



**LUCAS BALDO LUVIZARO**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPOLÍMEROS  
ANTIMICROBIANOS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE  
LEITE E NANOFIBRAS DE CELULOSE COM ADIÇÃO  
DE ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA**

**LAVRAS – MG  
2021**

**LUCAS BALDO LUVIZARO**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPOLÍMEROS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADO  
PROTEICO DE SORO DE  
LEITE E NANOFIBRAS DE CELULOSE COM ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE  
CANELA**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Bacharel.

Dra. Ana Carolina Salgado de Oliveira  
Orientadora

Dra. Raissa Alvarenga Carvalho Gomide  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

**LUCAS BALDO LUVIZARO**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPOLÍMEROS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADO  
PROTEICO DE SORO DE  
LEITE E NANOFIBRAS DE CELULOSE COM ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE  
CANELA**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Bacharel.

Aprovado em 26 de Novembro de 2021.

Dra. Ana Carolina Salgado de Oliveira - IFSUL RIOGRANDENSE

Msc. Jayne de Abreu Figueiredo – UFLA

PhD. Soraia Vilela Borges - UFLA

Dra. Ana Carolina Salgado de Oliveira  
Orientadora

Dra. Raíssa Alvarenga Carvalho Gomide  
Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2021**

Ofereço a Deus e a Nossa Senhora, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, protegendo-me e guiando-me.

Dedico aos meus pais Ana Maria e Luis Antônio, pelo exemplo, incentivo, amor e confiança. Ao meu irmão, João Pedro pela irmandade e por ter sido o apoio em minha ausência.

## AGRADECIMENTO

A Deus e a Nossa Senhora por me permitirem chegar até aqui e poder vivenciar este momento, concedendo bênçãos, saúde, força e sabedoria.

Aos meus pais e irmão pelo incentivo, paciência e por sempre estarem presentes. Amo muito vocês!

Ao minha grande amiga e companheira de pesquisa Flávia Débora, por toda ajuda, companheirismo, amizade e dedicação. Muito obrigado!

A quem se tornou um irmão e sua família que me recebeu como tal, Lauriano Barbosa, agradeço o companheirismo, paciência e amizade tudo se tornou mais fácil com nosso compartilhamento. Eterna gratidão.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Embalagens e Microencapsulação: Beatriz, Raíssa, Ana Carolina, Jayne, Taline, Tamara, Camila, Eloá, Paulo, Mariá, Hugo, Laura, Gerson, Bruna pelo auxílio, companheirismo e ensinamentos. Em especial para minhas orientadoras, Professora Marali e Soraia pela amizade, oportunidade, paciência, incentivo e dedicação.

A turma de Engenharia de Alimentos 2013/01: Caio, Luiza, Laura, Gabriela, Larissa, Fabiana e Renata. Em especial as minhas amigas Amanda, Cynara, e Leticia, obrigado por tornarem parte do meu crescimento, vocês tem todo meu carinho.

Ao centro acadêmico de Engenharia de Alimentos (CAEAL), pela oportunidade de crescimento e desenvolvimento.

A atlética das Engenharias Xarada, obrigado pela oportunidade de representar e ser parte desta família. Agradeço o acolhimento.

Aos colegas de trabalho por onde passei em especial minha grande amiga Micheli, obrigado por tanto. Ao acolhimento da família Neri e Zambalde, vocês são especiais Lorena. Gratidão pela oportunidade e aprendizado oferecido nos estágio, Renato Pacheco e equipe Padaria Jeito Caseiro. Valdir, André, Nathalia, Gabriele, Renato, Luís e Arthur, sentimentos em não poder ter continuado a caminhada ao lado de vocês, sucesso a todos e a Vida Veg.

As repúblicas por onde passei agradeço o acolhimento, paciência e troca de experiências.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade.

Aos membros da banca examinadora Ana Carolina, Raissa, Soraia e Jayne, obrigado pelo apoio, confiança e ensinamentos.

Aos meus amigos e familiares e todos aqueles que acreditaram em mim e que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa.

Meus sinceros agradecimentos e gratidão!

*As coisas que são impossíveis aos homens são possíveis a Deus.*

*Lucas 18:27*

## RESUMO

As embalagens para os alimentos estão associadas à proteção perante a contaminação, protegendo-o do ambiente externo e contra danos mecânicos causados durante todo o processo de envase até a comercialização, mantendo assim a integridade, qualidade e segurança dos produtos alimentícios. Todavia temos a preocupação com o destino final destas embalagens e os impactos causados por elas ao meio ambiente, levando em consideração um crescimento demasiado na geração de resíduo sólido onde os plásticos e os materiais utilizados como embalagens estão envolvidos. Nos últimos anos observamos o crescimento nos estudos e aplicações de materiais alternativos como promessas de contribuir favoravelmente frente a esta realidade, como por exemplo, o desenvolvimento de biopolímeros ativos, para substituição das embalagens convencionais com o propósito de amenizar os problemas ambientais. O aproveitamento do soro de leite dos laticínios, como matéria-prima base para formação destes biopolímeros, associado com a utilização de compostos químicos ativos voláteis presentes na natureza como o óleo essencial de canela (OEC) extraído de plantas e com propriedades antimicrobianas juntamente com a incorporação de nanofibras de celulose (NFC), que atuam como agente de reforço para os filmes são uma alternativa para amenizar os efeitos nocivos das embalagens no meio ambiente, levando em consideração que todo o material descrito é encontrado em abundância na natureza, além disso, o soro de leite é aproveitado das indústrias de laticínios, evitando a geração de efluentes e descarte inadequado. Perante o exposto, o objetivo deste projeto foi desenvolver biopolímeros de isolado proteico de soro de leite (IPS), incorporados com OEC e NFC e caracterizá-los morfológicamente (MEV) e estruturalmente (FTIR), avaliar as propriedades de barreiras mecânicas, propriedades óticas e avaliar o efeito antimicrobiano. Encontrou-se a concentração de 98,29% do composto (E)-cinamaldeído no OEC, composto majoritário, com concentração mínima inibitória frente à bactéria *Listeria innocua* de 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para a bactéria *Escherichia coli* de 31,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As micrografias, em geral, apresentaram-se homogêneas formando assim uma boa matriz polimérica, porém com alguns pontos de aglomeração de NFC. Através das ligações químicas obtidas na análise de FTIR foi possível compreender as interações entre a matriz polimérica e o OEC bem como as NFC. Halos de 35 a 39 mm foram obtidos no teste antimicrobiano dos filmes, comprovando assim a eficácia do OEC perante as bactérias testadas. Os filmes em geral se apresentaram com pouca intensidade de cor, com uma tendência ao amarelo com transparência necessária para serem comercializados. Além disso, alimentos requerem proteção ao serem armazenados e a adição de nanofibras de celulose proporcionou melhora nas propriedades mecânicas dos filmes desenvolvidos. Os filmes obtidos são promissores para possíveis substituições de polímeros convencionais, mostrando-se eficientes e capazes de promover maior segurança dos alimentos, e que atuem como antimicrobianas preservando as características sensoriais.

**Palavras-chaves:** Antimicrobiano. Embalagem ativa. Nanocompósitos.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Micrografias de MEV para filmes de IPS adicionados de OEC e NFC OEC <sub>0</sub> NFC <sub>0</sub> (A), OEC <sub>5</sub> NFC <sub>0</sub> (B), OEC <sub>10</sub> NFC <sub>0</sub> (C), OEC <sub>30</sub> NFC <sub>0</sub> (D), OEC <sub>0</sub> NFC <sub>1</sub> (E), OEC <sub>5</sub> NFC <sub>1</sub> (F), OEC <sub>10</sub> NFC <sub>1</sub> (G), OEC <sub>30</sub> NFC <sub>1</sub> (H).....	31
Figura 2 - Espectro de infravermelho dos tratamentos com óleo essencial de canela e sem adição de nanofibras.....	33
Figura 3 - Espectro de infravermelho dos tratamentos com nanofibras (OEC <sub>0</sub> NFC <sub>1</sub> , OEC <sub>5</sub> NFC <sub>1</sub> , OEC <sub>10</sub> NFC <sub>1</sub> , OEC <sub>30</sub> NFC <sub>1</sub> ).....	35
Figura 4 - Espaço de cores CIELAB .....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de OEC e NFC e identificação dos filmes.....	25
Tabela 2 - Concentração mínima inibitória do óleo essencial de canela.....	30
Tabela 3 - Resultados obtidos na análise mecânica dos filmes. ....	36
Tabela 4 - Parâmetros L*, a*, b* e transparências obtidos análise de cor dos filmes.....	38
Tabela 5 - Parâmetros ângulo Hue e índice de saturação obtido na análise de cor dos filmes.	39
Tabela 6 - Atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com O.E de canela.....	40

## SUMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEORICO .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Polímeros Biodegradáveis.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Isolado proteico de soro de leite .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Óleos essenciais .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Nanofibras de celulose.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5</b>	<b>Embalagens para alimentos e suas propriedades.....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Análise cromatográfica do óleo essencial de canela .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Determinação da concentração mínima inibitória do óleo essencial de canela ..</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Desenvolvimento dos biopolímeros ativos .....</b>	<b>24</b>
<b>4.4</b>	<b>Caracterização dos filmes .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4.1</b>	<b>MEV.....</b>	<b>26</b>
<b>4.4.2</b>	<b>FTIR .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Análises propriedades mecânicas.....</b>	<b>26</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Propriedades ópticas .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4.5</b>	<b>Teste de difusão em disco dos biopolímeros ativos.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4.6</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Análise cromatográfica do óleo essencial de canela .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial de canela</b>	<b>29</b>

<b>5.3</b>	<b>MEV.....</b>	<b>30</b>
<b>5.4</b>	<b>FTIR .....</b>	<b>33</b>
<b>5.5</b>	<b>Propriedades Mecânicas .....</b>	<b>36</b>
<b>5.6</b>	<b>Propriedades Ópticas .....</b>	<b>37</b>
<b>5.7</b>	<b>Teste de difusão em disco dos filmes ativos.....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>40</b>
	<b><u>REFERÊNCIAS.....</u></b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As embalagens aplicadas nas indústrias de alimentos têm a função de manter a qualidade do produto durante o armazenamento, transporte e até chegar ao consumidor final, que por sua vez exige alimentos seguros e de alta qualidade, livre de deterioração ocasionada por influências fisiológicas e ambientais. No entanto, em sua maioria, as embalagens são produzidas a partir de polímeros derivados de fontes não renováveis, como o petróleo, que leva centenas de anos para decompor-se.

A palavra polímero origina-se do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição). Assim, um polímero é uma macromolécula composta por muitas unidades de repetições denominadas *meros*, ligadas por ligações covalentes. A matéria prima para a produção de um polímero é o monômero, isto é, o *mero* (CANEVAROLO JR., 2006). Os polímeros podem ser divididos quanto a sua natureza, em sintéticos (polimetacrilato de metila (acrílico), poliestireno, policloreto de vinila (PVC), polietileno (PE) e polipropileno (PP) ou naturais (borracha, os polissacarídeos (amido, celulose e glicogênio) e as proteínas.)). Os biopolímeros são materiais poliméricos de origem natural e abundantes, seus produtos de degradação são biocompatíveis e não tóxicos, o que os torna seguros para utilização na constituição de biomateriais. Além disso, apresentam custo acessível e são obtidos de fontes renováveis. A aplicação em embalagens é um avanço na indústria de alimentos, pois reduz os resíduos gerados, e traz uma alternativa econômica.

