



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGENS ATIVAS E BIODEGRADÁVEIS
ADICIONADAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

PATRICIA PINHEIRO DOS SANTOS ACOSTA

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Profª. Dra. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGENS ATIVAS E BIODEGRADÁVEIS
ADICIONADAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

PATRICIA PINHEIRO DOS SANTOS ACOSTA

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Profª. Dra. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2021

Ficha Catalográfica

A185d Acosta, Patricia Pinheiro dos Santos.

Desenvolvimento de embalagens ativas e biodegradáveis
adicionadas de óleos essenciais / Patricia Pinheiro dos Santos
Acosta. – 2021.

93 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande/RS, 2021.

Orientadora: Dra. Vilásia Guimarães Martins.

1. Filmes Bioativos 2. Óleo Essencial de Canela 3. Óleo Essencial
de Tomilho 4. *Litsea cubeba* 5. Biodegradabilidade I. Martins, Vilásia
Guimarães II. Título.

CDU 665.11

APROVAÇÃO

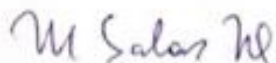
Dissertação defendida por Patrícia Pinheiro dos Santos Acosta, com orientação da Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins, aprovada em 28 de junho de 2021, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



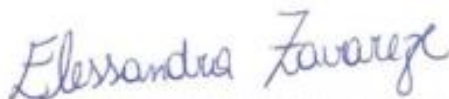
Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG



Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong - FURG



Profa. Dra. Myriam Salas-Mellado – FURG



Profa. Dra. Elessandra da Rosa Zavarese - UFPEL

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Aldaney Pinheiro dos Santos (*In memoriam*) e ao meu pai Luiz Carlos Lopes dos Santos, pelo amor, incentivo, valores e ensinamentos que me foram passados, base da minha formação e caráter como ser humano.

Ao meu marido, Júlio Cesar Acosta Junior pelo amor, incentivo, paciência e apoio em todos os momentos, e por compartilhar a alegria de viver e criar nossos filhos Arthur Pinheiro dos Santos Acosta e Otávio Pinheiro dos Santos Acosta.

A minha sogra Teresa Gonçalves Acosta pelo apoio, acolhimento, cafezinho das tardes de estudo e cuidado inestimável com meus filhos.

A minha orientadora professora Dra. Vilásia Guimarães Martins, pelo orientação, acolhimento, amizade, paciência e apoio inestimável.

Às professoras: Dra. Eliana Badiale-Furlong e Dra. Myriam de las Mercedes Salas-Mellado, pelas orientações e contribuições com o trabalho.

Aos amigos: Gislaine Faria, pelos choros e risadas divididas nessa jornada desafiadora que é ser mãe pesquisadora; Camila Quadros, por toda ajuda nos momentos de bancada; Débora Vieira, pelas dicas e boas vibrações; Daiane Nogueira, pelas explicações e aulas on-line; Aline Massia, sempre me socorrendo e tirando minhas dúvidas; Juliana Latorres, auxiliando no trabalho e dividindo as angustias diárias da criação dos filhos; Luan Santos; sempre disponível, criativo e tecnológico; Pedro Klein, pelas aulas de estatística e conversas divertidas; Gabriel da Silva Filipini, por ter me recebido tão bem no laboratório e auxiliado no projeto; Meritaine da Rocha, pelas conversas, dicas e ajuda na bancada.

A todos da Escola de Química e Alimentos (EQA/FURG), em especial do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA/FURG), ao nosso saudoso e querido Professor Dr. Carlos Prentice-Hernández (*In memoriam*), a todos demais professores, alunos de graduação e pós-graduação, com os quais tive o imenso prazer e orgulho de trabalhar.

Ao Centro de Microscopia da Região Sul (CEME-Sul/FURG) pela disponibilização dos equipamentos para realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e difração de raios-X (DRX).

Ao Centro Integrado de Análises (CIA/FURG) pela disponibilização dos equipamentos para realização da análise termogravimétrica (TGA).

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, através da concessão de bolsa de mestrado.

