenamento. Um comportamento similar foi relatado por Contini et al. (2014), Moradi et al. (2011) e Viuda-Martos et al. (2011), que também observaram um incremento acelerado e significativamente maior ($p<0,05$) nos valores de TBARs durante o armazenamento para amostras de produtos cárneos embaladas sem revestimento ou filmes.

Os níveis de TBARs obtidos ao final do experimento para os três tratamentos (2,0 mg MDA/kg de amostra) estiveram muito abaixo àqueles descritos por Viuda-Martos et al. (2011) e Moradi et al. (2011) para mortadela preparada com óleos essenciais de tomilho e alecrim (5,4 mg MDA/kg de amostra) e mortadela embalada com filmes à base de quitosana incorporados

com óleo essencial de *Zataria multiflora* (2,8 – 3,8 mg MDA/kg de amostra), respectivamente, durante 6 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

6.9.2 Análise microbiológica

Na Figura 40, estão apresentadas as contagens do crescimento microbiano nas amostras de mortadela durante o estudo de vida útil. Vale a pena esclarecer que as Figuras 40a,b representam somente as contagens dos tratamentos T₁, T₂ e T₄ que foram inicialmente inoculados com *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*. O T₃ não foi graficado em função do tempo de estocagem, em razão de que não apresentou crescimento dessas bactérias durante o estudo de vida útil. Por outro lado, as Figuras 40c-f, representam o crescimento dos microrganismos deteriorantes avaliados nos três tratamentos T₁, T₂ e T₃ utilizados para o estudo de vida útil.

A efetividade antimicrobiana do filme ativo contra as bactérias *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* inoculadas nas fatias de mortadela estocada a 6 °C foi demonstrada pela redução significativa da população (log UFC/g) de bactérias durante o armazenamento. Contudo, o filme controle usado em T₂ também apresentou efeito inibitório frente a ambas bactérias inicialmente inoculadas nas amostras, porém, em menor grau que os filmes ativos usados em T₁ (Figura 40).

Na Figura 40a, pode-se observar que T₁ provocou uma redução significativa ($p < 0,05$) de 1 ciclo logarítmico de *L. monocytogenes*, com relação à quantidade inicialmente inoculada. Por outro lado, o tratamento controle T₄ manteve a mesma contagem da população de *L. monocytogenes* durante o armazenamento. No tratamento T₃, conforme esperado, não houve crescimento desta bactéria, portanto, considera-se como ausência em 25 g de amostra, conforme expresso na legislação. De acordo com esses resultados, pode-se inferir que o efeito antimicrobiano dos filmes ativos utilizados em T₁ se deve principalmente à difusão do agente OEA incorporado na matriz G–Q, que permitiu a redução de células inicialmente inoculadas nas fatias de mortadela (COMA, 2008). Marcos et al. (2007) e Soares et al. (2007) também apuraram uma redução da população de *L. monocytogenes* previamente inoculada em fatias de presunto cozido e mortadela embaladas com filmes ativos à base de diferentes biopolímeros contendo enterocinas e pediocinas, respectivamente. Esses autores verificaram que os filmes ativos mostraram uma maior eficiência antimicrobiana ao reduzirem vários ciclos logarítmicos na contagem de células após o armazenamento.

Na Figura 40b, pode-se observar que o crescimento de *P. aeruginosa* também foi significativamente reduzido ($p < 0,05$) pela ação do filme ativo usado em T₁. A *P. aeruginosa* revelou-se mais sensível do que a *L. monocytogenes*, sendo reduzida em mais de 2 ciclos

logarítmicos pelo filme ativo, quando comparada com a concentração inicialmente inoculada (7 log UFC/g). Por outro lado, o tratamento T₄ manteve a mesma contagem de *P. aeruginosa* até o final do armazenamento, ao passo que, no tratamento T₃, conforme esperado, não houve crescimento desta bactéria na amostra durante o armazenamento.

A ausência de *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* nas amostras do tratamento T₃, consideradas como controle negativo por não serem inicialmente inoculadas, indicou a aplicação de boas práticas de fabricação durante e após o processamento (fatiado e embalado), assim como um tratamento térmico eficaz da mortadela (MARCOS et al., 2007). Os resultados obtidos para estas duas bactérias podem ser considerados importantes tendo em conta que a contagem desses microrganismos, em caso de existirem no produto, nunca superaria 10¹ UFC/g e esse foi o nível mínimo de inibição obtido com o filme ativo para essas bactérias.

Com relação ao efeito protetor do filme ativo frente às bactérias deteriorantes da mortadela, pode-se observar que ambos os filmes usados em T₁ e T₂ se mostraram eficientes contra o crescimento de coliformes totais nas fatias de mortadela. No entanto, esse efeito inibitório foi mais favorável ($p < 0,05$) nas amostras embaladas com T₁, quando comparadas com aquelas de T₂ e T₃. Na Figura 40c, pode-se observar que as amostras sem proteção de filme (T₃) apresentaram as maiores contagens ($p < 0,05$) de coliformes totais entre os três tratamentos.

Os microrganismos mesófilos e psicotróficos aeróbicos apresentaram uma população bastante reduzida no tratamento T₁ em todos os tempos de amostragem (Figura 40d,e). Para T₁, registrou-se uma redução de entre 2 e 3 ciclos logarítmicos dessas bactérias, quando comparadas com T₃ ($p < 0,05$). As populações de ambos os microrganismos aumentaram ligeiramente durante o armazenamento, contudo, os agentes ativos liberados do filme usado em T₁ influenciaram na redução da taxa de crescimento desses microrganismos, conforme relatado por Moradi et al. (2011). Vale a pena ressaltar que o filme ativo atuou eficientemente contra a proliferação desses microrganismos que geralmente estão presentes em produtos cárneos e que são os responsáveis pela deterioração desses produtos durante o armazenamento.

As bactérias ácido lácticas (BAL) foram as mais sensíveis ao efeito do filme ativo usado em T₁, uma vez que não se detectou crescimento delas nas amostras embaladas com esse tratamento. Na Figura 40f, pode-se observar que o crescimento de BAL nas amostras de T₂ e T₃ esteve entre 1 e 4 log UFC/g ao longo do armazenamento. No entanto, apesar dessa contagem de células, pode-se inferir que as BAL não atingiram o limite de deterioração definido para produtos cárneos cozidos durante o armazenamento (6 - 7 Log UFC/g) (CORREA et al., 2017; POTHAKOS; SAMAPUNDO; DEVLIEGHERE, 2012).

Figura 40 - Contagem de bactérias A) *L. monocytogenes*; B) *P. aeruginosa*; C) coliformes totais; D) mesófilos aeróbicos; E) psicotróficos aeróbicos; F) bactérias ácido lácticas durante o estudo de vida útil de mortadela embalada com T₁ (filme ativo), T₂ (filme controle), T₃ (sem filme) e T₄ (inoculada sem filme) estocada a 6 °C durante 7 dias

Fonte: Própria autoria.

7 CONCLUSÕES

A pressão e número de ciclos na homogeneização, assim como a temperatura de evaporação, desempenham um papel importante no preparo das nanoemulsões quando se emprega o método de emulsificação-evaporação. Neste estudo, um modelo polinomial de segunda ordem foi suficiente e efetivamente aplicado para prever e descrever as respostas: diâmetro médio de gotas, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão quando se variaram as condições de processamento dentro da faixa experimental estudada.

Os valores ótimos para as respostas previstos pelo modelo concordaram fortemente com aqueles obtidos na validação experimental. A aplicação das condições ótimas de processo mostrou-se eficiente em nanoemulsões com máxima capacidade de encapsulação dos agentes ativos, tamanho de gota na escala nanométrica (< 100 nm), distribuição de tamanho de gotas monomodal, alta estabilidade física durante o armazenamento, independentemente do tempo e a temperatura de estocagem, e efeito positivo sobre suas atividades antimicrobianas e antioxidantes, por causa principalmente da capacidade antioxidante e/ou antimicrobiana que apresentam, de maneira individual, o α -tocoferol, o cinamaldeído e o óleo essencial de alho.

Os filmes à base de gelatina-quitosana (G-Ch) incorporados com as nanoemulsões O/A preparadas nas condições ótimas, apresentaram uma estrutura homogênea, com boa distribuição dos agentes ativos nanoencapsulados em toda a matriz biopolimérica e sem qualquer efeito desfavorável ($p > 0,05$) na espessura, umidade, permeabilidade ao vapor de água, transição vítrea e/ou temperatura de fusão.