A derivação de proteínas de fonte animal é uma das formas de obtenção dos biopolímeros. Dentre estes, o soro de leite, um coproduto da indústria de laticínios com alto valor nutricional e proteico, e ampla variedade de aplicações. A definição do soro de leite é apresentada como sendo um produto lácteo líquido extraído da coagulação do leite utilizado no processo de fabricação de queijos, caseína alimentar e produtos similares. As embalagens obtidas dos materiais à base desses biopolímeros apresentam deficiências e certa fragilidade, por exemplo, baixa resistência à tração e perfuração. Uma maneira de resolver este problema é a utilização de nanotecnologia, através das nanofibras que é uma classe entre os nanomateriais.

As nanofibras de celulose são obtidas a partir de diversos materiais celulósicos como o eucalipto, algodão, beterraba, banana, cana de açúcar, e até mesmo como produto do metabolismo de certas bactérias. Podem ser extraídas por meio da hidrólise ácida, onde se

originam estruturas puramente cristalinas, chamadas na literatura de *whiskers* de celulose, ou ainda por meio do processamento mecânico que podem incluir metodologias de cisalhamento, microfluidização, ultrassom, dentre várias outras, e que vão originar estruturas de nanocelulose que apresentam regiões cristalinas e amorfas (BUFALINO, 2014).

Para formação de uma embalagem para assegurar que a perda da qualidade dos alimentos seja retardada, tem crescido o uso da adição de certos materiais à composição da matéria-prima base, ou seja, compostos químicos adicionados ao polímero que auxiliarão na melhoria das propriedades físico-químicas dos biopolímeros.(BRITO et al., 2011; RHIM; PARK; HA, 2013a) Para esses compostos, os óleos essenciais, que são naturais e voláteis, têm sido amplamente estudados e adicionados na matriz polimérica, para assegurar a qualidade dos produtos alimentícios, auxiliando ao combate de deterioração (ação antioxidante) e contaminação por bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA) tornando assim uma embalagem de fonte renovável e ativa(ANDRADE et al., 2014; KOKETSU et al., 1997; LIMA et al., 2021). O óleo essencial de canela é composto majoritariamente por aldeído cinâmico e eugenol, que combatem a microrganismos de deterioração, incluindo bactérias, leveduras e fungos, e microrganismos patogênicos (FIGUEIREDO et al., 2018).

Frente à problematização ambiental e de segurança dos alimentos exposta, esta pesquisa justifica-se pela possibilidade de desenvolvimento de biopolímeros de fonte renováveis quando combinados com compostos ativos e estruturas de reforço, que servirá para possíveis aplicações industriais, minimizando assim os impactos ambientais causados por polímeros convencionais e revolucionará as indústrias e produções de embalagens.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar biopolímeros de isolado proteico de soro de leite (IPS) incorporado com óleo essencial de canela (OEC) e nanofibras de celulose (NFC) quanto às propriedades antimicrobianas "*in vitro*" e físico-químicas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar o composto majoritário (cinamaldeído) do OEC;
- Quantificar a concentração mínima inibitória do OEC frente às bactérias *Listeria innocua* e *Escherichia coli*;
- Desenvolver biopolímeros de IPS incorporado com OEC e NFC;
- Caracterizar os biopolímeros desenvolvido com relação às propriedades morfológicas (MEV), estruturais (FTIR), mecânicas (testes de tração e perfuração), cor (CIELab) e avaliar a ação antimicrobiana.

### 3 REFERENCIAL TEORICO

#### 3.1 Polímeros Biodegradáveis

O termo polímero foi criado pelo químico Jöns Jacob Berzelius em 1832 e o nome utilizado para diferenciar moléculas orgânicas que possuíam os mesmos elementos químicos. Já a indústria dos polímeros foi patenteada por Charles Goodyear e Thomas Hancock, onde iniciaram-se aplicações com polímeros e desde então vêm sendo utilizados para diversas finalidades passando a ser usado como é conhecido hoje (BARTOLOMEI, 2020; HAGE JUNIOR, 1998).

Os polímeros são complexos e de alta massa molecular, estão presentes na humanidade há muito tempo e é muito comum no nosso dia a dia, como por exemplo, nas embalagens, brinquedos, automóveis, eletrodomésticos, roupas e vários outros objetos. A palavra polímero origina-se do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição). Com isso, definimos polímero sendo uma macromolécula composta por milhares de unidades de repetição, que através do compartilhamento de elétrons, buscam a estabilidade e formam as ligações covalentes, através do processo denominado polimerização (CANEVAROLO JR., 2002; DE CASTRO; CAVALCANTE; PEDROSA, 2019).

A classificação dos polímeros quanto a sua natureza pode ser realizada em dois grandes grupos: polímeros naturais (aqueles que encontramos na natureza como, por exemplo, as proteínas, os polissacarídeos, os ácidos nucleicos, o amido, o látex, as madeiras e o algodão) e polímeros sintéticos (produzidos artificialmente e que são derivados de combustíveis fósseis, como por exemplo, o petróleo, o poliestireno, o náilon, o polietileno e o polipropileno) (DE CASTRO; CAVALCANTE; PEDROSA, 2019).

Segundo Rhim, Park, Ha (2013), os polímeros sintéticos convencionais são produzidos a partir de derivados do petróleo, um recurso natural não renovável, e apresentam diversos problemas ambientais decorrentes principalmente de sua difícil degradação, podendo levar centenas de anos. No entanto, seu uso pela sociedade está intensificado devido às suas propriedades, como resistência mecânica, leveza, inércia química e baixo custo de produção e processamento. Como falado, a produção de polímeros sintéticos está ligada ao uso de derivados de petróleo, sendo esse sua matéria-prima principal, no qual passará por alguns processos até chegar à polimerização e ser transformado em plásticos que utilizamos

diariamente. Sendo assim observamos grandes impactos ambientais causados pelos processos de extração e refino utilizados para produção dos polímeros provenientes do petróleo, a escassez do petróleo e o aumento do seu preço (BRITO et al., 2011).

Para a produção de embalagens destina-se aproximadamente 40% da produção dos polímeros, sendo que metade desta produção é destinada para embalagens de alimentos. Com o processo de descarte limitado, os danos ambientais e o esgotamento dos recursos naturais causados por embalagens plásticas convencionais torna-se necessário buscar alternativas sustentáveis de produção, onde entra o desenvolvimento de biopolímeros ou plásticos biodegradáveis (ALBUQUERQUE, 2019; RHIM; PARK; HA, 2013).

Os polímeros biodegradáveis são materiais poliméricos abundantes e seus produtos de degradação são biocompatíveis e não tóxicos, o que os torna seguros para utilização na constituição de biomateriais. Em condições apropriadas de temperatura, umidade e oxigênio, e na presença de microrganismos, a biodegradação leva à fragmentação ou desintegração dos plásticos sem resíduos tóxicos ou perigosos (ALBUQUERQUE, 2019; RHIM; PARK; HA, 2013). Os polímeros biodegradáveis quando são submetidos à compostagem, obtém-se um material rico em carbono e que pode retornar ao solo com efeitos benéficos, o que é conhecido por reciclagem biológica (MEDEIROS, 2011; ROSA, S. DEMERVAL; PANTANO FILHO, 2003)

Os polímeros biodegradáveis podem ser derivados de fontes naturais renováveis produzidas em larga escala no Brasil, como por exemplo, o milho, celulose, batata e cana de açúcar; podem ser sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas como o ácido butírico ou o ácido valérico dando origem ao polihidroxibutirado - PHB e ao polihidroxibutirato-co-valerato (PHB-HV), respectivamente; ou até mesmo serem derivados de fonte animal, como a quitina, a quitosana ou proteínas. Os polímeros biodegradáveis também podem ser obtidos de fontes fósseis, petróleo, ou da mistura entre biomassa e petróleo. Os polímeros biodegradáveis do petróleo mais conhecidos são as policaprolactonas (PCL), as poliésteramidas, os copoliésteres alifáticos e os copoliésteres aromáticos (BRITO et al., 2011; LENHANI, 2019).

Para reduzir os impactos ambientais decorrentes do acúmulo de plásticos de polímeros sintéticos, pesquisas estão em desenvolvimento para a produção de embalagens oriundas de polímeros a partir de fontes renováveis e que se degradam com o tempo, através de mecanismos naturais (ARAÚJO et al., 2021; MEDEIROS, 2011; MONTES, 2013). Os

plásticos biodegradáveis, assim como os polímeros biodegradáveis, podem ser degradados com velocidade maior ao compararmos com o sintético, que é dada pela ação de microrganismos, como bactérias e fungos. O interesse nesses plásticos tem crescido nos últimos anos, sendo que a biodegradação é uma solução muito promissora, pelo fato de ser menos agressiva ao meio ambiente, além de completar o ciclo de carbono e do nitrogênio (Medeiros & Lima 2011).

### **3.2 Isolado proteico de soro de leite**

Na composição média do leite aproximadamente 85% é de água e o restante é de sólidos. Alguns estudos apontam que a proteína corresponde 3,5% do total dos sólidos, ficando atrás somente das gorduras, sendo que após o processamento dos produtos lácteos grande porcentagem de proteína permanece no soro do leite, que é um coproduto do processo de fabricação (POISSON, 2020). Do ponto de vista nutricional, as proteínas do leite possuem aminoácidos essenciais, portanto são consideradas de alto valor biológico. Aproximadamente 80% das proteínas correspondem à caseína e 20% às proteínas do soro do leite. Entre as caseínas, encontra-se  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseínas e entre proteínas do soro são encontradas  $\alpha$ -lactoglobulina,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina e várias proteínas menores com diferentes tipos de atividades como enzimas, propriedades de ligação mineral e imunoglobulinas, (CARVALHO, 2016; MOHANTY et al., 2016; POISSON, 2020).

Quando entramos no assunto produção de derivados lácteos, existem algumas avaliações práticas nas quais identificaram que, para cada quilo de queijo produzido, são gerados 9 kg de soro de leite (PINHEIRO ALVES et al., 2014). Seguindo o fluxo inadequado o soro produzido nas indústrias de derivados lácteos seria incluído em descarte de processo podendo assim cair com o efluente da indústria e, conseqüentemente, em rios, mares e esgoto, causando um grande problema ambiental, como por exemplo o aumento da alta taxa de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) que esse material apresenta e também a turbidez da água (GONTHIER et al., 2013; NUNES et al., 2018). O soro de leite pode ser obtido pelo processo de coagulação enzimática (enzima quimosina), resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos e no soro “doce”, além disso, pode ser obtido pela precipitação ácida no pH isoeletrico, resultando na caseína isoeletrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido e como terceira opção. O soro de leite pode ser obtido através da

separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado proteico (SGARBIERI, 2004).

A Portaria de número 94/2020 (MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa agropecuária) aprova o “Regulamento técnico que fixa os padrões de identidade e qualidade para o soro de leite e o soro de leite ácido” e define soro de leite, como sendo “o produto lácteo líquido extraído da coagulação do leite utilizado no processo de fabricação de queijos, caseína alimentar e produtos similares” (BRASIL, 2020). O artigo 8º desta portaria define os produtos de acordo com as características sensoriais de consistência, cor, sabor e odor. A consistência poderá apresentar-se na forma líquida, viscosa ou em pó e coloração branca, amarelada ou esverdeada. Quando o produto apresentar sua consistência líquida ou concentrada sua cor tenderá a branca, já com consistência em pó apresentará na cor creme, o odor e sabor, são característicos e ligeiramente adocicados ou salgado sendo ligeiramente ácido, no caso do soro de leite ácido (BRASIL, 2020).