À Universidade Federal do Rio Grande e a todos que contribuíram para que a
realização deste trabalho fosse possível.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Codificação e filmes produzidos.....	30
Tabela 2 – Avaliação subjetiva dos filmes.....	40
Tabela 3 – Caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 6,5% de colágeno.....	43
Tabela 4 – Caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 7% de colágeno.....	46
Tabela 5 – Caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 1,0% de metilcelulose....	48
Tabela 6 – Caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 1,5% de metilcelulose....	49
Tabela 7 – Propriedades térmicas dos filmes de colágeno e metilcelulose, obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA).....	52
Tabela 8 – Cristalinidade dos filmes de colágeno e metilcelulose.....	58
Tabela 9 – Halos médios de inibição apresentados pelos óleos essenciais.....	60
Tabela 10 – Halos médios de inibição apresentados pelos filmes com óleos essenciais.....	62
Tabela 11 – Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	64
Tabela 12 – Atividade antioxidante dos filmes com óleos essenciais.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática para elaboração, avaliação e aplicação dos filmes.....	31
Figura 2 – Representação dos sistemas para avaliação da biodegradabilidade dos filmes em solo, sendo (a) areia preta e (b) areia da praia.....	37
Figura 3 – Filmes de colágeno com óleos essenciais.....	41
Figura 4 – Filmes de metilcelulose com óleos essenciais.....	42
Figura 5 – Filme de metilcelulose com óleo essencial de tomilho.....	42
Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura na superfície dos filmes.	56
Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal.....	57
Figura 8 – Atividade antibacteriana dos óleos essenciais, onde (a) são as placas inoculadas com <i>Escherichia coli</i> e (b) as placas inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Figura 9 – Biodegradabilidade dos filmes de colágeno em areia preta (a) e areia de praia (b)	68
Figura 10 – Biodegradabilidade dos filmes metilcelulose em areia preta (a) areia de praia (b)	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.2	OBJETIVO GERAL	19
2.3	OBJETIVO ESPECÍFICO	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.2	EMBALAGEM BIODEGRADÁVEL	21
3.3	COLÁGENO	22
3.4	METILCELULOSE	23
3.5	EMBALAGEM ATIVA	24
3.6	COMPOSTOS ATIVOS	25
3.7	PRODUÇÃO DE FILMES	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	MATERIAL	29
4.2	PRODUÇÃO DOS FILMES ATIVOS	29
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	32
4.3.1	Aspecto visual	32
4.3.2	Espessura	32
4.3.3	Solubilidade em água	32
4.3.4	Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	33
4.3.5	Propriedades Mecânicas	33
4.3.6	Propriedades Térmicas	34
4.3.7	Propriedades Microestruturais	34
4.4	BIOATIVIDADE	35
4.4.1	Atividade antibacteriana	35
4.4.2	Atividade antioxidante	35
4.4.2.1	Método DPPH	35
4.4.2.2	Método ABTS (ABTS•+)	36
4.4.2.3	Método Poder redutor	36
4.5	BIODEGRADABILIDADE	37
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	39
5.1.1	Aspecto visual	39
5.1.2	Espessura, Solubilidade, Permeabilidade e Propriedades Mecânicas	42

5.1.3	Propriedades Térmicas	51
5.1.4	Propriedades microestruturais	53
5.1.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53
5.1.4.2	Cristalinidade por difração de raios X (DRX).....	58
5.2	BIOATIVIDADE.....	59
5.2.1	Atividade Antibacteriana	59
5.2.2	Atividade Antioxidante.....	64
5.3	BIODEGRADABILIDADE.....	67
6	CONCLUSÃO.....	71
7	RESÍDUOS GERADOS E DESTINO	73
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	755
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
	ANEXO 1.....	89
	ANEXO 2.....	90
	ANEXO 3.....	91