A incorporação das nanoemulsões implicou na melhora de propriedades físicas, mecânicas, antimicrobianas e antioxidantes dos filmes, tendo em conta que reduziu a sua solubilidade em água ($p < 0,05$), aumentou as propriedades de barreira à luz, assim como de deformação no momento da ruptura ou perfuração, tornou o filme efetivo contra as bactérias *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* e aumentou a capacidade dos filmes de eliminar radicais livres. Porém, as nanoemulsões também afetaram as características de brilho, cor e transparência dos filmes, reduziram a resistência à tração e rigidez, aumentaram a rugosidade da superfície e, portanto, a hidrofiliabilidade dos filmes.

A umidade de equilíbrio dos filmes foi influenciada pela incorporação da nanoemulsão. Por outro lado, todos os modelos (BET, GAB, Peleg e Oswin) foram ajustados satisfatoriamente aos dados experimentais das isoterma de absorção de vapor de água. Essa informação é de interesse às propriedades de barreira ao vapor de água e mecânicas e, consequentemente, à aplicação específica dos filmes.

Em ambos os simuladores de alimento (aquoso e gorduroso) testados, todos os filmes excederam o limite de migração global de compostos voláteis e não voláteis considerado na legislação para aditivos não intencionais. Na migração específica dos agentes ativos, pode-se obter os coeficientes de partição (K) e de difusão multicomponentes (D_{11} , D_{12} , D_{21} , D_{22}) das moléculas, assim como a cinética de liberação para cada simulador.

Filmes ativos (antimicrobiano/antioxidante) à base de G–Q podem ser desenvolvidos incorporando neles α -t e OEA nanoemulsificados, para aplicar na embalagem de mortadela fatiada refrigerada, visando melhorar a segurança e vida útil desse produto, retardando as reações de oxidação lipídica até o dia 5 de armazenamento e reduzindo o crescimento de certos microrganismos patogênicos e deteriorantes.

Em razão da interação deliberada entre o filme e a mortadela, pode-se inferir que os filmes à base de blenda G–Q têm potencial de aplicação como embalagens ativas para estender a vida útil dos alimentos quando incorporados com agentes ativos nanoemulsificados.

8 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Fazer estudos de biodegradabilidade destes filmes ativos à base de blenda G–Q;
- Realizar análises de microscopia confocal de varredura laser (MCVL) nos filmes para confirmar uma dispersão homogênea das nanogotas de óleo na matriz polimérica.
- Estudar a permeabilidade ao oxigênio destes filmes;
- Reforçar as análises de caracterização e simular a digestibilidade gastrointestinal para demonstrar que estes filmes podem ser considerados embalagens comestíveis ao se utilizar compostos GRAS na sua preparação;
- Produzir e aplicar filmes à base de blenda G–Q com outros agentes ativos lipofílicos nanoemulsificados que não impliquem negativamente na aceitação sensorial do produto alimentício em contato com estes.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, London, v. 111, n. 2, p. 343-350, 2012.
- ACEVEDO-FANI, A. et al. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 47, p. 168-177, 2015.
- ADILAH, Z. A. M.; HANANI, Z. A. N. Active packaging of fish gelatin films with Morinda citrifolia oil. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 16, p. 66-71, Mar. 2016.
- AHMAD, M. et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 189-199, 2012.
- AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Amsterdam, v. 163, p. 115-124, 2016.
- AHVENAINEN, R. Active and intelligent packaging: An introduction. In: AHVENAINEN, R. **Novel food packaging techniques**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. p. 5-2.
- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 6, p. 837-842, 2010.
- ALBOOFETILEH, M. et al. Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. **Food Control**, Oxford, v. 36, p. 1-7, Feb. 2014.
- ALEXANDRE, E. M. C. et al. Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 10, p. 87-96, 2016.
- AMALARADJOU, M. A. R. et al. Enhancing the thermal destruction of Escherichia coli O157: H7 in ground beef patties by trans-cinnamaldehyde. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 6, p. 841-844, 2010.
- AMARAL, D. S. et al. Effect of storage time and packaging on the quality of lamb pâté prepared with “variety meat”. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 3, p. 39-46, 2015.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. **ASTM D2244-16**, Standard test method for calculation of color differences from instrumentally measured color coordinates. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2016.
- _____. **ASTM D882-12**, Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2012.

_____. **ASTM E96/E96 M-05**, Standard test methods for water vapor transmission of materials. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2005.

_____. **ASTM D2457-03**, Standard test method for specular gloss of plastic films and solid plastics. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2003.

AMSELEN, S.; FRIEDMAN, D. Submicron emulsions as drug carriers for Topical administration. **Drug targeting and delivery**, New York, p. 53-173, 1998.

ANARJAN, N. et al. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 123, n. 2, p. 477-483, Nov. 2010.

ANARJAN, N. et al. Effect of processing conditions on physicochemical properties of sodium caseinate-stabilized astaxanthin nanodispersions. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 7, p. 1658-1665, 2011.

ANDRADE, R. et al. Wettability of gelatin coating formulations containing cellulose nanofibers on banana and eggplant epicarps. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 58, p. 158-165, 2014.

ANDREUCCETTI, C. et al. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. **Journal of Food Engineering**, London, v. 103, p. 129-136, 2011.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **AOAC Official method of analysis 920.153**, ash of meat. 1996.

_____. **AOAC Official method of analysis 991.36**, Fat (crude) in meat and meat products, solvent extraction (submersion) method. 1996.

_____. **AOAC Official method of analysis 950.46**, moisture in meat. 1991.

_____. **AOAC Official method of analysis 989.10**, petrifilm aerobic count plate and petrifilm coliform count plate) methods. 1991.

_____. **AOAC Official method of analysis 981.10**, crude protein in meat. 1983.

_____. **AOAC Official method of analysis 981.12**, pH of acidified foods. 1982.

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

ARANCIBIA, M. et al. Release of cinnamon essential oil from polysaccharide bilayer films and its use for microbial growth inhibition in chilled shrimps. **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 59, n. 2, p. 989-995, 2014.

- ARFA, A. et al. Antimicrobial paper based on a soy protein isolate or modified starch coating including carvacrol and cinnamaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 22-32, 2007.
- ARFAT, Y. A. et al. Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 41, p. 265-273, 2014.
- ARTHUR, E. et al. Evaluation of theoretical and empirical water vapor sorption isotherm models for soils. **Water Resources Research**, New Jersey, v. 52, p. 190-205, 2016.
- ARTIGA-ARTIGAS, M. et al. Effect of sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 70, p. 191-200, 2017.
- ARVANITOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. I. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 37, p. 371-382, 1998.
- ARVANITOYANNIS, I. S. Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. In: GENNADIOS, A. **Protein-based films and coatings**. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, Inc., 2002. p. 275-304.
- ATARÉS, L. et al. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, London, v. 99, n. 3, p. 384-391, Aug. 2010.
- ATARÉS, L.; BONILLA, J.; CHIRALT, A. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, London, v. 100, n. 4, p. 678-687, Oct. 2010.
- ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 48, p. 51-62, 2016.
- AVENA-BUSTILLOS, R. J. et al. Gelation, oxygen permeability, and mechanical properties of mammalian and fish gelatin films. **Journal of Food Science**, New Jersey, v. 76, n. 7, p. 519-524, 2011.
- AYALA-VALENCIA, G. **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.
- BADHE, R. V. et al. A composite chitosan-gelatin bi-layered, biomimetic macroporous scaffold for blood vessel tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 157, p. 1215-1225, 2017.
- BAI, L.; MCCLEMENTS, D. J. Development of microfluidization methods for efficient production of concentrated nanoemulsions: Comparison of single- and dual-channel microfluidizers. **Journal of Colloid and Interface Science**, Missouri, v. 466, p. 206-212, 2016.

- BAKER, B. P.; GRANT, J. A. **Garlic and garlic oil profile**: active ingredient eligible for minimum risk pesticide use. New York, 2017. 19 p. (Integrated Pest Management Program).
- BALAGUER, P. M.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ, P. M. Food aroma mass transport properties in renewable hydrophilic polymers. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 130, n. 4, p. 814-820, 2012.
- BART, J. C. Quality of food contact polymers. In: BART, J. C. **Polymer additive analytics**: industrial practice and case studies. Firenze: University Press, 2006. 378 p.
- BATTISTI, R. et al. Gelatin-coated paper with antimicrobial and antioxidant effect for beef packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 11, p. 115-124, 2017.
- BENBETTAÏEB, N. et al. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin-chitosan blend films related to biopolymer interactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 94, n. 12, p. 2409-2419, 2014.
- BENBETTAÏEB, N. et al. Release behavior of quercetin from chitosan-fish gelatin edible films influenced by electron beam irradiation. **Food Control**, Oxford, v. 66, p. 315-319, 2016.
- BENBETTAÏEB, N. et al. Impact of functional properties and release kinetics on antioxidant activity of biopolymer active films and coatings. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 242, p. 369-377, Apr. 2018.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 37, n. 2, p. 263-268, Mar. 2004.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 239, n. 1, p. 70-6, July. 1996.
- BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 21, p. 1285-1289, 2007.
- BITENCOURT, C. M. et al. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 40, p. 145-152, 2014.
- BODINI, R. B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 51, p. 104-110, 2013.
- BONCUORE, G. G.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. Use of a mathematical model to describe the barrier properties of edible films. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 70, n. 2, p. 142-147, 2005.
- BONILLA, J. et al. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films, **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 26, p. 9-16. 2012.
- BONILLA, J. et al. Effect of chitosan essential oil films on the storage-keeping quality of pork meat products. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 7, n. 8, p. 2443-2450, 2014.