O potencial nutricional do soro de leite foi estudado por alguns pesquisadores, onde pode ser encontrada uma grande variedade de macro e micronutrientes como carboidrato (lactose), lipídeos, proteínas, cálcio, magnésio e vitaminas do complexo B, tornando-o assim um produto alimentício de alto valor nutricional e propriedades funcionais tecnológicas desejáveis como solubilidade, emulsificação e formação de espuma (CARVALHO, 2016; HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

O soro de leite na forma isolada e em pó esta sendo bastante estudado e alguns pesquisadores relatam sua boa formação de filmes e revestimentos comestíveis, apresentando-se uma alternativa para produção de embalagens alimentares devido a características de transparência, barreira à umidade, barreira a gases, barreira a aromas, além da característica de uma embalagem ativa quando incorporados agentes ativos (Azevedo 2013; Azevedo et al. 2015; Carvalho et al. 2018; Ferreira 2014).

### **3.3 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais (OE) são compostos presentes naturalmente nas plantas, possuem consistência líquida volatilidade, odor e cor característicos e são imiscíveis em água. Eles atuam em funções biológicas importantes à sobrevivência das plantas relacionadas aos

mecanismos de defesa, como a proteção contra excesso de ultravioleta, microrganismos, insetos e animais (REIS et al., 2020).

A formação do óleo essencial é a partir de metabólitos secundários de plantas de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, terpenos, fenilpropanonas e álcoois aldeidados, podendo ser extraídos por diversos métodos, como por exemplo, a hidrodestilação, a destilação a vapor, a extração por solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico e outros (ALMEIDA, J; ALMEIDA, P; GHERARDI 2020; FIGUEIREDO ET AL. 2018).

A canela (*Cinnamomum sp*) tem sido amplamente utilizada como especiaria, bem como na medicina tradicional à base de ervas em todo o mundo e tem uma longa história de uso como tempero e agentes aromatizantes. Os constituintes químicos mais importantes da canela são os óleos voláteis (cinamaldeído, eugenol e ácido cinâmico). Segundo Koketsu et al. (1997) tem-se no óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) a presença do aldeído cinâmico (55%), seguido do eugenol (12%).

Os óleos essenciais são substâncias naturais que atualmente ganham destaque como agentes antimicrobianos associados às embalagens para alimentos, são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) como aditivo alimentar e têm sido amplamente utilizados nas indústrias alimentícias em aplicações de sorvetes, doces, bebidas. O cinamaldeído possui atividade antimicrobiana além de ser considerado de baixa toxicidade (FIGUEIREDO et al., 2018; MONTES, 2013).

### **3.4 Nanofibras de celulose**

A nanotecnologia está presente de diversas maneiras e nas diversas áreas como a engenharia de materiais e elétrica, medicina, biologia e várias outras, prometendo revolucionar muitos aspectos da ciência e da indústria com grande potencial de aplicações (Leopoldo & Vechio 2020).

As nanofibras é uma classe entre os nanomateriais, e são estruturas que apresentam o diâmetro, em uma dimensão menor que 1  $\mu\text{m}$ , enquanto seu comprimento pode alcançar alguns metros. O prefixo “nano”, deriva do grego “nanos”, que significa “anão”, sendo assim, a escala nanométrica é compreendida de 1 a 100 nanômetros (nm) que é unidade de medida de comprimento que corresponde a um bilionésimo de metro ou  $10^{-9}$  metros. Isso implica em alterações nas propriedades químicas, físicas e mecânicas, conferindo propriedades

particulares, como alta área de superfície, por seus pequenos diâmetros e pelo fato das mantas de nanofibras serem altamente porosas com elevada interconectividade da rede formada, podendo apresentar ainda excelentes propriedades mecânicas, dependendo do polímero utilizado (ALMEIDA; BENTES; CORREA JUNIOR, 2021; JACOBI, 2004).

As nanofibras podem ser produzidas dos polímeros poli ácido láctico (PLA), eucalipto, algodão, beterraba, banana, cana de açúcar e pela ação bacteriana, tornando assim uma obtenção de baixo custo e muito promissora (JONOOBI et al., 2015). Esses materiais são tidos como lignocelulósicos, e são compostos por três polímeros associados entre si: celulose, hemicelulose e lignina.

A celulose é um polímero de cadeia linear formado por dissacarídeos (açúcares hidrolisáveis) repetitivos, que quimicamente são chamados de celobiose. Na sua forma natural a função da celulose é oferecer proteção às células vegetais, com fortes ligações de hidrogênio e grupos de hidroxilas (ARAÚJO et al., 2013; BUFALINO, 2014).

Um dos processos de extração das nanofibras é por meio da hidrólise ácida, que ocorre na presença de um ácido mineral em solução aquosa, ocorrendo através da quebra de moléculas em unidades pequenas conhecidas como *whiskers* de celulose (EICHHORN et al., 2010). Outra maneira de obtenção é por meio do processamento mecânico que podem incluir metodologias de cisalhamento, microfluidização, sonificação, dentre várias outras, e que vão originar estruturas de nanocelulose que apresentam regiões cristalinas e amorfas (BUFALINO, 2014).

Diversos estudos têm demonstrado a eficiência da adição de nanofibras de celulose a polímeros biodegradáveis com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e de barreira, devido principalmente à alta interação que essas nanopartículas apresentam com a matriz polimérica dos filmes, sendo necessário a adição de concentrações baixas e suficientes para se obter bons resultados (ALBUQUERQUE, 2019; CARVALHO et al., 2018; DE AMORIM et al., 2020; JAHED et al., 2017; KANMANI; RHIM, 2014; NUNES, 2014; SLAVUTSKY; BERTUZZI, 2014).

### **3.5 Embalagens para alimentos e suas propriedades**

A embalagem para um alimento desempenha funções de conter, proteger, comunicar e conferir conveniência, nas etapas de armazenamento e distribuição. É também veículo de

informação, apresentando instruções de manuseio, composição nutricional e rotulagem (SOUZA; MOURA; SILVA, 2017). Além da atratividade e a facilitação na transação das mercadorias, as embalagens também precisam permitir a conservação do produto até o receptor final, garantindo o mínimo de perdas, e sendo esta sua real finalidade, o que consentiu o aumento na segurança pela não contaminação por micro-organismos e o contato com fatores ambientais (FREIRE et al., 2020; LANDIM et al., 2016).

Comumente, as embalagens para alimentos são produzidas com materiais inertes os quais possuem pouca interação com o alimento que acondicionam afim de não favorecer a formação de reações capazes de interferir na qualidade do produto. Essas reações podem resultar em perdas que estarão relacionadas não apenas com as características da embalagem, mas também com a composição e condições de estocagem do produto (AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000).

Com o avanço da tecnologia e das exigências de mercado e consumidores, o setor de embalagens numa indústria precisará caminhar para apresentar embalagens que superem as expectativas e tragam melhorias, como por exemplo, o aumento na vida de útil, praticidade, segurança alimentar, informações claras e que comuniquem com o consumidor. Alguns tipos de embalagens são bastante discutidos na atualidade, como por exemplo, as embalagens “ativas” e “inteligentes”, revestimentos comestíveis e outras, onde suas aplicações são cada vez mais estudadas. Segundo CORNALL (2018), o mercado de embalagem ativa e inteligente (A&IP) está crescendo rapidamente, com estimativas recentes projetando que este mercado valerá US\$ 52 bilhões até 2025.

Essas embalagens possuem propriedades que interagem diretamente com o produto, mudando a condição de acondicionamento do alimento proporcionando estender sua vida de prateleira ou aumentar sua segurança ou propriedades sensoriais, mantendo a qualidade do produto.

As embalagens ativas trabalham com mecanismos que interagem buscando conter os fatores que atingem a qualidade do produto, contribuindo para sua degradação. Essas embalagens procuram corrigir limitações das embalagens convencionais (AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000). São exemplos de embalagens ativas: absorvedores de oxigênio; absorvedores de etileno; eliminadores de CO<sub>2</sub>; emissores de CO<sub>2</sub>; enzimas; controladores de umidades; controladores de sabor; controladores de odor; agentes antimicrobianos;

antioxidantes; liberadores de etanol; preservadores de cor; revestimentos comestíveis; e materiais autorresfriantes ou autoaquecedor (SANTOS; BEATRIZ; OLIVEIRA, 2012).

Quando denominamos uma embalagem com propriedades ativas, associamos à incorporação de substâncias ou materiais (bio) ativos às embalagens ou uso de sachês ao sistema. Sendo assim, as condições de acondicionamento do alimento são alteradas e as propriedades de permeação e/ou concentração dos gases no “headspace”, ou seja, um espaço entre o alimento e a embalagem (HAN et al., 2006; LEE; RAHMAN, 2014).

A incorporação de substâncias naturais como lipídios, óleos essenciais e óleos resinosos (ou vegetais), para promover a bioatividade (antimicrobianos e antioxidantes) nas embalagens para alimentos, vem sendo estudada no meio acadêmico-científico, principalmente na elaboração de filmes e revestimentos (AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000; OLIVEIRA, 2011). A oxidação de produtos alimentícios pode ser reduzida pela adição de antioxidantes a esses materiais de embalagens biodegradáveis, como por exemplos os óleos essenciais, que atualmente ganham destaque também como agente antimicrobiano associado às embalagens para alimentos (BOTREL et al., 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Embalagens e Encapsulação alocado no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras no estado de Minas Gerais.

Os filmes foram obtidos a partir de Isolado Proteico de Soro de Leite, que foi fornecido pela empresa Doremus Alimentos LTDA.

As cepas de *Escherichia coli* e *Listeria innocua* utilizadas, pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (UFLA).

O óleo essencial de canela, fornecido pela Ferquima e glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

As nanofibras de celulose (NFC) foram cedidas pelo Departamento de Engenharia Florestal – UFLA. A NFC foi obtida por meio da agitação mecânica de uma solução contendo 1% de polpa branqueada comercial de eucalipto em água destilada durante 20 minutos com posterior desfibrilação realizada com 30 passagens em moinho Super Mass Coloider (Masuko®, Japão), obtendo-se, assim, obtendo-se, assim, uma suspensão de nanofibra de celulose com teor de sólidos de 1,76% (p/v). A nanofibra apresentou diâmetro médio de aproximadamente 25nm, medido por microscopia eletrônica de transmissão, conforme descrito por Bufalino (2014).

### 4.1 Análise cromatográfica do óleo essencial de canela

A análise de cromatografia gasosa (CG) foi realizada na Central de Análises e Prospecção Química alocada no Departamento de Química da UFLA, com o objetivo de quantificar os teores do composto majoritário (cinamaldeído) no OEC, de acordo com (GUIMARÃES et al., 2011), com algumas modificações. Para esta análise, foi utilizado o equipamento Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GC-2010 (Kyoto, Japão) equipado com detector por ionização de chamas, com condições de operação: coluna RTX-5MS, temperatura do injetor de 250°C, programação da coluna com temperatura inicial de 40°C, sendo acrescidos 15°C/min até se atingir 300°C, gás carreador (fase móvel) hélio, taxa de split

1:10, e volume de injeção de 1µL. Para a quantificação do cinamaldeído, uma curva padrão com diferentes concentrações conhecidas das substâncias foram obtidas, com utilização dos padrões cinamaldeído (Sigma-Aldrich, 99,5% de grau de pureza).