RESUMO

A busca por embalagens sustentáveis, tem levado a procura por novos materiais e tecnologias para a elaboração de embalagens ativas e biodegradáveis, que atendam às necessidades do mercado, do consumidor e do meio ambiente. Embalagens produzidas a partir de polímeros naturais com excelentes propriedades formadoras de filmes, podem se transformar em embalagens ativas quando compostos ativos são incorporados em sua matriz polimérica. Filmes ativos e biodegradáveis foram produzidos utilizando 1 e 1,5% (m/v) de metilcelulose, e 6,5 e 7% (m/v) de colágeno, contendo óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*), litsea cubeba (*Litsea cubeba*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) nas concentrações de 0,25% e 0,5% (v/v). Os filmes elaborados com os óleos essenciais se apresentaram visualmente contínuos e homogêneos. Os filmes preparados, foram caracterizados quanto as suas propriedades mecânicas, de barreira, térmicas e morfológicas. A bioatividade dos óleos essenciais e dos filmes foram avaliadas pelas análises das atividades antibacteriana para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e antioxidante (DPPH, ABTS e poder redutor). A biodegradabilidade em solo dos filmes produzidos também foi avaliada. Os filmes de colágeno apresentaram uma melhora nas propriedades mecânicas e de barreira, com a redução da permeabilidade ao vapor d'água e da solubilidade quando comparados ao padrão. Nos filmes de metilcelulose houve pequena melhoria nas propriedades de barreira e redução nas propriedades mecânicas quando se adicionou os óleos essenciais. As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA), mostraram um aumento na estabilidade térmica em todos os filmes após a incorporação dos óleos essenciais e redução na perda de massa nos filmes de colágeno com o óleo de litsea cubeba (FC2-L1) e a metilcelulose com óleo de canela (FM2-C1). As imagens por MEV mostraram superfícies lisas e homogêneas em todos os filmes. Os filmes FC2-L1 e FM2-C1 apresentaram maior atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e excelente atividade antioxidante contra o radical ABTS quando comparados aos demais filmes avaliados. O filme de colágeno com óleo de tomilho (FC1-T2) apresentou 81,7% de inibição contra o radical ABTS. O tempo de biodegradação total em solo de areia preta e areia de praia foi no máximo de 20 dias para todos os filmes produzidos. Os filmes que apresentaram maior potencial para se tornarem embalagens ativas e biodegradáveis foram os FC1-T2 e FM1-L2 como embalagens antioxidantes e FC2-L1 e FM2-C1 como embalagens antibacterianas.

Palavras chaves: Filmes bioativos. Óleo essencial de canela. Óleo essencial de tomilho. Litsea cubeba. Biodegradabilidade

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ACTIVE AND BIODEGRADABLE PACKAGING ADDED
ESSENTIAL OILS

The search for sustainable packaging has led to the search for new materials and technologies for the development of active and biodegradable packaging, which meet the needs of the market, the consumer and the environment. Packaging made from natural polymers with excellent film-forming properties can become active packaging when active compounds are incorporated into its polymer matrix. Active and biodegradable films were produced using 1 and 1.5% (m/v) of methylcellulose, and 6.5 and 7% (m/v) of collagen, containing essential oils of cinnamon (*Cinnamomum cassia*), litsea cubeba (*Litsea cubeba*) and thyme (*Thymus vulgaris*) at concentrations of 0.25% and 0.5% (v/v). The films made with essential oils were visually continuous and homogeneous. The prepared films were characterized for their mechanical, barrier, thermal and morphological properties. The bioactivity of essential oils and films were evaluated by analyzing the antibacterial activities for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and antioxidant (DPPH, ABTS and reducing power). The soil biodegradability of the produced films was also evaluated. Collagen films showed an improvement in mechanical and barrier properties, with reduced water vapor permeability and solubility when compared to the standard. In methylcellulose films there was little improvement in barrier properties and reduction in mechanical properties when essential oils were added. Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) analyzes showed an increase in thermal stability in all films after the incorporation of essential oils and a reduction in mass loss in collagen films with litsea cubeba oil (FC2 -L1) and methylcellulose with cinnamon oil (FM2-C1). SEM images showed smooth and homogeneous surfaces in all films. The FC2-L1 and FM2-C1 films showed greater antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and excellent antioxidant activity against the ABTS radical when compared to the other films evaluated. The collagen film with thyme oil (FC1-T2) showed 81.7% inhibition against the ABTS radical. The total biodegradation time in black sand soil and beach sand was a maximum of 20 days for all films produced. The films that showed the greatest potential to become active and biodegradable packaging were FC1-T2 and FM1-L2 as antioxidant packaging and FC2-L1 and FM2-C1 as antibacterial packaging.