- 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**, Amsterdam, v. 16, p. 17-25, 2016.
- BOZIN, B. et al. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., *Alliaceae*). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 111, p. 925-929, 2008.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, Jan. 1995.
- BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 60, p. 309-319, 1938.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CAMO, J.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. **Meat science**, Amsterdam, v. 80, n. 4, p. 1086-1091, 2008.
- CASELLA, S. et al. The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the in vitro antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L., and leek, *Allium porrum* L. **Phytotherapy research: PTR**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 380383, 2013.
- CHEN, E. et al. Enhancement of physicochemical properties of whey protein-stabilized nanoemulsions by interfacial cross-linking using cinnamaldehyde. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 77, p. 976-985, 2017.
- CHEN, H. et al. Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 61, p. 662-671, 2016.
- CHEN, L. J.; WANG, M. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 23, n. 13, p. 2631-2639, 2002.
- CHENG, S. S. et al. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 11, p. 5145-5149, 2008.
- CHEONG, J. N. et al. α -Tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering**, London, v. 89, n. 2, p. 204-209, Nov., 2008.
- CHEONG, A.; TAN, C. P.; NYAM, K. L. Physicochemical, oxidative and anti-oxidant stabilities of kenaf seedoil-in-water nanoemulsions under different storage temperatures. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 95, p. 374-382, 2017.

CHIU, H. T. et al. Using analytical centrifugation to characterize the dispersibility and particle size distributions of organic/inorganic composite coatings. **Journal of Polymer Research**, Dordrecht, v. 18, n. 6, p. 1587-1596, 2011.

CHIU, Y. C.; YANG, W. L. Preparation of vitamin E microemulsion possessing high resistance to oxidation in air. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v. 63, p. 311-322, 1992.

CHOI, Y. R. et al. Efficient preparation of a permanent chitosan/gelatin hydrogel using an acid-tolerant tyrosinase. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 129, p. 50-56, 2018.

CHU, B. S. et al. Preparation and characterization of β -carotene nanodispersions prepared by solvent displacement technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 16, p. 6754-6760, 2007.

CLARKE, D. et al. Incorporation of commercially-derived antimicrobials into gelatin-based films and assessment of their antimicrobial activity and impact on physical film properties. **Food Control**, Oxford, v. 64, p. 202-211, 2016.

COLÍN-CHÁVEZ, C. et al. Diffusion of natural astaxanthin from polyethylene active packaging films into a fatty food simulant. **Food Research International**, Oxford, v. 54, p. 873-880, 2013.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat science**, Amsterdam, v. 78, n. 1-2, p. 90-103, Jan. 2008.

CONTINI, C. et al. Effect of an active packaging with citrus extract on lipid oxidation and sensory quality of cooked turkey meat. **Meat science**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 1171-1176, 2014.

COOKSEY, K. Antimicrobial food packaging materials. **Additives for Polymers**, Kidlington, v. 8, p. 6-10, 2001.

CORREA, J. P. et al. Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 11, p. 31-39, 2017.

CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. Biological properties of onions and garlic. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 609-625, 2007.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Council Directive 82/711/EEC of 18 October 1982 laying down the basic rules necessary for testing migration of the constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Community*, L. 297, p. 26-30, 1982.

_____. Council Directive of 19 December 1985 laying down the list of simulants to be used for testing migration of constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs (85/572/EEC). **Official Journal of the European Community**, L. 372, p. 14-21, 1985.

- COZMUTA, A. M. et al. Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 49, p. 144-155, 2015.
- CRAN, M. J. et al. Release of naturally derived antimicrobial agents from LDPE films. **Journal of Food Science**, New Jersey, v. 75, n. 2, p. 126-133, Mar. 2010.
- CUSSLER, E. L. **Diffusion mass transfer in fluid systems**. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2009. p. 221-231.
- DAINELLI, D. et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 19, p. S103-S112, 2008.
- DAMMAK, I. et al. Properties of active gelatin films loaded with rutin-loaded nanoemulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 98, p. 39-49, 2017a.
- DAMMAK, I. et al. Properties of gelatin-based films incorporated with chitosan-coated microparticles charged with rutin. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 101, p. 643-652, 2017b.
- DAMMAK, I.; SOBRAL, P. J. Formulation and stability characterization of rutin-loaded oil-in-water emulsions. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 10, n. 5, p. 926-939, 2017.
- DAS, A. K. et al. Effect of full-fat soy paste and textured soy granules on quality and shelf-life of goat meat nuggets in frozen storage. **Meat science**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 607-614, 2008.
- DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Nutraceutical delivery systems : Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 167, p. 205-212, 2015.
- DE AZEREDO, H. M. C. Antimicrobial nanostructures in food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 56-69, Mar. 2013.
- DE CARVALHO; R. A.; GROSSO, C. R. F. Properties of chemically modified gelatin films. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 23, p. 45-53, Jan.- Mar. 2006
- DECAGON DEVICES Inc. **AquaLab VSA operator's manual**. Pullman, WA, USA, 2016. Disponível em: <http://library.metergroup.com/Manuals/13832_AquaLab%20VSA_Web>. Acesso em: 13 dez. 2017.
- DIAS, D. D. O. et al. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 59, p. 154-162, 2014.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 17, p. 25-39, 2003.
- DOMIAN, E. et al. Rheological properties and physical stability of o/w emulsions stabilized by OSA starch with trehalose. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 44, p. 49-58, 2014.

DONSÌ, F. et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, Bucks, v. 159, n. 4, p. 342-350, 2012.

DUDONNÉ, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, Mar. 2009.

DUŠKOVÁ, M. et al. Lactic acid bacteria in cooked hams - sources of contamination and chances of survival in the product. **Food Control**, Oxford, v. 61, p. 1-5, 2016.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, 2009.

DYBOWSKA, B. E. The effects of temperature and pressure on flow characteristics of whey protein-stabilized O/W emulsions. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 55, p. 194-197, 2000

DYKES, G. A.; CLOETE, T. E.; VON HOLY, A. Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked Vienna sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 239-248, 1991.

ECHEGOYEN, Y.; NERÍN, C. Performance of an active paper based on cinnamon essential oil in mushrooms quality. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 170, p. 30-36, 2015.

EL-AASSER, M.; SUDOL, E. Miniemulsions: overview of research and applications. **Coatings Technology and Research**, New York, v. 1, p. 20-31, New York, 2004.

EL-BAROTY, G. S. et al. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. **African Journal of Biochemistry Research**, Victoria Island, v. 4, n. 6, p. 167-174, Jun. 2010.

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

EUROPEAN STANDARD. **EN 13130-1**- Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics, part 1. Test methods for specific migration into food simulants by total immersion. 2005.

_____. **EN 1186-1**- Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics, part 1. Guide to the selection of conditions and test methods for overall migration. 2002.

_____. **EN 1186-3** - Test methods for overall migration into aqueous food simulants by total immersion. 2002.

EZHILARASI, P. N. et al. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, n. 3, p. 628-647, 12, Aug. 2012.

FABRA, M. J. et al. Effect of ferulic acid and α -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, n. 6, p. 1441-1447, Aug. 2011.

FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Water sorption isotherms and phase transitions of sodium caseinate-lipid films as affected by lipid interactions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 384-391, 2010.

FANG, Z. et al. Active and intelligent packaging in meat industry. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 60-71, 2017.

FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 23, p. 13-27, Jan. 2012.

FECKA, I.; TUREK, S. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: Thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 108, n. 3, p. 1039-1053, 2008.

FERNANDES, R. et al. Stability of lamb loin stored under refrigeration and packed in different modified atmosphere packaging systems. **Meat science**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 554-561, 2014.