#### **4.2 Determinação da concentração mínima inibitória do óleo essencial de canela**

Para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), a cultura estoque de *Listeria innocua* e *Escherichia coli* foram ativadas e armazenadas segundo (OLIVEIRA, 2011), utilizando Tryptic Soy Broth (TSB) e TSA suplementado com 0,6 % de extrato de levedura (YE) para *Listeria innocua* e *Escherichia coli*, respectivamente. A suspensão das células foi feita em solução de NaCl a 0,85% onde a turbidez do inócuo foi ajustada com a da solução padrão de McFarland 0,5 ( $1 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup>). As CMI's do óleo essencial de canela foram determinadas empregando-se a técnica de micro diluição em caldo (TSB + TWEEN 80 0,5%) de acordo com a metodologia NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003). Cavidades com meios de culturas e sem inóculo foram consideradas controle. Após o período de incubação realizou-se uma leitura visual em que o meio de cultura que turvou foi considerado com crescimento de bactéria. A menor concentração que resultou em completa inibição do crescimento bacteriano foi considerada CMI.

#### **4.3 Desenvolvimento dos biopolímeros ativos**

Os biopolímeros ativos foram desenvolvidos utilizando o método *casting* (evaporação do solvente). Isolado Proteico de Soro de Leite (IPS), 7,5 g (m/v) que foi dissolvido em 55 ml de água destilada e 30% de glicerol em 70 mL de água destilada, submetendo-os separadamente à agitação magnética (PHOX; Modelo MS-HS; Colombo, Paraná, Brasil) durante 30min, em temperatura ambiente. Após agitação, verteu-se as soluções uma na outra e continuou a agitação durante 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, o pH foi ajustado para 8 com NaOH 2N e a solução final foi submetida a homogeneizador ultrassônico (Sonifier Cell Disruptor Branson – Model 450D, Manchester,UK) durante 10 min, com potência de 80 W/25°C. Aqueceu a solução a 90 °C por 30 min em banho-maria. O aquecimento da proteína é essencial para a formação de ligações de dissulfeto intermoleculares para auxiliar o

estabelecimento de uma estrutura de rede polimérica reticulada (AZEVEDO et al., 2015; ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2009). A solução foi resfriada a temperatura ambiente e vertida em placas de vidro de dimensões de 18 x 30 cm.

Para os filmes adicionados de nanofibras de celulose (NFC), as fibras foram adicionadas juntamente com o glicerol e a concentração de NFC foi estabelecida com base em pré-testes feitos a partir de estudos publicados (CARVALHO et al., 2020; SANTOS et al., 2021).

Para os filmes ativos, o óleo essencial foi adicionado após o banho-maria para preservar os constituintes do OEC (ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2009). Após a adição do óleo essencial, a solução filmogênica foi homogeneizada em equipamento Ultraturrax (T 25, Ika-Werke, Alemanha) por 4 minutos (10000 rpm). As concentrações de OEC foram definidas em 0, 5, 10 e 30% considerando os resultados das análises de CMI. A Tabela 1 apresenta os filmes desenvolvidos e suas respectivas concentrações.

Tabela 1 - Concentração de OEC e NFC e identificação dos filmes.

Filmes	OEC (%)	NFC (%)
OEC <sub>0</sub> NFC <sub>0</sub>	0	0
OEC <sub>5</sub> NFC <sub>0</sub>	5	0
OEC <sub>10</sub> NFC <sub>0</sub>	10	0
OEC <sub>30</sub> NFC <sub>0</sub>	30	0
OEC <sub>0</sub> NFC <sub>1</sub>	0	1
OEC <sub>5</sub> NFC <sub>1</sub>	5	1
OEC <sub>10</sub> NFC <sub>1</sub>	10	1
OEC <sub>30</sub> NFC <sub>1</sub>	30	1

Fonte: Do autor (2021).

Para todos os filmes, o controle de espessura foi feito pelo volume aplicado nas placas, que correspondeu a 110 mL. Os filmes foram secos em temperatura ambiente durante 48 horas garantindo evaporação lenta do solvente e formação do filme (AZEVEDO et al., 2015).

## **4.4 Caracterização dos filmes**

### **4.4.1 MEV**

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Microestrutural (LME) da UFLA, com auxílio de um microscópio LEO EVO 40 XVP (Zeiss, Cambridge, Inglaterra), com voltagem de aceleração de 20 kV. As amostras dos filmes apresentavam aproximadamente 2x2mm e anterior à análise, foram fixadas a stubs por fita adesiva dupla face de carbono, e revestidas por banho de ouro sob vácuo (metalização).

### **4.4.2 FTIR**

Para determinar as possíveis interações estruturais, ou seja, os grupos funcionais e as ligações químicas dos compostos utilizados na matriz polimérica e avaliar mudanças estruturais decorrentes de diferentes tratamentos foram obtidos espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), que foi realizada em espectrômetro FTS 3000 Excalibur Digilab (Estados Unidos), equipado com detector KBr, faixa espectral de análise de  $4000 - 900 \text{ cm}^{-1}$ , número de scans de 64 e resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

### **4.4.3 Análises propriedades mecânicas**

Para tornar os biopolímeros ativos capazes de competir com os polímeros convencionais, como o polietileno ou polipropileno, há necessidade de se melhorar suas propriedades mecânicas. As propriedades de tração dos biopolímeros desenvolvidos, como a resistência à tração (RT), alongamento na ruptura (AL) e o módulo de elasticidade (ME), foram mensuradas conforme método padrão D882-02 (ASTM, 2002), em um analisador de textura (Stable Microsystems, modelo TATX2 i, Inglaterra) com célula de carga de 1 kN. As amostras foram cortadas em tiras ( $100 \times 10 \text{ mm}$ ) e a separação inicial entre as garras será de 50 mm com velocidade de 50 mm/min. A resistência à tração (RT, MPa) foi calculada dividindo a carga máxima pela área da seção transversal. O módulo de elasticidade (ME, MPa) é definido pela inclinação da parte linear do diagrama de tensão-deformação.

O teste de punctura foi realizado utilizando um analisador de textura (Stable Microsystems, modelo TATX2i, Inglaterra). As amostras foram cortadas em quadrados de 9 cm<sup>2</sup> de área e fixados em um suporte com orifício central (2,1 cm de diâmetro). Uma sonda esférica de 5,0 mm de diâmetro (sonda A/TG) deslocou-se perpendicularmente à superfície da película a uma velocidade constante de 0,8 mm/s até a sonda passar através da amostra. A resistência à punctura/ espessura (N/mm) foi calculada dividindo o valor da força no ponto de ruptura pela espessura do filme para eliminar o efeito da variação da espessura (PARK; ZHAO, 2004) e a deformação (mm) dos filmes foi determinada no ponto de ruptura.

#### 4.4.4 Propriedades ópticas

A cor dos compósitos é um atributo determinante para avaliar sua aplicação, na qual cada demanda terá sua particularidade. Para determinação da cor dos compósitos, foi utilizado colorímetro Color Quest XE, Hunter Lab (Reston, VA, USA) e sistema CIE (L\*, a\*, b\*) com uma fonte de luz D65, ângulo observador de 10° e modo refletância. Foram analisados os parâmetros: (L\*, a\*, b\*), ângulo hue (h°) e índice de saturação chroma (C\*).

A transparência dos biopolímeros foi medida a porcentagem de transmitância (%T) a 600 nm usando um espectrofotômetro GBC UV/VIS 918 (Shimadzu, Tokyo, Japão) conforme método D1746, (ASTM, 2003). A transparência (T600) foi calculada pela equação:

$$T600 = \frac{(\text{Log } \%T)}{\delta}$$

Em que  $\delta$  é a espessura do filme (mm).

#### 4.4.5 Teste de difusão em disco dos biopolímeros ativos

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (BARRY, A. L.; THORNSBERRY, 1991; OSTROSKY et al., 2008). O efeito antimicrobiano dos compósitos incorporados com óleo essencial de canela foi avaliado através da análise de Difusão em Disco (NCCLS, 2003), adaptada.

Somente os tratamentos sem adição de nanofibras foram selecionados para avaliação antimicrobiana, embasado no pressuposto literário do poder antimicrobiano do óleo essencial de canela, limitando o número de amostra devido à complexidade da análise.

Discos de 35 mm de diâmetro dos biopolímeros ativos contendo as diferentes concentrações de óleo essencial foram depositados em superfícies de Agar TSA (tryptic soy ágar) inoculados com culturas de *E. coli* e também em superfície de TSA+YE (tryptic soy ágar + extrato de levedura) com *L. innocua* na concentração de 10<sup>6</sup> UFC/ml. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Os halos de inibição formados foram mensurados com auxílio de paquímetro (BARRY, A. L.; THORNSBERRY, 1991).

#### **4.4.6 Análise Estatística**

Os resultados das análises mecânicas, antimicrobianas, parâmetros colorimétricos e transparência foram obtidos em triplicata e três repetições. Nestes casos, a análise estatística dos resultados da caracterização foi realizada por análise de variância (ANOVA), por meio do software SISVAR ( $p < 0,05$ ), e as médias comparadas pelo teste de Tukey. A análise descritiva de FTIR foi possível através da plotagem das curvas usando o software Origin® 9.0.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Análise cromatográfica do óleo essencial de canela**

Análise cromatográfica aplicada em óleos essenciais desempenha papel importante na identificação das substâncias que os compõe sendo capaz de classificá-los pela majoritariedade de substâncias presentes. A concentração encontrada do composto (E)-cinamaldeído no OEC foi de 98,29%, composto considerado majoritário justificado por sua alta concentração.

Os resultados obtidos são próximos aos encontrados por Andrade et al. (2012), que na análise de óleo essencial da casca seca de *Cinnamomum zeylanicum* identificaram 14 constituintes sendo o (E)-cinamaldeído com 77,72% comprovando sua maior concentração perante o acetato de (E)-cinamila com 5,99% e o monoterpenóide 1,8- cineol com 4,66%. Os

autores relataram também que OEC foi o mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano, podendo estar relacionado com a presença do componente majoritário aldeído cinâmico em elevada concentração.

Singh et al. (2007) encontraram (E)-cinamaldeído a 97,7%. Esses dados concordam com os obtidos neste estudo em relação ao elevado teor de (E)-cinamaldeído na composição do óleo essencial de canela.

Na análise por cromatografia gasosa, Probst (2012) encontrou como composto presente em maiores quantidades o cinamaldeído com concentração de 86,31%.

Em um estudo que avaliou a influência dos óleos essenciais de cravo, canela e laranja na preparação de filmes de poli (ácido lático) no desenvolvimento de embalagens ativas, Lima et al. (2021) encontraram valores consideráveis de cinamaldeído (67,05%), trans-cinamaldeído (13,01%) e Cinamil éster (6,12%), dados também corroborativos ao presente trabalho.

## **5.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial de canela**

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a concentração mínima inibitória do óleo essencial de canela frente à bactéria *Listeria innocua*, foi de 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  na diluição de 0,125%, já para a bactéria *Escherichia coli* foi obtido uma CMI de 31,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  na diluição de 0,062%, conforme pode-se observar na Tabela 2.

Os óleos essenciais em sua maioria possuem características hidrofóbicas, os quais conseguem penetrar na membrana celular e nas camadas lipídicas aumentando os prótons ali ligados e causando a morte da célula bacteriana (KOKETSU et al., 1997; LIMA et al., 2021; MONTES, 2013)

Park e Zhao (2004) observaram efeito antimicrobiano associado ao cinamaldeído, que é o princípio ativo do óleo essencial de canela para os mesmos microrganismos estudados neste trabalho.

Oussalah, Caille e Lacroix (2006) ao estudarem a atividade antimicrobiana de 28 óleos essenciais sobre *E. coli* e *L. innocua*, obtiveram resultado positivo para os diversos óleos essenciais inclusive o de canela e atribuíram à presença do cinamaldeído.