Keywords: Bioactive films. Cinnamon essential oil. Thyme essential oil. Litsea cubeba. Biodegradability

1 INTRODUÇÃO

A embalagem é um recurso importante para aumentar a vida útil de produtos alimentícios, uma vez que auxilia na diminuição da contaminação e contribuindo em parte com a segurança dos alimentos durante e após sua comercialização, além de contribuir para a aceitabilidade do produto (AL-TAYYAR; YOUSSEF; AL-HINDI, 2020). Plásticos derivados de petróleo são amplamente empregados na produção de embalagens, devido a sua segurança, aplicabilidade e economia, no entanto, estes materiais causam um grande problema de poluição ambiental por não serem biodegradáveis e levam mais de 100 anos para se decompor. Pesquisas envolvendo a produção e caracterização de embalagens utilizando filmes poliméricos naturais e biodegradáveis aumentou significativamente, devido ao interesse em minimizar o impacto ambiental causado pelo uso de materiais sintéticos (ETXABIDE, et al., 2017; KALKAN; OTAĞ; ENGIN, 2020).

Polímeros biodegradáveis têm sido considerados alternativas atraentes às embalagens plásticas, devido à sua excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade (SIRACUSA et al., 2008). Vários polímeros biodegradáveis foram explorados para desenvolver materiais de embalagem de alimentos através na produção de filmes, principalmente de polissacarídeos como amidos, pectinas, celulose, quitosana e alginato, e também de proteínas como gelatina, colágeno, proteína de soja, soro de leite, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares (MIR et al., 2018).

A metilcelulose é um biopolímero derivado da celulose, é obtido de fonte renovável, abundante e de baixo custo, e pode ser utilizado como matéria-prima para preparação de filmes biodegradáveis. Os filmes obtidos deste material são transparentes, solúveis em água, inodoros, insípidos, flexíveis, e formam boa barreira a compostos lipídicos e gases, como oxigênio e dióxido de carbono (CAZÓN et al., 2017). O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo animal. Suas características favorecem o seu uso como polímero por ser biocompatível, possuir grande resistência à tração e excelente matriz de liberação de compostos ativos (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

Os filmes podem ser formados por diferentes processos, dentre estes, destaca-se o método de “*casting*”. Este é um processo baseado na dispersão ou solubilização dos biopolímeros em uma fase líquida formando uma solução filmogênica. Alguns aditivos, como plastificantes e emulsificantes, também podem ser adicionados. Após o preparo, estas soluções devem passar por uma operação de secagem para a formação dos filmes (PERESSINI et al., 2003).

A preferência do consumidor por aditivos de fontes seguras e a preocupação quanto ao uso de conservantes nocivos, levaram a indústria de alimentos a buscar alternativas. Compostos ativos, extraídos de plantas, vêm sendo alvo de muita atenção por apresentarem propriedades com grande capacidade de aplicação em filmes biodegradáveis. Estes possuem elevadas concentrações de compostos fenólicos com capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos e controlar o processo de oxidação lipídica (VILELA et al., 2018). Os compostos ativos presentes em óleos essenciais como de canela, litsea cubeba e tomilho, apresentam propriedades antibacterianas e antioxidantes, e podem ser utilizados para proteção dos alimentos, de forma segura e biodegradável (WANG et al., 2018).

Esta evolução do mercado, foi impulsionada pela demanda do consumidor por produtos de qualidade, com maior frescor e valor nutricional, sendo convenientemente embalado e estável durante a sua vida útil. Alavancando também, a busca por novas tecnologias de processamento e embalagem, que atendessem todas as necessidades de mercado, abrangendo grande variedade de produtos alimentícios (SMITH et al., 2004). Para aliar a qualidade e a segurança dos alimentos, o desenvolvimento de embalagens derivadas de polímeros biodegradáveis combinados com extratos vegetais aparece como uma das estratégias mais interessantes e inovadoras (MIR et al., 2018).