FERNÁNDEZ-GINÉS, J. M. et al. Effect of storage conditions on quality characteristics of bologna sausages made with citrus fiber. **Journal of Food Science**, New Jersey, v. 68, n. 2, p. 710-714, 2003.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. et al. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: Application in beef meatballs. **Meat science**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 371-380, 2005.

FERREIRA, A. S. et al. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 113, p. 490-499, 2014.

FERROCINO, I. et al. Impact of nisin-activated packaging on microbiota of beef burgers during storage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 82, n. 2, p. 549-559, 2015.

FLAKER, C. H. C. et al. Gelatin-based nanocomposite films: a study on montmorillonite dispersion methods and concentration. **Journal of Food Engineering**, London, v. 167, p. 65-70, 2015.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against volatilization. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FLOURY, J. et al. Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. **Journal of Food Engineering**, London, v. 58, n. 3, p. 227-238, Jul. 2003.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LARDIÈRES, J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 127-134, 2000.

FUJISAWA, H. et al. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Oxfordshire, v. 73, n. 9, p. 1948-1955, 2009.

GALVÃO, K. C. **Desenvolvimento de nanoemulsões para uso em alimentos e uso tópico.** 2015. 207 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

GARCÍA-MÁRQUEZ, E. et al. Design of fish oil-in-water nanoemulsion by microfluidization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 40, p. 87-91, 2017.

GARCÍA, M. L.; CÁCERES, E.; SELGAS, M. D. Utilisation of fruit fibres in conventional and reduced-fat cooked-meat sausages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 87, p. 624-631, 2007.

GAYSINSKY, S. et al. Formulation and characterization of phytochemical-carrying antimicrobial microemulsions. **Food Biophysics**, New York, v. 3, p. 54-65, 2008.

GENNADIOS, A. et al. Edible coatings and films based on proteins. In: KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. **Edible coatings and films to improve food quality**. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company Inc., 1994. p. 201-277.

GIMÉNEZ, B. et al. Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 30, p. 264-271, 2013.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. **Journal of Food Engineering**, London, v. 92, n. 1, p. 78-85, Maio. 2009a.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 23, n. 5, p. 1334-1341, Jul. 2009b.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 7, p. 889-96, Oct. 2010.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin–chitosan films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, n. 6, p. 1461-1469, Aug. 2011.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 35, p. 42-51, 2014.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. **Trends in Food Science and Technology**. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 20, p. 3-16, 2009.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 21, n. 7, p. 1133-1143, Oct. 2007.

GOÑI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 116, n. 4, p. 982-989, 2009.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids-water-vapor permeability and other physical-properties. **International Journal of Food Science and Technology**, West Sussex, v. 29, p. 39-50, 1994.

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**, New Jersey, v. 57, p. 190-195, 1992.

GRIFFIN, W.C. Classification of surface-active agents by "HLB". **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, New York, v. 1, p. 311-326, 1949.

GUO, H. et al. Slow, nondiffusive dynamics in concentrated nanoemulsions. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter, Cambridge Physics**, Maryland, v. 75, p. 1-8, 2007.

HAFDANI, F. N.; SADEGHINIA, N. A Review on application of chitosan as a natural antimicrobial. **World Academic Science, Engineering and Technology**, Canakkale, v. 5, n. 2, p. 225-229, 2011.

HAFSA, J. et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 68, p. 356-364, 2016.

HAIDER, S.; PARK, S.-Y.; LEE, S.-H. Preparation, swelling and electro-mechano-chemical behaviors of a gelatin–chitosan blend membrane. **Soft Matter**, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 485-492, 2008.

HARIPRIYA, D.; NADHIYA, K.; VIJAYALAKSHMI, K. Antioxidant potential of Cinnamaldehyde: an invitro study. **International Journal of Pharmaceutical research and Bio-science**, Gujarat, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2013.

HATANAKA, J. et al. Physicochemical and pharmacological characterization of α -tocopherol-loaded nanoemulsion system. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 396, n. 1-2, p. 188-193, 2010.

HAYASHI, K. et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde, derived from Cinnamomi cortex, on the growth of influenza A/PR/8 virus in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 74, p. 1-8, 2007.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

- HENDEL, N.; LAROUS, L.; BELBEY, L. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its *in vitro* inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 23, n. 4, p. 1725-1732, 2016.
- HERNÁNDEZ, M. **Encapsulación en nanoemulsiones de extractos de *Equisetum arvense***. 2009. 80 f. Tesis (Maestría) - División de Ciencias Biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, 2009.
- HEURTAULT, B. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 24, n. 23, p. 4283-4300, 2003.
- HOQUE, S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of film from cuttle fish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 1085-1097, 2011.
- HOSSEINI, S. F. et al. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 136, n. 3-4, p. 1490-1495, 2013.
- HOSSEINI, S. F. et al. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 194, p. 1266-1274, 2016.
- HROMIŠ, N. M. et al. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. **Journal of Food Engineering**, London, v. 158, p. 86-93, 2015.
- HSU, J. P.; NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, Missouri, v. 259, n. 2, p. 374-381, 2003.
- HUANG, Y.; HO, S. H. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 34, p. 11-17, 1998.
- HUANG, X. et al. Factors affecting migration of contaminants from paper through polymer coating into food simulants. **Packaging Technology and Science**, Oxford, v. 26, p. 23-31, 2013.
- HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 108, p. 986-995, 2008.
- HWANG, S. W. et al. Migration of α -tocopherol and resveratrol from poly(L-lactic acid)/starch blends films into ethanol. **Journal of Food Engineering**, London, v. 116, n. 4, p. 814-828, 2013.
- IMAI, T. et al. Inhibitory effects of cinnamaldehyde on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung carcinogenesis in rasH2 mice. **Cancer Letters**, Clare Ireland, v. 175, p. 9-16, 2002.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 11136. Sensory analysis – Methodology - General guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area, p. 1-21, 2014.

JAFARI, S.; HE, Y.; BHANDARI, B. Nano-Emulsion production by sonication and microfluidization - a comparison. **International Journal of Food Properties**, New York, v. 9, n. 3, p. 475-485, Sept. 2006.

JANGCHUD, A.; CHINNAN. M. S. Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 32, p. 89-94, 1999.

JIMÉNEZ, A. et al. Phase transitions in starch based films containing fatty acids - effect on water sorption and mechanical behaviour. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 408-418, 2013.

JO, Y. J. et al. Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 60, n. 1, p. 444-451, 2015.

JO, Y. J.; KWON, Y. J. Characterization of β -carotene nanoemulsions prepared by microfluidization technique. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 23, n. 1, p. 107-113, 2014.

JONGJAREONRAK, A. et al. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 449-458, 2008.

JRIDI, M. et al. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 67, p. 373-379, 2014.

JRIDI, M. et al. Effects of active gelatin coated with henna (*L. inermis*) extract on beef meat quality during chilled storage. **Food Control**, Oxford, v. 84, p. 238-245, 2018.

KALLEL, F. et al. Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds : Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. **Industrial Crops & Products**, Amsterdam, v. 62, p. 34-41, 2014.

KANATT, S. R. et al. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 290-297, 2012.

KAUR, K. et al. Formulation and physiochemical study of α -tocopherol based oil in water nanoemulsion stabilized with non toxic, biodegradable surfactant: sodium stearyl lactate. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 38, p. 570-578, 2017.

KAVOOSI, G. et al. Antioxidant and antibacterial properties of gelatin films incorporated with carvacrol. **Journal of Food Safety**, New Jersey, v. 33, n. 4, p. 423-432, 2013.

KAVOOSI, G. et al. Effects of essential oil on the water binding capacity, physico-mechanical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin films. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 57, n. 2, p. 556-561, 2014.

KERCH, G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 159-166, 2015.

KIM K. W. et al. Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and O-carboxymethylated chitosan. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 66, n. 8, p. 1495-1498, Aug. 2003.

KIM, J. W.; KIM, Y. S.; KYUNG, K. H. Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 67, n. 3, p. 499-504, 2004.

KIM, S. J.; USTUNOL, Z. Solubility and moisture sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 4388-4391, 2001.

KLANG, V. et al. Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, Oxford, v. 43, p. 85-103, 2012.

KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, London, v. 81, n. 1, p. 21-43, 31, Jan. 2012.

KROCHTA, J. M. Proteins as raw materials for films and coatings: Definitions, current status, and opportunities. In: GENNADIOS, A. **Protein-based film and coating**. Boca Ratón: CRC Press, 2002. p. 2-33.

KÜCHLER, S. et al. Process optimisation for making stable emulsions using accelerated dispersion analysis by multisample analytical centrifugation. **LabPlus International**, Berlin, v. 20, n. 14, p. 5-8, Sept. 2006.