Tabela 2 - Concentração mínima inibitória do óleo essencial de canela.

Bactéria	Gram	CMI ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
<i>E.Coli</i>	-	31,25
<i>L. Innocua</i>	+	62,5

Fonte: Do autor (2021).

O óleo essencial de canela é muito promissor e eficiente na inibição de bactérias gram positivas e gram negativas, sendo que foi possível obter valores bem altos de CMI (0,23 mg/ml) na avaliação da atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico realizado por Probst (2012) utilizando diversas bactérias.

Diversos autores obtiveram resultados positivos para inibição antimicrobiana quando utilizaram o óleo essencial de canela. Andrade et al. (2012), ao estudar a composição, atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*, encontraram CMI para a bactéria *E.coli* de  $15,62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Ugarte (2012), avaliando a atividade antimicrobiana da cobertura comestível de quitosana adicionada com trans-cinamaldeído sobre *Escherichia coli* e *Listeria innocua* em melão minimamente processado, obteve  $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  a  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  para a *E. coli* e  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  a  $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  para *L. innocua*.

### 5.3 MEV

A avaliação morfológica dos filmes de isolado proteico de soro de leite controle e os filmes incorporados com óleo essencial de canela e nanofibras de celulose foram realizadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Figura 1 encontram-se as imagens obtidas da superfície dos filmes, onde os filmes sem nanofibras estão indicados como A, B, C, D e os filmes com nanofibras como E, F, G, e H.

A amostra sem adição de OEC e NFC (A) apresentou-se superficialmente uniforme sem formação de poros e bolhas, comprovando assim uma boa formação dos filmes utilizando as concentrações definidas na formulação.

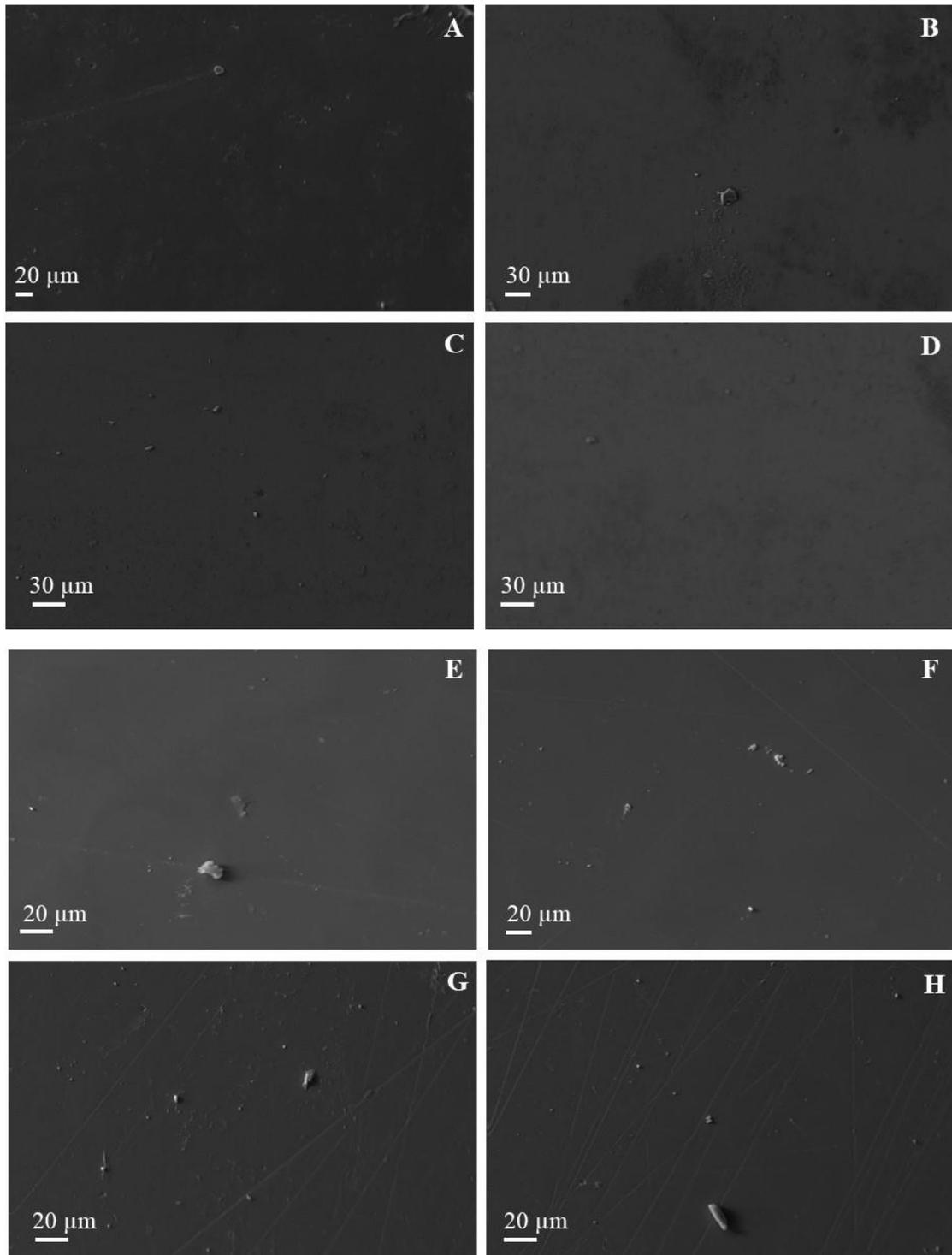
As micrografias com os biopolímeros adicionados de OEC são expressas sendo as micrografias B, C e D nas quais foi possível observar alguns pontos ressaltados, provavelmente devido a possíveis alterações na matriz poliméricas atribuídas à adição de óleo

essencial. Costa et al., (2020), ao estudar óleos essenciais de alho e orégano incorporados em filmes de acetato de celulose observaram uma alteração (porosidade) na matriz do filme sendo característico nos tratamentos com adição de óleo essencial, justificando-se ser decorrente a solubilização parcial do óleo, uma vez que óleos essenciais possuem características hidrofóbicas.

Os filmes de IPS e OEC adicionados de nanofibras de celulose tiveram suas micrografias expressas nas Figuras 1 E, F, G e H. O filme sem adição de OEC (E) apresentou homogêneo, corroborando com o resultado obtido no tratamento  $OEC_0NFC_0$ , sendo o IPS capaz de formar uma boa matriz polimérica.

As micrografias com presença de nanopartículas observam-se alguns pontos de aglomeração de NFC, reduzindo a interação homogênea de NFC ao longo da matriz polimérica de IPS, informações que corroboram com Carvalho et al., (2020) observaram a aglomeração de NFC relacionando a natureza hidrofóbica dos óleos essenciais e a natureza hidrofílica das nanofibras.

Figura 1 - Micrografias de MEV para filmes de IPS adicionados de OEC e NFC  
OEC<sub>0</sub>NFC<sub>0</sub> (A), OEC<sub>5</sub>NFC<sub>0</sub> (B), OEC<sub>10</sub>NFC<sub>0</sub> (C), OEC<sub>30</sub>NFC<sub>0</sub> (D), OEC<sub>0</sub>NFC<sub>1</sub> (E),  
OEC<sub>5</sub>NFC<sub>1</sub> (F), OEC<sub>10</sub>NFC<sub>1</sub> (G), OEC<sub>30</sub>NFC<sub>1</sub> (H).



Fonte: Do autor (2021).

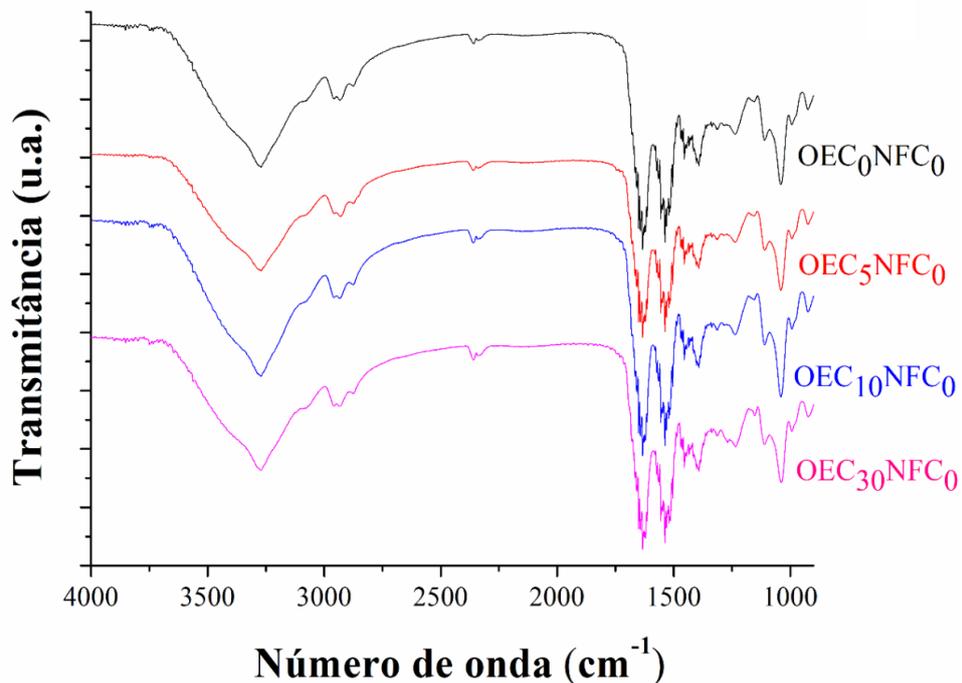
## 5.4 FTIR

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para estudar as possíveis interações entre a matriz polimérica e o óleo essencial bem como as nanofibras de celulose, para caracterização.

O tratamento controle ( $\text{OEC}_0\text{NFC}_0$ ) é composto pela matriz polimérica, o glicerol como plastificante e a água como solvente. Os picos que esse filme possui estão expressos na Figura 2 e são: 3280, 2942, 2865, 1635, 1533, 1456, 1239, 1105, 1041, 995 e 922  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros dos filmes incorporados com diferentes concentrações de óleo essencial de canela sem nanofibras são apresentados na Figura 2.

As ligações químicas de cada pico encontradas na literatura foram na região de 900 a 1150  $\text{cm}^{-1}$  devido à vibração de C-C e C-O característica do glicerol, utilizado como plastificante em todos os tratamentos (CARVALHO, 2016; GUERRERO; DE LA CABA, 2010).

Figura 2 - Espectro de infravermelho dos tratamentos com óleo essencial de canela e sem adição de nanofibras.



Fonte: Do autor (2021).