A necessidade de maiores estudos para o desenvolvimento de materiais para embalagens de alimentos de fontes renováveis, que apresentem propriedades ativas, pela incorporação de compostos naturais e que estendam a vida útil de produtos alimentícios, é o objetivo do presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é produzir filmes ativos e biodegradáveis de colágeno e metilcelulose contendo diferentes tipos de óleos essenciais.

2.3 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar as atividade antibacteriana e antioxidante dos óleos essenciais da canela (*Cinnamomum cassia*), litsea cubeba (*Litsea cubeba*) e tomilho (*Thymus vulgaris*);
- Produzir filmes de colágeno e metilcelulose, com incorporação de diferentes concentrações dos óleos essenciais;
- Avaliar os filmes ativos quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira;
- Avaliar os melhores filmes quanto às propriedades térmicas e microestruturais;
- Avaliar as atividades antimicrobianas e antioxidantes, e a biodegradabilidade dos filmes selecionados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.2 EMBALAGEM BIODegradável

Entre muitas das funcionalidades da embalagem, uma das mais importantes é proteger o produto, com a finalidade de preservar as características do alimento, por meio das propriedades de barreira aos fatores ambientais, mantendo o produto sem alterações indesejáveis durante o transporte e armazenamento (LANDIM, 2016).

Os materiais de embalagens tradicionais derivados de petróleo degradam-se muito lentamente, pois apresentam grande resistência às radiações, ao calor, ao ar, à água e ao ataque imediato de micro-organismos. Por isso tornaram-se ambientalmente insustentáveis, visto que a degradação desses materiais leva centenas de anos (ARVANITOYANNIS; BILLIADERIS, 1999). Além de impor riscos à saúde associados, como por exemplo, à migração de aditivos prejudiciais à saúde. Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de embalagens biodegradáveis e de matrizes sustentáveis, capazes de garantir uma integração segura durante a conservação dos alimentos (QUINTERO et al., 2013).

Biopolímeros são polímeros gerados a partir de fontes naturais renováveis, frequentemente biodegradáveis, e não tóxicos. Podem ser produzidos por sistemas biológicos, ou sintetizados quimicamente a partir de materiais biológicos, tais como, açúcares, amido, proteínas, gorduras naturais ou óleos (PAWAR; PURWAR, 2013).

Os biopolímeros, tais como, polissacarídeos, proteínas e lipídios, são largamente empregados para a produção de filmes biodegradáveis ou películas comestíveis (LI et al., 2014; ZHANG et al., 2010). Dentre os polissacarídeos utilizados na produção de filmes, destacam-se os amidos, pectinas, celulose, quitosana e alginato, quanto às proteínas, a gelatina, colágeno, proteína de soja, soro de leite, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares. Os lipídios empregados, são usados como revestimentos ou incorporados em outros biopolímeros para fazer filmes compostos, os mais comuns são, cera de abelha, óleo mineral, surfactantes, monoglicerídeo acetilado, cera de carnaúba e cera de parafina (KESTER; FENNEMA, 1986; MIR et al., 2018; PIRES et al., 2013).

Os filmes elaborados a partir de polissacarídeos ou proteínas, possuem excelentes propriedades mecânicas, óticas e sensoriais, porém são sensíveis à umidade e apresentam alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água. Ao contrário, as coberturas compostas de lipídios apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor d'água, mas são opacas e pouco flexíveis, além de apresentarem sabor residual, o que pode influenciar as características sensoriais do alimento (FAKHOURI et al., 2007; GALLO et al., 2000). Entretanto, para se

tornarem comercialmente competitivos com os termoplásticos, o material biodegradável deve ter características termomecânicas e visuais atrativas. Neste cenário, a busca por plásticos biodegradáveis que supram as necessidades do mercado, permanece uma área de pesquisa muito promissora e em constante desenvolvimento (FOLLAIN et al., 2005; HAGHIGHI et al., 2020).