KUHN, K. R.; CUNHA, R. L. Flaxseed oil - whey protein isolate emulsions: effect of high pressure homogenization. **Journal of Food Engineering**, London, v. 111, n. 2, p. 449-457, July. 2012.

KUORWEL, K. K. et al. Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 50, n. 2, p. 432-438, 2013.

KUREK, M.; GALUS, S.; DEBEAUFORT, F. Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 1, p. 56-67, 2014.

KURUKJI, D. **Design and development of emulsions for encapsulation and molecular delivery applications**. 2015. 223 p. Thesis (Degree of Doctor of Engineering) - School of Chemical Engineering, College of Engineering and Physical Sciences, University of Birmingham, Birmingham, U.K., 2015.

KUULIALA, L. et al. Preparation and antimicrobial characterization of silver-containing packaging materials for meat. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 6, p. 53-60, 2015.

KWON, S. S. et al. Preparation and characterization of coenzyme Q 10 -loaded PMMA nanoparticles by a new emulsification process based on microfluidization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 210, p. 95-104, 2002.

KYUNG, K. H. Antimicrobial properties of allium species. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 142-147, 2012.

LABUZA, T. P. et al. Stability of intermediate moisture foods. 1 - lipid oxidation. **Journal of Food Science**, New Jersey, v. 37, p. 154 - 159, Jan. 1972.

LAERMER, S. F.; ZAMBETTI, P. F. Alpha-tocopherol (vitamin E) - the natural antioxidant for polyolefins. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, London, v. 8, n. 3, p. 228-248, 1992.

LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1112, n. 2, p. 3-22, 2006.

LAWRENCE, R.; LAWRENCE, K. Antioxidant activity of garlic essential oil (*Allium Sativum*) grown in north Indian plains. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Beijing, v. 1, n. 3, p. S51-S54, Sept. 2011.

LEAL, L. B. et al. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 49, p. 167-173, Jan. 2013.

LEE, S. J. et al. Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 1, p. 415-427, Jan. 2011.

LEE, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 24, n. 6-7, p. 560-569, Aug. 2010.

LEKJING, S. A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. **Meat Science**, Amsterdam, v. 111, p. 192-197, 2016.

LEONG, W. et al. Preparation and characterisation of water-soluble phytosterol nanodispersions. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 129, p. 77-83, 2011.

LERCHE, D. Dispersion stability and particle characterization by sedimentation kinetics in a centrifugal field. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 23, n. 5, p. 699-709, 2002.

LERCHE, D.; SOBISCH, T. Direct and accelerated characterization of formulation stability. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 32, n. 12, p. 1799-1811, 2011.

LI, J. H. et al. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 37, p. 166-173, 2014.

LI, P. H.; CHIANG, B. H. Process optimization and stability of D-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 192-197, Jan. 2012.

LIANG, R. et al. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 30, p. 7548-55, 2012.

LIAO, B. C. et al. Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF- κ B activation: Effects upon I κ B and Nrf2. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Missouri, v. 229, n. 2, p. 161-171, 2008.

LIFSHITZ, I. M.; SLYOZOV, V. V. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, Oxford, v. 19, n. 1-2, p. 35-50, 1961.

LIMPISOPHON et al. K. Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 23, p. 1993-2000, 2009.

LIMPISOPHON, K.; TANAKA, M.; OSAKO, K. Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. **Food Chemistry**, Amsterdam v. 122, n. 4, p. 1095-1101, Oct. 2010.

LIU, F. et al. Preparation of gelatin films incorporated with tea polyphenol nanoparticles for enhancing controlled-release antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 15, p. 3987-3995, 2015.

LIU, F. et al. Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 62, p. 212-221, 2017.

LIU, G. et al. Combined effect of high hydrostatic pressure and enterocin LM-2 on the refrigerated shelf life of ready-to-eat sliced vacuum-packed cooked ham. **Food Control**, Oxford, v. 24, n. 1-2, p. 64-71, 2012.

LIU, H. et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 95, n. 2, p. 147-155, 2004.

LIU, W. et al. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, Missouri, v. 303, n. 2, p. 557-563, 2006.

LÓPEZ, D. et al. Edible film with antioxidant capacity based on salmon gelatin and boldine. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 77, p. 160-169, 2017.

LÓPEZ, D. E.; SOBRAL, P. J. A. Characterization of gelatin/chitosan scaffold blended with aloe vera and snail mucus for biomedical purpose. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 92, p. 645-653, 2016.

LÓPEZ-MATA, M. et al. Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of

chitosan films incorporated with carvacrol. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 11, p. 13735–13753, 2013.

LÓPEZ-RUBIO et al. Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. **Food Reviews International**, Oxford, v. 20, p. 357-387, 2004.

LUO, X. et al. Fabrication of β -carotene nanoemulsion-based delivery systems using dual-channel microfluidization: physical and chemical stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, Missouri, v. 490, p. 328-335, 2017.

M-110Y MICROFLUIDIZER® Materials processor. 2014. Disponível em: <www.microfluidicscorp.com>. Acesso em: 25 abr. 2014

MA, W. et al. Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. **Food Research International**, Oxford, v. 49, p. 572-579, Nov. 2012.

MAHER, P. G. et al. Optimization of β -Casein stabilized nanoemulsions using experimental mixture design. **Journal of Food Science**, New Jersey, v. 76, n. 8, p. 1108-1117, 2011.

MAJEED, H. et al. Influence of carrier oil type, particle size on invitro lipid digestion and eugenol release in emulsion and nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 52, p. 415-422, 2016.

MAJI, K. et al. Preparation and characterization of gelatin-chitosan-nano β -TCP based scaffold for orthopaedic application. **Materials Science & Engineering C**, Amsterdam, v. 86, p. 83-94, Feb. 2018.

MANZANAREZ-LÓPEZ, F. et al. Release of α -Tocopherol from Poly (lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, London, v. 104, n. 4, p. 508-517, 2011.

MAO, L. et al. Effects of homogenization models and emulsifiers on the physicochemical properties of β -Carotene nanoemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 31, n. 7, p. 986-993, 24, June. 2010.

MARCOS, B. et al. Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 152-158, Nov. 2007.

MARCUZZO, E. et al. Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 451-457, July. 2010.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 27, p. 220-227, 2012.

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

MASON, T. G. et al. Extreme emulsification : formation and structure of nanoemulsions. **Condensed Matter Physics**, Lviv, v. 9, n. 1, p. 193-199, 2006.

MAYER, S.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: Factors influencing droplet size and stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, Missouri, v. 402, p. 122-130, 15, July. 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, Cambridge, UK, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, Cambridge, UK, v. 7, n. 6, p. 2297-2316, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions**: principles, practices, and techniques. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. 632 p.

MCCLEMENTS, D. J. Theoretical prediction of emulsion color. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 97, n. 1-3, p. 63-89, 2002.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, New Jersey, v. 72, n. 8, p. 109-124, 2007.

MEHMOOD, T. Optimization of the canola oil based vitamin E nanoemulsions stabilized by food grade mixed surfactants using response surface methodology. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 183, p. 1-7, 2015.

MERT, B. Using high pressure microfluidization to improve physical properties and lycopene content of ketchup type products. **Journal of Food Engineering**, London, v. 109, n. 3, p. 579-587, 2012.

MILES A.; MISRA S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 38, p. 732-749, 1938.

MOHANTY, A. K. et al. **Natural fibers, biopolymers, and biocomposites**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005.

MOORE, M. E. et al. Effects of antioxidants in polyethylene film on fresh beef color. **Journal of Food Science**, New Jersey, v. 68, p. 99-104, 2003.

MORADI, M. et al. Effectiveness of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract impregnated chitosan film on ready-to-eat mortadella-type sausages during refrigerated storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 91, n. 15, p. 2850-2857, 2011.

MORADI, M. et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 46, n. 2, p. 477-484, May. 2012.

MULLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 47, p. 3-19, July, 2001.

MYERS, R.; MONTGOMERY, D. C; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology**: process and product optimization using designed experiments. New York: John Wiley & Sons, 2009. v. 705, p. 281-482.

NAKAJIMA, H. Microemulsions in cosmetics. In: SOLANS, C.; KUNIEDA, H. **Industrial applications of microprocessor**. New York: Marcel Dekker Inc., 1996. p. 175-197.

NAZARZADEH, E.; ANTHONYPILLAI, T.; SAJJADI, S. On the growth mechanisms of nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, Missouri, v. 397, p. 154-162, 2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility test**. 6th ed. Wayne, PA, 1997. (Approved Standard, M2-A6)

NEJADMANSOURI, M. et al. Physicochemical properties and storage stability of ultrasound-mediated WPI-stabilized fish oil nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 61, p. 801-811, 2016.