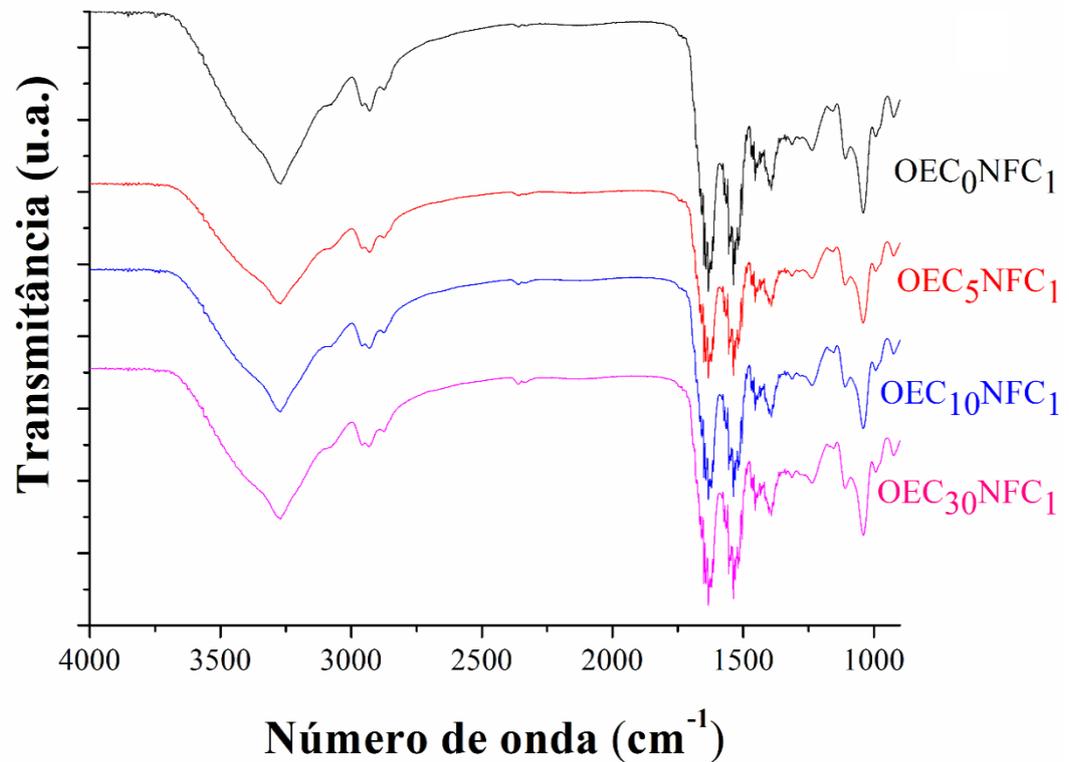
Os picos na faixa de 1200 a 1700  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos a uma combinação de vibração de ligações N–H e N–C (1239  $\text{cm}^{-1}$ ), N–H ligações (1456 e 1533  $\text{cm}^{-1}$ ), e C=O e N-C (1635  $\text{cm}^{-1}$ ), que correspondem às amidas terciárias, secundárias e primárias, respectivamente (CARVALHO et al., 2020; RAMOS et al., 2013). As regiões das amidas primária e secundária estão relacionadas à presença de proteínas com estrutura secundária. Além disso, a ligação intermolecular do tipo  $\beta$  pode ser observada no comprimento de onda de 1635  $\text{cm}^{-1}$  (HAMMANN; SCHMID, 2014).

Na região espectral de 3000 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  foi possível observar uma banda larga com picos em 3280  $\text{cm}^{-1}$  foi formada para todos os tratamentos, sendo justificados pela matriz polimérica composta de isolado proteico de soro de leite, e suas ligações cruzadas de proteínas derivadas a partir de um grau mais elevado de reticulação da rede proteica com cadeias mais próximas umas das outras promovidas por ligações de hidrogênio resultando em menor quantidade de grupos -OH livres (CARVALHO, 2016; LAMAS, 2015; RAMOS et al., 2013).

A adição de OEC foi observada através dos picos 1635, 1456, 1316, 1239, 1041 e 995  $\text{cm}^{-1}$  que são comuns com os picos apresentados pela amostra OEC<sub>0</sub>NFC<sub>0</sub>. Esses picos correspondem às vibrações de alongamento de C=O, C=C e -OH de compostos aromáticos, como aldeídos, fenóis e monômeros de cetona; além de corresponderem também às vibrações C-O do álcool secundário e C–OH. Todas essas estruturas estão presentes no OEC (AMJADI et al., 2021; YANG et al., 2021).

Os espectros dos filmes incorporados com diferentes concentrações de óleo essencial de canela, adicionados de nanofibras são apresentados na Figura 3. A presença da NFC foi observada através dos picos nas regiões 3271, 2971, 1634, 1041 e 922  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 3 - Espectro de infravermelho dos tratamentos com nanofibras ( $\text{OEC}_0\text{NFC}_1$ ,  $\text{OEC}_5\text{NFC}_1$ ,  $\text{OEC}_{10}\text{NFC}_1$ ,  $\text{OEC}_{30}\text{NFC}_1$ ).



Fonte: Do autor (2021).

Sendo a estrutura da nanofibras de celulose composta por grupos hidroxila capazes de se ligarem a outras estruturas e promover o deslocamento desta faixa, ou seja, da banda larga com pico em  $3271\text{ cm}^{-1}$  (AMJADI et al., 2021).

O pico em  $2971\text{ cm}^{-1}$  é característica de estiramento C-H, banda característica da hemicelulose e também da celulose (ABDUL KHALIL et al., 2017; ALEMDAR; SAIN, 2008). Essa banda, assim como a anterior se encontra deslocada em relação às amostras sem a presença de NFC, indicando também a ocorrência de ligações de hidrogênio entre os componentes formadores dos filmes (AMJADI et al., 2021).

O pico de absorção na proximidade de  $1634\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibração das ligações  $\text{CH}_2$ , atribuídos à "banda cristalinidade" da celulose (SHANKAR; REDDY; RHIM, 2015).

A faixa de  $1041\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída por Coelho (2018) à ligação C–O–C correspondente à celulose, hemicelulose ou lignina. Já o pico em  $922\text{ cm}^{-1}$  indica estrutura típica da celulose

correspondente à ligação  $\beta$ -glicosídica (ABDUL KHALIL et al., 2017; ALEMDAR; SAIN, 2008).

## 5.5 Propriedades Mecânicas

A avaliação das propriedades mecânicas é essencial e de extrema importância no desenvolvimento de materiais, sendo que as embalagens devem ser capazes de resistir às tensões externas e manter a integridade durante a sua utilização. Os resultados das propriedades mecânicas obtidas estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados obtidos na análise mecânica dos filmes.

Filmes	RT (MPa)	ME (MPa)	AL (%)	RP (N/mm)	D (mm)
OEC <sub>0</sub> NFC <sub>0</sub>	9,76 ± 0,24 <sup>a</sup>	22,27 ± 2,17 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,93 <sup>a</sup>	66,23 ± 33,17 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,11 <sup>a</sup>
OEC <sub>5</sub> NFC <sub>0</sub>	10,82 ± 1,01 <sup>a</sup>	26,73 ± 4,08 <sup>b</sup>	9,27 ± 1,62 <sup>c</sup>	68,07 ± 39,96 <sup>a</sup>	2,21 ± 0,59 <sup>a</sup>
OEC <sub>10</sub> NFC <sub>0</sub>	12,04 ± 2,24 <sup>ab</sup>	17,97 ± 3,88 <sup>c</sup>	13,50 ± 2,27 <sup>d</sup>	92,07 ± 37,63 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,54 <sup>b</sup>
OEC <sub>30</sub> NFC <sub>0</sub>	84,73 ± 4,28 <sup>d</sup>	14,67 ± 2,09 <sup>c</sup>	16,02 ± 5,18 <sup>de</sup>	108,76 ± 18,14 <sup>a</sup>	3,83 ± 1,67 <sup>b</sup>
OEC <sub>0</sub> NFC <sub>1</sub>	195,81 ± 12,99 <sup>f</sup>	25,04 ± 3,33 <sup>b</sup>	9,18 ± 2,67 <sup>b</sup>	148,10 ± 10,61 <sup>b</sup>	4,48 ± 0,55 <sup>b</sup>
OEC <sub>5</sub> NFC <sub>1</sub>	135,17 ± 7,80 <sup>e</sup>	23,71 ± 3,88 <sup>ab</sup>	6,61 ± 0,80 <sup>b</sup>	132,72 ± 4,71 <sup>b</sup>	4,82 ± 0,14 <sup>b</sup>
OEC <sub>10</sub> NFC <sub>1</sub>	131,39 ± 8,91 <sup>e</sup>	31,95 ± 1,14 <sup>d</sup>	6,64 ± 1,96 <sup>b</sup>	101,42 ± 4,07 <sup>a</sup>	2,21 ± 1,08 <sup>a</sup>
OEC <sub>30</sub> NFC <sub>1</sub>	60,70 ± 1,15 <sup>c</sup>	42,74 ± 3,39 <sup>e</sup>	5,33 ± 0,73 <sup>b</sup>	72,15 ± 30,55 <sup>a</sup>	1,86 ± 1,89 <sup>a</sup>

Médias observadas na coluna com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

As amostras com adição de nanofibras (NFC<sub>1</sub>) apresentaram maiores valores para os resultados de RT (Resistência a Tração), ME (Módulo de Elongação), RP (Resistência à Punctura) e Deformação (D), e menores valores para AL (Alongamento na Ruptura).

Independentemente da presença ou não da nanofibras, ao se aumentar a concentração de óleo essencial de canela ocorreu um aumento nos valores de RT, AL, RP e D e uma diminuição nos valores de ME para as amostras sem presença de NFC (OEC<sub>0</sub>NFC<sub>0</sub>, OEC<sub>5</sub>NFC<sub>0</sub>, OEC<sub>10</sub>NFC<sub>0</sub>, OEC<sub>30</sub>NFC<sub>0</sub>), evidenciando o caráter plastificante do óleo essencial de canela. Mas o comportamento inverso foi observado para as amostras com NFC (OEC<sub>0</sub>NFC<sub>1</sub>, OEC<sub>5</sub>NFC<sub>1</sub>, OEC<sub>10</sub>NFC<sub>1</sub>, OEC<sub>30</sub>NFC<sub>1</sub>). Este fato demonstra que a presença das nanofibras afetou o efeito plastificante do OEC (AZEVEDO et al., 2015; PONTES, 2013).

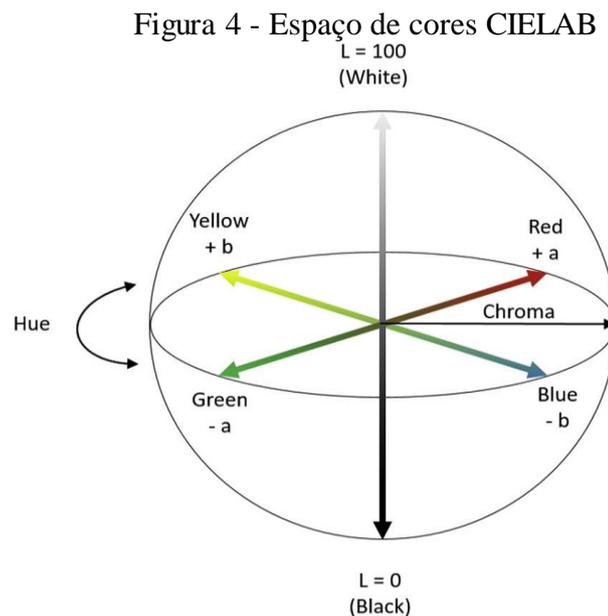
Os tratamentos com 30% de OEC (OEC<sub>30</sub>NFC<sub>0</sub> e OEC<sub>30</sub>NFC<sub>1</sub>) apresentaram resultados que indicam que há um nível máximo de adição de OEC capaz de contribuir para a formação de uma estrutura mais resistente. Silveira (2019) em seu estudo também presenciou

esse comportamento, à medida que se aumenta o nível de óleo a matriz perde sua homogeneidade, tornando-se mais frágil.

## 5.6 Propriedades Ópticas

O diagrama de espaço de cores CIELAB ou CIE  $L^*$   $a^*$   $b^*$ , é um sistema que representa a relação quantitativa de cores em três eixos, sendo eles o  $L^*$  que indica luminosidade,  $a^*$  e  $b^*$  são coordenadas de cromaticidade.