NHAN, P. P.; HOA, N. K. Effect of light and storage time on Vitamin E in pharmaceutical products. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, Reading, UK, v. 4, n. 5, p. 176-180, 2013.

NIEDDU, E. et al. Preparation and biodegradation of clay composites of PLA. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 69, n. 6, p. 371-379, 2009.

NISA, I. et al. Development of potato starch based active packaging films loaded with antioxidants and its effect on shelf life of beef. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 52, n. 11, p. 7245-7253, 2015.

NISPEROS-CARRIEDO, M. Edible coatings and films based on polysaccharides. In: KROCHTA, J.; BALDWIN, E.; NISPEROS-CARRIEDO, M. (Ed.). **Edible coatings and films to improve food quality**. Lancaster: Technomic Pub. Co. Inc., 1994. p. 305-336, 1994.

NORONHA, C. M. et al. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 159, p. 529-535, 2014.

NOWZARI, F.; SHÁBANPOUR, B.; OJAGH, S. M. Comparison of chitosan-gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 141, n. 3, p. 1667-1672, 2013.

NÚÑEZ-FLORES, R. et al. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 13, p. 163-172, 2013.

OLIVEIRA, T. et al. Pomegranate peel pectin films as affected by montmorillonite. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 198, p. 107-112, 2016.

OSWIN, C. R. The kinetics of package life. III. Isotherm. **Journal of the Society of Chemical Industry**, London, v. 65, p. 419-42, 1946.

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

OTONI, C. G. et al. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. **Food Research International**, Oxford, v. 83, p. 60-73, 2016a.

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

OUATTARA, B. et al. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. **Journal of Food Science**, New Jersey, v. 65, n. 5, p. 768-773, 2000.

OUATTARA, B. et al. Combined effect of gamma irradiation, ascorbic acid, and edible coating on the improvement of microbial and biochemical characteristics of ground beef. **Journal of food protection**, Iowa, v. 65, n. 6, p. 981-987, 2002.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 70, n. 4, p. 901-908, 2007.

PAPARELLA, A. et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1174-1182, 2008.

PATÍÑO, J. H. et al. Evaluation of polyamide composite casings with silver-zinc crystals for sausages packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 1, p. 3-9, 2014.

PELEG, M. Assessment of a semi-empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms. **Journal of Food Process Engineering**, New Jersey, v. 16, p. 21-27, 1993.

PENG, Y.; LI, Y. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 36, p. 287-293, 2014.

PERDONES, A. et al. Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 57, p. 271-279, 2016.

PERDONES, A. et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 36, p. 256-264, 2014.

PEREDA, M. et al. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 1372-1381, July. 2011.

PEREDA, M.; ARANGUREN, M. I.; MARCOVICH, N. E. Caseinate films modified with tung oil. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 24, n. 8, p. 800-808, Nov. 2010.

PEREIRA, M. O. S. **Estudo comparativo de métodos de avaliação da capacidade antioxidante de compostos bioativos**. 2010. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

PÉROVAL, C. et al. Edible arabinoxylan based films. 1. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3977-3983, 2002.

PERRY, C. C. et al. Atomic force microscopy study of the antimicrobial activity of aqueous garlic *versus* ampicillin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 89, n. 6, p. 958-964, 2009.

PINNAMANENI, S., DAS, N.; DAS, S. Comparison of oil-in-water emulsions manufactured by microfluidization and homogenization. **Die Pharmazie**, Eschborn, v. 58, p. 554-558, 2003.

PIRES, M. A. **Impacto da redução de sódio e enriquecimento com ômega-3, por meio da adição do óleo de *Echium*, sobre a percepção do consumidor e as características tecnológicas, microestruturais, sensoriais e de estabilidade em mortadelas**. 2017. 220 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

POLATOĞLU, B. et al. Moisture adsorption isotherms and thermodynamics properties of sucuk (Turkish dry-fermented sausage). **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 89, n. 4, p. 449-456, 2011.

POLITEO; JUKIC; MILOS. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 101, p. 379-385, 2007.

PONCE, A. G. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 294-300, Aug. 2008.

PONCE, P. A.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**, London, v. 99, p. 70-75, 2010.

POOJA, D. et al. Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method. **Data in Brief**, Amsterdam, v. 6, p. 15-19, 2016.

PORRAS, M. et al. Properties of water-in-oil (W/O) nanoemulsions prepared by a low-energy emulsification method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 324, p. 181-188, 2008.

POTHAKOS, V.; SAMAPUNDO, S.; DEVLIEGHERE, F. Total mesophilic counts underestimate in many cases the contamination levels of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) in chilled-stored food products at the end of their shelf-life. **Food Microbiology**, London, v. 32, n. 2, p. 437-443, 2012.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 38, n. 8, p. 859-865, Dez. 2005.

PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; ARTHARN, A. Properties and microstructure of protein-based film from roundscad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 605-614, 2007.

QIN et al. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 367-374, Mar. 2006.

QUINTANILLA-CARVAJAL, M. et al. Nanoencapsulation: a new trend in food engineering processing. **Food Engineering Reviews**, Heidelberg, v. 2, p. 39-50, 2010.

RAMOS, M. et al. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 58, n. 2, p. 470-477, 2014.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: role of oil phase composition on formation and stability. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 326-334, Dec. 2012.

RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, Oxford, v. 50, n. 8, p. 962-1079, 2005.

RAZAVI ROHANI, S. M. et al. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 10, p. 2260-2265, Dec. 2011.

RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology & Medicine**, Philadelphia, v. 26, n. 98, p. 1231-1237, 1999.

REYES, L. M. **Produção, caracterização e estudo da estabilidade de filmes à base de gelatina e extrato de própolis vermelha enriquecidos com óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basilicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*) ou hortelã (*Mentha piperita*)**. 2017. 159 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

RHIM, J. W.; NG, P. K. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 47, n. 4, p. 411-433, 2007.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 61, p. 132-140, 2017.

RICAURTE, L. et al. Production of high-oleic palm oil nanoemulsions by high-shear homogenization (microfluidization). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 35, p. 75-85, Mar. 2016.

RICAURTE, L. et al. Physical, thermal and thermodynamical study of high oleic palm oil nanoemulsions. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 256, p. 62-70, Feb. 2018.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, London, v. 90, n. 4, p. 531-539, 2009.

RIZZOLO, A. et al. Volatile compound composition and antioxidant activity of cooked ham slices packed in propolis-based active packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 8, p. 41-49, 2016.

RUBILAR, J. F. et al. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, London, v. 115, n. 4, p. 466-474, 2013.

RUI, L. et al. A comparative study on chitosan/gelatin composite films with conjugated or incorporated gallic acid. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 173, p. 473-481, 2017.

RUIZ-NAVAJAS, Y. et al. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with Thymus moroderi or Thymus piperella essential oils. **Food Control**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 386-392, 2013.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, Missouri, v. 391, p. 95-102, 2013.

SADAKA, F. et al. Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 20, p. 350-355, 2013.

SAKULKU, U. et al. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 372, p. 105-111, 2009.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 30, p. 401-407, Jan. 2013.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, p. 1-10, 2014.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 23, n. 8, p. 2102-2109, 2009.

SANLA-EAD, N. et al. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films. **Packaging Technology and Science**, Oxford, v. 25, p. 7-17, 2012.

SANTIAGO-SILVA, P. et al. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, Oxford, v. 20, p. 85-89, 2009.

SASAKI, R. S.; MATTOSO, L. H. C.; DE MOURA, M. R. New edible bionanocomposite prepared by pectin and clove essential oil nanoemulsions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Baku, v. 16, n. 6, p. 6540-6544, 2016.

SERRANO-LEÓN, J. S. et al. Chitosan active films containing agro-industrial residue extracts for shelf life extension of chicken restructured product. **Food Research International**, Oxford, v. 108, p. 93-100, Oct. 2017.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, Oxford, v. 39, p. 639-644, 2006.

SHAHBAZI, Y. The properties of chitosan and gelatin films incorporated with ethanolic red grape seed extract and Ziziphora clinopodioides essential oil as biodegradable materials for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 99, p. 746-753, 2017.

SHAKEEL, F.; RAMADAN, W. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 75, p. 356-362, 2010.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SHEN, S. et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, Oxford, v. 47, p. 196-202, 2015.

SHREAZ, S. et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 112, p. 116-131, 2016.

SHUKAT, R.; BOURGAUX, C.; RELKIN, P. Crystallisation behaviour of palm oil nanoemulsions carrying vitamin E: DSC and synchrotron X-ray scattering studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapest, v. 108, p. 153-161, 2012.

SILVA, H. D. et al. Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, London, v. 102, n. 2, p. 130-135, Jan. 2011.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 614 p.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 24, n. 8, p. 770-775, Nov. 2010.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 61, p. 695-702, 2016.

SOARES, N. et al. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa para conservação de produtos cárneos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 24., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: SBM, 2007. 1 CD-ROM.

SOAZO, M.; RUBIOLO, A. C.; VERDINI, R. A. Effect of drying temperature and beeswax content on moisture isotherms of whey protein emulsion film. **Procedia Food Science**, Amsterdam, v. 1, p. 210-215, Jan. 2011.

SOBISCH, T.; LERCHE, D. Flocculation and colloidal crystallization of aqueous nanosized metal oxide dispersions as function of pH and electrolyte. **Dispersion Letters**, Hampton, v. 6, p. 5-12, 2015.

SOBRAL P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência & Engenharia**, Uberlândia, MG., v. 8, p. 60-67, 1999.

SOBRAL, P. J. A. et al. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 15, n. 4-6, p. 423-432, July. 2001.

SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 15, n. 4-6, p. 377-382, 2001.

SOUZA, M. P. et al. Development and characterization of an active chitosan-based film containing quercetin. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 8, p. 2183-2191, 2015.

STAT-EASE Inc. Software for experiment Design – Expert® versão 8.0.6. Minneapolis, 2010.

STATPOINT, Inc. Software STATGRAPHICS® Centurion XV. Manual do usuario - Ajuda, 2009.

SULLIVAN, J. J. O. et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 53, p. 141-154, 2016.

SUN, L. et al. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 163, p. 81-91, 2017.

SUNG, S. et al. Control of bacteria growth on ready-to-eat beef loaves by antimicrobial plastic packaging incorporated with garlic oil. **Food Control**, Oxford, v. 39, p. 214-221, 2014a.

SUNG, S. et al. Effects of Allium sativum essence oil as antimicrobial agent for food packaging plastic film. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 26, p. 406-414, 2014b.

SUNG, S. Y. et al. Antimicrobial agents for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 110-123, 2013.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TALEGAONKAR, S. et al. Design and development of oral oil-in-water nanoemulsion formulation bearing atorvastatin: in vitro assessment. **Journal of Dispersion Science and Technology**, Philadelphia, v. 31, p. 690-701, 2010.

TALÓN, E. et al. Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 157, p. 1153-1161, 2017.

TAN, C. P.; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation , characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 92, p. 661-671, 2005.

TANG, S. Y.; SHRIDHARAN, P.; SIVAKUMAR, M. Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions - Comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 20, p. 485-497, Jan. 2013.

TEHRANY, E. A.; MOUAWAD, C.; DESOBRY, S. Determination of partition coefficient of migrants in food simulants by the PRV method. **Food Chemistry**, Amsterdam v. 105, n. 4, p. 1571-1577, 2007.

TEIXEIRA, M. C. et al. D- α -tocopherol nanoemulsions: size properties, rheological behavior, surface tension, osmolarity and cytotoxicity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 231-235, 2017.

TEO, A. et al. Kinetic stability and cellular uptake of lutein in WPI-stabilised nanoemulsions and emulsions prepared by emulsification and solvent evaporation method. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 221, p. 1269-1276, 2017.

TIAN, F.; DECKER, E. A.; GODDARD, J. M. Controlling lipid oxidation via a biomimetic iron chelating active packaging material. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 50, p. 12397-12404, 2013.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 134, n. 3, p. 1571-1579, 2012.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. **Journal of Food Engineering**, London, v. 117, n. 3, p. 350-360, Aug. 2013.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Comparative studies on properties and antioxidative activity of fish skin gelatin films incorporated with essential oils from various sources. **International Aquatic Research**, Heidelberg, v. 6, n. 2, p. 1-12, 2014a.

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

TORNUK, F. et al. LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 64, n. 2, p. 540-546, 2015.

TORRES, J.A. Edible films and coatings from proteins. In: HETTIARACHCHY, N.; ZIEGLER, G. (Ed.). **Protein functionality in food systems**. New York: Marcel Dekker Inc., 1994. p. 467-507.

TOVAR, L. et al. Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 13, p. 5270-5275, 2005.

TRONCOSO, E.; AGUILERA, J. M.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 355-363, June. 2012.

ÚBEDA, S. et al. Overall and specific migration from multilayer high barrier food contact materials–kinetic study of cyclic polyester oligomers migration. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, Oxfordshire, v. 34, n. 10, p. 1784-1794, 2017.

UNLU, M. et al. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 11, p. 3274-3280, 2010.

UPADHYAY, A. et al. Control of listeria monocytogenes on skinless frankfurters by coating with phytochemicals. **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 63, n. 1, p. 37-42, 2015.

U.S. Departmente of Agriculture – USDA. **Meat and poultry hazards and controls guide**. 2005. Disponível em:

<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/5100.2/Meat_and_Poultry_Hazards_Controls_Guide_10042005.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2017.

VALENCIA, G. A. et al. Physical and morphological properties of nanocomposite films based on gelatin and Laponite. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 124-125, p. 260-266, 2016.

VALENZUELA, C.; ABUGOCH, L.; TAPIA, C. Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 50, n. 2, p. 531-537, 2013.

VAN DEN BERG, C.; BRUIN, S. Water activity and its estimation in food systems. Em: ROCKLAND, L. B.; STEWART, G. F. **Water activity**: influences on food quality, New York: Academic, 1981. p. 147-177.

VÁSCONEZ, M. B. et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, Oxford, v. 42, n. 7, p. 762-769, Aug. 2009.

VEIS, A. The molecular characterization of gelatin. In: VEIS, A. **the macromolecular chemistry of gelatin**. New York: Academic Press, 1964. Chapt. II, p. 49-126.

VILLALOBOS, R. et al. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 19, p. 53-61, Jan. 2005.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of packaging conditions on shelf-life of mortadella made with citrus fibre washing water and thyme or rosemary essential oil. **Food and Nutrition Sciences**, Irvine, CA, v. 2, p. 1-10, 2011.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface science**, Amsterdam, v. 74, p. 69-117, 1998.

VYNCKE, W. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). **Fette Seifen Anstrich**, Weinheim, v. 77, n. 6, p. 239-240, 1975.

WALKER, R. M. et al. Improvements in the formation and stability of fish oil-in-water nanoemulsions using carrier oils: MCT, thyme oil, & lemon oil. **Journal of Food Engineering**, London, v. 211, p. 60-68, 2017.

WANG, J. et al. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 127, n. 4, p. 1680-1685, 2011.

WANG, L. et al. Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. **Journal of Food Engineering**, London, v. 90, p. 11-19, Jan. 2009.

WANG, L. et al. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 32, p. 35-41, 2013.

WARD, G.; NUSSINOVITCH, A. Gloss properties and surface morphology relationships of fruits. **Journal of food and science**, New Jersey, v. 61, n. 5, p. 973-977, 1996.

WAYNE, P. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests** - approved standard. 9th ed. 2006. v. 26.

WEI, Q.-Y. et al. The antimicrobial activities of the cinnamaldehyde adducts with amino acids. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 150, n. 2-3, p. 164-70, Nov. 2011.

WENG, W. L.; LIU, Y. C.; LIN, C. W. Studies on the optimum models of the dairy product Kou Woan Lao using response surface methodology. **Asian– Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 14, n. 10, p. 1470-1476, 2001.

- WOLF, K. L.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 23, n. 7, p. 1886-1894, 2009.
- WRONA, M. et al. Antioxidant packaging with encapsulated green tea for fresh minced meat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 41, p. 307-313, 2017.
- WU, J. et al. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 32, p. 42-51, 2013.
- WU, J. et al. Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 2, p. 7-16, 2014.
- WU, J. et al. The preparation, characterization, antimicrobial stability and invitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 43, p. 427-435, 2015.
- XING, F. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. **Food Control**, Oxford, v. 46, p. 343-350, 2014.
- XU, D. et al. Impact of whey protein - Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 258-266, 2012.
- YANG, Y. et al. Fabrication of ultrafine edible emulsions: comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 398-406, Dec. 2012.
- YANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 712-720, Mar. 2013.
- YEN, M.-T.; YAN, J.-H.; MAU, J.-L. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 74, n. 4, p. 840-844, Nov. 2008.
- YIN, B.; ZHANG, R.; YAO, P. Influence of pea protein aggregates on the structure and stability of pea protein/soybean polysaccharide complex emulsions. **Molecules**, Basel, v. 20, p. 5165-5183, 2015.
- YIN, L. J. et al. Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of β -carotene nanodispersions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 23, n. 6, p. 1617-1622, 2009.
- YIN, Y. et al. A preliminary study on chitosan/gelatin polyelectrolyte complex formation. **Journal of Materials Science (Letter)**, New York, v. 40, p. 4649-4652, 2005.
- YOON, S. DO. Cross-linked potato starch-based blend films using ascorbic acid as a plasticizer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, p. 1755-1764, 2014.