No diagrama de espaço de cores cada parâmetro tem uma faixa, sendo  $L^*$  representado em um eixo vertical com valores de 0 (preto) a 100 (branco). O valor  $a^*$  indica o componente vermelho-verde de uma cor, onde  $+a^*$  (positivo) e  $-a^*$  (negativo) indicam valores de vermelho e verde, respectivamente. O componente amarelo-azul é representado no eixo  $b^*$  como valores  $+b^*$  (positivo) e  $-b^*$  (negativo), respectivamente (LY et al., 2020).



Fonte: CIE, Commission Internationale de l'Eclairage (LY et al., 2020).

A cor dos filmes é uma característica importante e essencial principalmente em relação a sua aplicação. Na Tabela 4 estão apresentados os valores de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) e transparência (T) para os filmes analisados.

Tabela 4 - Parâmetros L\*, a\*, b\* e transparências obtidos da análise de cor dos filmes.

Filmes	L*	a*	b*	T
OEC <sub>0</sub> NFC <sub>0</sub>	96.35 <sup>cd</sup> ± 0.30	0.97 <sup>ab</sup> ± 0.02	9.49 <sup>ab</sup> ± 1.25	11.63 <sup>b</sup> ± 0.28
OEC <sub>5</sub> NFC <sub>0</sub>	96.72 <sup>cd</sup> ± 0.10	0.70 <sup>abc</sup> ± 0.07	10.04 <sup>ab</sup> ± 0.35	11.51 <sup>b</sup> ± 0.19
OEC <sub>10</sub> NFC <sub>0</sub>	95.24 <sup>b</sup> ± 0.29	0.26 <sup>bc</sup> ± 0.05	15.73 <sup>c</sup> ± 0.85	11.83 <sup>b</sup> ± 0.02
OEC <sub>30</sub> NFC <sub>0</sub>	92.87 <sup>a</sup> ± 0.31	2.02 <sup>d</sup> ± 0.32	24.10 <sup>d</sup> ± 0.92	11.99 <sup>b</sup> ± 0.02
OEC <sub>0</sub> NFC <sub>1</sub>	97.20 <sup>d</sup> ± 0.03	1.11 <sup>a</sup> ± 0.02	6.87 <sup>a</sup> ± 0.24	10.17 <sup>a</sup> ± 0.36
OEC <sub>5</sub> NFC <sub>1</sub>	97.11 <sup>cd</sup> ± 0.10	0.42 <sup>abc</sup> ± 0.07	8.59 <sup>ab</sup> ± 0.48	11.79 <sup>b</sup> ± 0.09
OEC <sub>10</sub> NFC <sub>1</sub>	96.17 <sup>bc</sup> ± 0.18	0.17 <sup>c</sup> ± 0.01	11.31 <sup>b</sup> ± 0.58	11.85 <sup>b</sup> ± 0.01
OEC <sub>30</sub> NFC <sub>1</sub>	92.86 <sup>a</sup> ± 0.40	3.29 <sup>e</sup> ± 0.38	28.22 <sup>e</sup> ± 1.15	11.80 <sup>b</sup> ± 0.03

Médias observadas na coluna com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

O parâmetro L\* está relacionado com a luminosidade, ou seja, quanto mais clara ou mais escura é a amostra (AZEVEDO et al., 2015; CARVALHO et al., 2018; MCGUIRE, 1992). Os tratamentos deste estudo variaram de 92 a 97 para o parâmetro L\*, sendo assim, valores próximos a 100 de luminosidade, caracterizando os filmes com tendências a cor branca. Para transparência tem-se uma média de 11,57 log (%T), como é possível observar na Tabela 4. Ferreira (2014) encontrou valores médios de transparência de 12,1 log (%T) /mm e 95 para L\*, em filme de IPS e glicerol, resultados corroborativos aos do presente estudo.

Os resultados obtidos para a coordenada a\* podem assumir valores de -80 a +100 em que os extremos correspondem ao verde e ao vermelho, respectivamente (AZEVEDO et al., 2015; CARVALHO et al., 2018; MCGUIRE, 1992). Para essa coordenada, os resultados variaram de 0,17 a 3,29, assumindo então valores positivos, não chegando ao extremo vermelho, porém com predominância.

A coordenada b\* indica a intensidade de azul ao amarelo, podendo variar de -50 a +70 que correspondem ao azul e amarelo, respectivamente (AZEVEDO et al., 2015a; CARVALHO et al., 2018; MCGUIRE, 1992). A variação da coordenada b\* assumiu valores positivos de 6,87 a 28,22, sendo assim os tratamentos tendem ao amarelo ao aumentar a concentração de OEC. A presença de gordura e fosfolipídios no IPS, utilizado para desenvolvimento dos filmes, explica a tendência dos filmes ao amarelo (AZEVEDO et al., 2015; DIAS et al., 2014).

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de ângulo Hue (h°) e índice de saturação (C\*) para os filmes analisados.

Tabela 5 - Parâmetros ângulo Hue ( $h^\circ$ ) e índice de saturação ( $C^*$ ) obtido na análise de cor dos filmes.

Filmes	$C^*$	$h^\circ$
OEC <sub>0</sub> NFC <sub>0</sub>	9.54 <sup>ab</sup> ± 1.25	95.98 <sup>e</sup> ± 0.81
OEC <sub>5</sub> NFC <sub>0</sub>	10.06 <sup>ab</sup> ± 0.36	93.96 <sup>de</sup> ± 0.24
OEC <sub>10</sub> NFC <sub>0</sub>	15.73 <sup>c</sup> ± 0.85	90.53 <sup>b</sup> ± 0.40
OEC <sub>30</sub> NFC <sub>0</sub>	24.19 <sup>d</sup> ± 0.91	85.23 <sup>a</sup> ± 0.75
OEC <sub>0</sub> NFC <sub>1</sub>	6.96 <sup>a</sup> ± 0.24	99.17 <sup>f</sup> ± 0.21
OEC <sub>5</sub> NFC <sub>1</sub>	8.60 <sup>ab</sup> ± 0.48	92.84 <sup>cd</sup> ± 0.66
OEC <sub>10</sub> NFC <sub>1</sub>	11.31 <sup>b</sup> ± 0.58	90.85 <sup>bc</sup> ± 0.05
OEC <sub>30</sub> NFC <sub>1</sub>	26.95 <sup>d</sup> ± 2.17	83.68 <sup>a</sup> ± 0.64

Médias observadas na coluna com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

As amostras avaliadas apresentaram valores médios de índice de saturação, chroma ( $C^*$ ), de 6,96 a 26,95, onde o baixo valor de  $C^*$  caracteriza filmes com pouca intensidade de cor. Os valores encontrados para  $C^*$  tendendo a valores próximos a zero são indicativos de cores neutras (cinza) e valores ao redor de 60 indicam cores vívidas e intensas (KONICA MINOLTA, 1998). Quando aumentamos a porcentagem de uso do óleo essencial de canela, observamos a tendência a cores vividas com  $C^*$  de 24,19 e 26,95.

Os tratamentos analisados obtiveram o ângulo Hue ( $h^\circ$ ) próximos de  $90^\circ$ , sendo este valor apresentado situado em uma tonalidade de cor amarela, confirmando a coordenada  $b^*$ . Podendo assim representar a tonalidade de cor e através dele pode-se estimar a posição da amostra no sólido de cor. Sendo que, valores próximos a  $0^\circ$  representam o vermelho (valores positivos de  $a^*$ ), a  $90^\circ$  representa o amarelo (valores positivos de  $b^*$ ), a  $180^\circ$  representa o verde (valores negativos de  $a^*$ ) e a  $270^\circ$  representa o azul (valores negativos de  $b^*$ ) (KONICA MINOLTA, 1998).

## 5.7 Teste de difusão em disco dos filmes ativos

Sousa, (2015), ao estudar o desenvolvimento e caracterização de filme a base de metil celulose e incorporado com nanopartículas de quitosana e nisina verificou-se que o filme de metil celulose e nanopartículas de quitosana não apresentaram atividade antimicrobiana sobre

as bactérias analisadas, podendo ser justificada pela falta de sinergia entre os compostos utilizados. No presente trabalho, através dos resultados de MEV, foi possível observar pontos de aglomeração de NFC, reduzindo a interação homogênea de NFC ao longo da matriz polimérica de IPS. Sendo assim para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com óleo essencial de canela, foi restringido aos tratamentos sem adição de nanofibras de celulose.

Os filmes ativos apresentam resultados satisfatórios quanto à inibição dos microrganismos estudados, e apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao filme controle (OEC<sub>0</sub>NFC<sub>0</sub>) conforme apresentado na Tabela 6. Os tratamentos de baixas concentrações (5% OEC) apresentaram apenas a inibição por contato e os demais apresentaram formação de um halo de inibição. Os resultados obtidos corroboram com o estudo de Trajano et al. (2009) que avaliaram as propriedades antibacterianas de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes em alimentos.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com O.E de canela.

Tratamentos	Medida dos Halos (mm)	
	<i>E.Coli</i>	<i>L. innocua</i>
OEC <sub>0</sub> NFC <sub>0</sub>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
OEC <sub>5</sub> NFC <sub>0</sub>	35,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	35,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
OEC <sub>10</sub> NFC <sub>0</sub>	39,00 ± 3,60 <sup>b</sup>	36,67 ± 2,88 <sup>b</sup>

As médias observadas na coluna com mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os dados obtidos para análise antimicrobiana dos filmes corroboram com as expectativas iniciais do trabalho. Após as confirmações da análise cromatográfica onde foi encontrado como composto majoritário o cinamaldeído presente no OEC utilizado, e comprovar sua eficiência frente às bactérias analisadas através da análise CMI, ao aplicar em biopolímeros obtém-se resultados satisfatórios de atividades antimicrobianas.

## 6 CONCLUSÃO

Os filmes em geral apresentaram-se com pouca intensidade de cor, com uma tendência ao amarelo devido à incorporação do OEC, porém com transparência necessária para serem comercializados. Além disso, alimentos requerem proteção ao serem armazenados e a adição

de nanofibras de celulose proporcionou melhora nas propriedades mecânicas dos filmes desenvolvidos.

Para embalagens de alimentos que requerem proteção contra micro-organismos deteriorantes, a adição de óleo essencial de canela na concentração de 5%, se mostrou ser uma alternativa interessante e que atingiu bons resultados de inibição de crescimento de bactérias.

Portanto, os filmes formulados neste trabalho são eficazes para aplicações em embalagens ativas antimicrobianas para alimentos que requerem esse tipo de proteção.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. **Express Polymer Letters**, v. 11, n. 4, p. 244–265, 2017.
- ALBUQUERQUE, R. M. B. Desenvolvimento de uma blenda biodegradável à base de celulose bacteriana (cb) e polihidroxibutirato (phb) para aplicação como embalagem ativa para alimentos. P. 1–131, 2019.
- ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1664–1671, abr. 2008.
- ALMEIDA, J; ALMEIDA, P; GHERARDI, S. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais : uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Revista Eletrônica Nutri Time**, v. 17, n. 1, p. 8623–8633, 2020.
- ALMEIDA, A.-S. F. DE; BENTES, J. L. DA S.; CORREA JUNIOR, A. Síntese de nanopartículas – revisão de literatura. **Revista Agraria Academica**, v. 4, n. 2, p. 53–69, 1 mar. 2021.
- AMJADI, S. et al. Whey protein isolate-based films incorporated with nanoemulsions of orange peel ( *Citrus sinensis* ) essential oil: Preparation and characterization. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 2, 11 fev. 2021.
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. Standard Terminology Relating to Plastics: **ASTM D618-00. Philadelphia: ASTM, 2000.**
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. Standard test method for slow rate penetration resistance of flexible barrier films and laminates. **ASTM F1306-90. Philadelphia: ASTM, 2001.**
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. **ASTM D882-02. Philadelphia: ASTM, 2002.**
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. Standard test method for transparency of plastic sheeting. **ASTM D1746-03. Philadelphia: ASTM, 2003.**
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. Standard test methods for water vapor transmission of materials. **ASTM E96-00. Philadelphia: ASTM, 2002.**
- ANDRADE, R. R. DE et al. Occurrence and differentiation of *Listeria* spp. in “hot dog” sausages sold in bulk and ground beef samples marketed in the federal district, Brazil. **Ciencia Rural**, v. 44, n. 1, p. 147–152, 2014.
- ANDRADE, M. A. et al. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*

and Zingiber officinale: Composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399–408, 2012.

ARAÚJO, B. A. et al. A aplicação de polímeros biodegradáveis como uma alternativa sustentável. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e49010918248, 31 jul. 2021.

ARAÚJO, C. R. DE et al. Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. **XII SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica - UNIFACS**, p. 40–57, 2013.

AZEREDO, H. M. C. DE; FARIA, J. DE A. F.; AZEREDO, A. M. C. DE. Embalagens ativas para alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 337–341, dez. 2000.

AZEVEDO, V. M. et al. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 179–188, 1 jun. 2015.

AZEVEDO, V. M. D. E. Desenvolvimento de nanocompósitos de isolado proteico de soro de leite incorporados com agente antiescurecimento. p. 133, 2013.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: diffusion Test procedures. **Manual of clinical microbiology, 5th edition, ASM, Washington, DC**, 1991.

BARTOLOMEI, S. S. Compósitos de poliestireno expandido reciclado com solvente biodegradável e plastificado com glicerol para impressão 3D: processamento e caracterizações. p. 1–137, 2020.

BOTRE, D. A. et al. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, v. 57, n. 3, p. 283–291, jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04/09/97. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997.

BRASIL, M. DA A. P. E A. DE D. A. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 94, DE 18 DE SETEMBRO DE 2020 - Aprova o regulamento técnico que fixa os Padrões de Identidade e qualidade para o soro de leite e o soro de leite Ácido.**, 2020.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.

BUFALINO, L. Filmes de nanocelulose a partir de resíduos madeireiros da Amazônia. **Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras**, p. 106, 2014.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. [s.l.] Artliber, 2002.

CARVALHO, R. A. **Desenvolvimento de biopolímeros de isolado proteico de soro de leite**

- e nanofibra de celulose incorporados com óleo essencial de tomilho.** 2016. 140 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- CARVALHO, R. A. et al. Bio-nanocomposites for food packaging applications: effect of cellulose nanofibers on morphological, mechanical, optical and barrier properties. **Polymer International**, v. 67, n. 4, p. 386–392, abr. 2018.
- CARVALHO, R. A. et al. WPI and Cellulose Nanofibres Bio-nanocomposites: Effect of Thyme Essential Oil on the Morphological, Mechanical, Barrier and Optical Properties. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 1, p. 231–241, 1 jan. 2020.
- COELHO, A. L. A. **OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE A PARTIR DE FIBRAS DE COCO PARA A APLICAÇÃO EM ENGENHARIA.** Belo Horizonte: [s.n.].
- CORNALL, J. Active and intelligent packaging: Opportunities for brands. 2018.
- COSTA, A. L. R. et al. Essential Oils of Garlic and Oregano Incorporated in Cellulose Acetate Films: Antimicrobial Activity and Physical Properties. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e329108304, 17 set. 2020.
- DE AMORIM, J. D. P. et al. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 851–869, 2020.
- DE CASTRO, D. L.; CAVALCANTE, M. D. P.; PEDROSA, M. C. G. Nanotecnologia e polímeros: revisão dos temas visando a abordagem em aulas de Química. **Revista Thema**, v. 16, n. 2, p. 313, 2019.
- DIAS, M. V. et al. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated  $\alpha$ -tocopherol. **Food Chemistry**, v. 165, p. 323–329, 2014.
- EICHHORN, S. J. et al. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 1, p. 1–33, 1 jan. 2010.
- FERREIRA, LAURA. FONSECA. **Filmes biodegradáveis de isolado proteico de soro de leite incorporados com montmorilonita e parafina.** Orientador: Soraia Vilela Borges. 2014. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- FIGUEIREDO, C. S. S. E S. et al. Óleo essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 9, n. 2, p. 192, 2018.
- FREIRE, B. C. F. et al. Inovações e atualidades em tecnologia de embalagens para alimentos: uma revisão. **Anais dos Workshops do CIONIMAS**, 2020.
- GONTHIER, A. The Effects of Acid Whey on the Environment. **Way Over Whey**. v. 2, p. 15-49, 2013.

- GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 2, p. 261–269, set. 2010.
- GUIMARÃES, L. G. DE L. et al. **Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral**. Disponível em: <<http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/1312>>. Acesso em: 17 out. 2019.
- HAGE JUNIOR, E. **Aspectos Históricos sobre o Desenvolvimento da Ciência e da Tecnologia de Polímeros**. [s.l.] Polímeros: Ciência e Tecnologia, 1998.
- HAMMANN, F.; SCHMID, M. Determination and Quantification of Molecular Interactions in Protein Films: A Review. **Materials**, v. 7, n. 12, p. 7975–7996, 10 dez. 2014.
- HAN, J. H. et al. Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsions. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, p. 290–296, 2006.
- HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. DE; PAULA, H. DE. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479–488, ago. 2006.
- JACOBI, M. M. O Admirável Mundo Nano : Nanociência e Nanotecnologia. **Revista SLT Caucho**, 2004.
- JAHED, E. et al. Effect of cellulose and lignocellulose nanofibers on the properties of *Origanum vulgare* ssp. *gracile* essential oil-loaded chitosan films. **Reactive and Functional Polymers**, v. 117, p. 70–80, 1 ago. 2017.
- JONOBI, M. et al. Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: a review. **Cellulose**, v. 22, n. 2, p. 935–969, 3 abr. 2015.
- KANMANI, P.; RHIM, J. W. Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. **Food Chemistry**, v. 148, p. 162–169, 2014.
- KOKETSU, M. et al. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, dez. 1997.
- Konica Minolta. Comunicação precisa da cor: controle de qualidade da percepção à instrumentação. Seoul: Konica Minolta; 1998.
- LAMAS, Mariana Leles. **Filme de proteína de soro de leite incorporado com argila montmorilonita e natamicina para conservação de queijo muçarela fatiado**. 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015
- LANDIM, A. P. M. et al. Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. **Polímeros**, v. 26, n. spe, p. 82–92, 19 jan. 2016.

LEE, S. J.; RAHMAN, A. T. . M. Intelligent Packaging for Food Products. In: **Innovations in Food Packaging**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 171–209.

LENHANI, G. C. **Obtenção e aplicação de celulose de resíduos agroindustriais em filmes compósitos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2019.

LEOPOLDO, C. DE J.; VECHIO, G. H. DEL. NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES. **Revista Interface Tecnológica**, v. 17, n. 2, p. 144–154, 18 dez. 2020.

LIMA, J. C. DA C. et al. Estudo e influência dos óleos essenciais de cravo, canela e laranja na preparação de filmes de poli (ácido láctico): desenvolvimento de embalagens ativas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e41810414340, 18 abr. 2021.

LY, B. C. K. et al. Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 1, p. 3- 12.e1, jan. 2020.

MCGUIRE, R. G. Reporting of Objective Color Measurements. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1254–1255, dez. 1992.

MEDEIROS, K. M. DE. NOVAS TENDÊNCIAS SUSTENTÁVEIS : OS BIOPOLÍMEROS E OS. 2011.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 577–583, 1 set. 2016.

MONTES, S. S. ET AL. Óleos essenciais em embalagens para alimentos - Revisão de literatura de 2000 a 2012. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, 2013.

NUNES, L. A. et al. O SORO DO LEITE, SEUS PRINCIPAIS TRATAMENTOS E MEIOS DE VALORIZAÇÃO. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 301, 29 mar. 2018.

NUNES, T. F. G. **Produção, caracterização e aplicação de nanofibras de celulose**. Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Coimbra , p. 105. 2014.

OLIVEIRA, M. M. . M. **ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS: Listeria monocytogenes E Escherichia coli ENTEROPATOGÊNICA**. [s.l.: s.n.].

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, jun. 2008.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils against Cell Membranes and Walls of

- Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1046–1055, 1 maio 2006.
- PARK, S.; ZHAO, Y. Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. 2004.
- PINHEIRO ALVES, M. et al. Soro De Leite: Tecnologias Para O Processamento De Coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212, 2014.
- POISSON, E. (ED.). **Processos Químicos e Biotecnológicos - Volume 6**. [s.l.] Editora Poisson, 2020.
- PONTES, Sylvania Farias Oliveira. **Development of nanoemulsions of essential oils incorporated methylcellulose film for use in food**. 2013. 129 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos; Tecnologia de Alimentos; Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- PROBST, Isabella da Silva. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 102 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.
- RAMOS, Ó. L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 110–122, jan. 2013.
- REIS, J. B. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 342–363, 2020.
- RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. **Bio-nanocomposites for food packaging applications** *Progress in Polymer Science* Elsevier Ltd, , 2013a.
- RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. **Bio-nanocomposites for food packaging applications** *Progress in Polymer Science*, 2013b.
- ROSA, S. DEMERVAL; PANTANO FILHO, R. **Biodegradação: um ensaio com polímeros**. [s.l: s.n.].
- SANTOS, J. S.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA, P. Alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada Review: Fresh, minimally processed foods packaged under modified atmosphere. **Braz. J. Food Technol**, n. 1, p. 1–14, 2012.
- SANTOS, T. A. et al. Release of papain incorporated in chitosan films reinforced with cellulose nanofibers. **Journal of Food Processing and Preservation**, 30 ago. 2021.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397–409, dez. 2004.
- SHANKAR, S.; REDDY, J. P.; RHIM, J. W. Effect of lignin on water vapor barrier, mechanical, and structural properties of agar/lignin composite films. **International Journal**

of **Biological Macromolecules**, v. 81, p. 267–273, 2015.

SILVEIRA, M. P. **Desenvolvimento de filme biodegradável funcional à base de fécula de mandioca com nanofibra de celulose de pinus (pinus sp) e incorporação de óleo essencial de melaleuca (melaleuca alternifolia)**. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Paraná, p. 91-98. Curitiba, 2019.

SINGH, G. et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1650–1661, set. 2007.

SLAVUTSKY, A. M.; BERTUZZI, M. A. Water barrier properties of starch films reinforced with cellulose nanocrystals obtained from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 53–61, 2014.

SOUSA, Miriane Maria de. **Desenvolvimento e caracterização de filme ativo a base de metil celulose incorporado com nanopartículas de quitosana e nisina**. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015.

SOUZA, L. B. DE; MOURA, A. A. C.; SILVA, J. B. A. DA. Embalagens para alimentos: tendências e inovações. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 270–271, p. 25–29, 2017.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542–545, 2009.

UGARTE, Sheila Dayanna Milan. **Atividade antimicrobiana da cobertura comestível de quitosana adicionada com trans-cinamaldeído sobre Escherichia coli E Listeria innocua em melão cantaloupe (Cucumis melo, L.) minimamente processado**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia e Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

YANG, K. et al. Preparation and characterization of cinnamon essential oil nanocapsules and comparison of volatile components and antibacterial ability of cinnamon essential oil before and after encapsulation. **Food Control**, v. 123, p. 107783, maio 2021.

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**, 2009.