YUAN, G. et al. Physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of chitosan films containing carvacrol and pomegranate peel extract. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 6, p. 11034-11045, 2015.

YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Chitosan films and coatings containing essential oils: the antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Research International**, Oxford, v. 89, p. 117-128, 2016.

YUAN, Y. et al. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, Oxford, v. 41, p. 61-68, Jan. 2008a.

YUAN, Y. et al. Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 1300-1306. Apr. 2008b.

YUSOFF, A.; MURRAY, B. S. Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, p. 42-55, 2011.

ZANIN, S. M. et al. Determinação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.3, p.13-18, 2002.

ZHU, B. X. et al. Antioxidant effects of sesamol released from polymeric films on lipid oxidation in linoleic acid and oat cereal. **Packaging Technology and Science**, Oxford, v. 26, p. 31-38, Mar. 2013.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat science**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 338-345, 2009.

ANEXO I – Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa da FZEA/USP.

USP - FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: FILMES À BASE DEGELATINA COM AGENTES ATIVOS NANOEMULSIONADOS: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS														
Pesquisador: LUIS JAIME PEREZ CORDOBA														
Área Temática:														
Versão: 1														
CAAE: 74600117.2.0000.5422														
Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO														
Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 2.247.510														
Apresentação do Projeto: O projeto apresenta-se bem elaborado e todos os documentos necessários para a avaliação foram anexados. A pesquisa visa elucidar se filmes ativos adicionados com nanoemulsões podem apresentar boas propriedades físicas, estruturais, mecânicas, térmicas, óticas, de estabilidade e atividade antimicrobiana e antioxidante, e podem ser usados na separação de fatias de presunto cozido e de outras matrizes alimentícias, para estender a sua vida de prateleira														
Objetivo da Pesquisa: o objetivo deste trabalho será desenvolver nanoemulsões O/W com três agentes ativos na fase óleo e desenvolver, caracterizar e aplicar filmes ativos à base de gelatina, adicionados com as nanoemulsões O/W preparadas nas condições ótimas de processo.														
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os compostos utilizados neste trabalho (ativo alfa-tocoferol, aldeído cinâmico e óleo essencial de alho) serão caracterizados com relação ao seu poder antimicrobiano, concentração mínima inibitória (CMI) e a sua capacidade antioxidante. Os filmes serão adicionados a presunto cozido adquirido no mercado local, preparadas nas														
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="3">Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Campus Universitário da USP</td> <td>CEP: 13.635-900</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: PIRASSUNUNGA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (19)3565-4299</td> <td>Fax: (19)3565-4114</td> <td>E-mail: cepfzea@usp.br</td> </tr> </table>			Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225			Bairro: Campus Universitário da USP	CEP: 13.635-900		UF: SP	Município: PIRASSUNUNGA		Telefone: (19)3565-4299	Fax: (19)3565-4114	E-mail: cepfzea@usp.br
Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225														
Bairro: Campus Universitário da USP	CEP: 13.635-900													
UF: SP	Município: PIRASSUNUNGA													
Telefone: (19)3565-4299	Fax: (19)3565-4114	E-mail: cepfzea@usp.br												

Fonte: Própria autoria

ANEXO II – Termograma DSC de óleo de canola.

Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A – Ficha sensorial com escala hedônica estruturada e atributos sensoriais utilizada no teste de aceitação sensorial.

Nome: _____ **Ficha** ____

Idade: _____ **Sexo:** () Masculino () Feminino **Data:** ____ / ____ / ____

Você está recebendo uma amostra de **MORTADELA**. Por favor, avalie o produto e marque na escala o quanto você gostou ou desgostou das seguintes características:

Número da amostra _____

		Nota	
ESCALA 9-Gostei muitíssimo 8-Gostei muito 7-Gostei moderadamente 6-Gostei ligeiramente 5-Nem gostei/nem desgostei 4-Desgostei ligeiramente 3-Desgostei moderadamente 2-Desgostei muito 1-Desgostei muitíssimo	COR		Comentários:
	AROMA		Comentários:
	TEXTURA		Comentários:
	SABOR		Comentários:
	QUALIDADE GLOBAL		Comentários:

Fonte: Própria autoria

APÊNDICE B – Resultados de caracterização das nanoemulsões imediatamente após o seu preparo.

Tabela 39 - Valores experimentais do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N₁ no dia 0

Corrida	P, X ₁ (MPa)	Ciclos, X ₂	T, X ₃ (°C)	Diâmetro médio de gota (nm)	Polidispersidade	Estabilidade
1	20	3	41,1	142,7	0,16	0,6
2	60	3	42,5	104,5	0,19	0,6
3	60	3	42,5	107,4	0,19	0,6
4	100	1	70,0	124,3	0,15	0,5
5	100	3	15,0	78,6	0,16	0,7
6	20	2	39,8	167,9	0,16	0,5
7	20	1	70,0	231,6	0,13	0,3
8	60	1	28,8	135,6	0,20	0,5
9	20	2	66,0	158,1	0,16	0,5
10	100	3	70,0	87,6	0,14	0,7
11	64	2	15,0	97,4	0,18	0,6
12	60	1	28,8	139,0	0,17	0,5
13	60	1	28,8	139,5	0,17	0,5
14	100	2	19,4	88,3	0,18	0,6
15	100	1	15,0	119,5	0,19	0,5
16	41,2	3	15,0	103,7	0,18	0,6
17	56	2	70,0	108,6	0,13	0,6
18	20	1	15,0	190,7	0,18	0,4
19	20	3	70,0	186,9	0,08	0,5
20	60	3	42,5	98,6	0,18	0,6
21	41,2	3	15,0	109,7	0,18	0,6
22	100	2	45,3	87,8	0,18	0,7

Fonte: Própria autoria

Tabela 40 - Valores experimentais do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N₂ no dia 0

Corrida	P, X ₁ (MPa)	Ciclos, X ₂	T, X ₃ (°C)	Diâmetro médio de gota (nm)	Polidispersidade	Estabilidade
1	60	2	15,0	107,2	0,19	0,5
2	100	2	42,5	97,0	0,17	0,6
3	60	2	42,5	113,6	0,16	0,4
4	60	3	70,0	101,5	0,16	0,6
5	60	3	42,5	103,8	0,17	0,5
6	20	3	70,0	157,3	0,14	0,5
7	100	3	15,0	90,4	0,17	0,6
8	20	2	70,0	180,1	0,14	0,4
9	60	3	15,0	103,2	0,17	0,5
10	60	2	70,0	123,5	0,17	0,5
11	20	2	42,5	172,3	0,14	0,4
12	60	3	42,5	109,5	0,17	0,5
13	20	3	15,0	153,1	0,14	0,5
14	100	3	70,0	87,9	0,15	0,6
15	100	2	15,0	101,9	0,17	0,6
16	100	2	42,5	108,2	0,19	0,6

Fonte: Própria autoria

Tabela 41 - Valores experimentais do diâmetro médio de gota, polidispersidade e estabilidade da nanoemulsão N₃ no dia 0

Corrida	P, X ₁ (MPa)	Ciclos, X ₂	T, X ₃ (°C)	Diâmetro médio de gota (nm)	Polidispersidade	Estabilidade
1	60	2	15,0	105,3	0,18	0,6
2	100	2	42,5	90,3	0,17	0,6
3	60	2	42,5	108,0	0,18	0,5
4	60	3	70,0	93,5	0,15	0,6
5	60	3	42,5	84,9	0,18	0,6
6	20	3	70,0	183,2	0,10	0,5
7	100	3	15,0	79,3	0,15	0,7
8	20	2	70,0	209,7	0,10	0,6
9	60	3	15,0	93,0	0,16	0,6
10	60	2	70,0	113,8	0,16	0,6
11	20	2	42,5	165,7	0,15	0,5
12	60	3	42,5	95,8	0,17	0,6
13	20	3	15,0	142,4	0,14	0,5
14	100	3	70,0	82,2	0,14	0,7
15	100	2	15,0	97,7	0,18	0,6
16	100	2	42,5	91,5	0,16	0,5

Fonte: Própria autoria