A capacidade de formação de filmes de vários polissacarídeos tem sido estudada, incluindo metilcelulose (DICASTILLO et al., 2016), quitosana (LIU et al., 2017), amido (PINEROS-HERNANDEZ et al., 2017), pectina (ESPITIA et al., 2014) e alginato (HAMBLETON et al., 2009). Os materiais à base de lipídios incluem ceras (ROMANI et al., 2020), acilgliceróis e ácidos (PEREZ-GAGO; RHIM, 2014). Materiais proteicos incluem colágeno (WU et al., 2018), gelatina de pescado (WU et al., 2017), proteína de pescado (ROMANI et al., 2019), proteína de soro de leite (SANI; EHSANI; HASHEMI, 2017), zeína de milho (GAO et al., 2017), glúten de trigo (SCHERF; KOEHLER; WIESER, 2016), proteína do ovo (FUERTES et al., 2017), proteína de soja (OTONI et al., 2016), entre outros.

3.3 COLÁGENO

Estruturalmente, o colágeno é constituído por três cadeias polipeptídicas, que possuem forma helicoidal unidas por ligações cruzadas intermoleculares. Estas cadeias enrolam-se umas nas outras formando a tripla hélice, pela formação de ligações de hidrogênio, que estabilizam esta estrutura, fornecendo resistência e flexibilidade. O aumento da temperatura resulta em alterações na estrutura do colágeno, acarretando mudanças nas suas propriedades físicas. Isso porque, a partir de certa temperatura ocorre a destruição da estrutura tridimensional da tripla hélice, provocando a sua desnaturação e produzindo uma estrutura desorganizada conhecida como gelatina (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

Após sua extração, o colágeno, pode ser apresentado na forma de fibras ou pó, sendo insolúveis em água devido à grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos contidos no interior da proteína (SILVA; PENNA, 2012). Ambas as formas, podem ser empregadas na produção de biopolímeros, mas para isso é necessário a redução do pH do meio e aquecimento para solubilizá-los (WOLF; SOBRAL; TELIS, 2009).

Algumas das características do colágeno que favorecem o seu uso como polímero são: ocorrer em grande quantidade no reino animal, ser biocompatível e biodegradável; poder ter sua estrutura química e suas propriedades modificadas; possuir grande resistência à tração e

baixa elasticidade; servir como matriz de liberação de compostos ativos; e ser capaz de formar solução filmogênica (LEE; SINGLA; LEE, 2001; XU et al.; 2020).

Devido à alta resistência das fibras formadas pela estrutura tripla helicoidal, o colágeno tem sido amplamente utilizado no desenvolvimento de embalagens para alimentos. Jiang et al. (2020) produziram filmes de colágeno com óleo essencial de limão encapsulado em nanopartículas de quitosana, apresentaram grande eficácia como embalagem para carne de porco resfriada com ação antioxidante por 21 dias. De acordo com Walz et al. (2018) invólucros de colágeno com 0,6 mm, em contato direto com salames, não só podem bloquear o oxigênio e o vapor de água, mas também reduzir a exsudação do líquido da carne, manter a cor e inibir a oxidação durante o armazenamento, quando comparados a alginato e tripas naturais. Estudo realizado por Bhuimbar, Bhagwat e Dandge (2019) mostra o desenvolvimento de filmes de colágeno (3,5% m/v) e quitosana (1% p/v), extraídos de resíduos de pescado medusa (*Centrolophus nige*), com adição de 3% de extrato de casca de romã, e mostrou efeito antibacteriano contra patógenos de origem alimentar.

3.4 METILCELULOSE

A metilcelulose é formada pelo tratamento alcalino da celulose com hidróxido de sódio seguida por reação com cloreto de metila, no qual os hidrogênios e os grupos hidroxilas da celulose são parcialmente substituídos por grupos alquila (metil) formando grupos éter metílicos (celulose-O-CH₃). Este polissacarídeo é o derivado mais simples da celulose, é obtido de fonte renovável, abundante e de baixo custo. Os filmes obtidos da metilcelulose são transparentes, solúveis em água, inodoros, insípidos, flexíveis, e possuem resistência a compostos lipídicos e gases, como oxigênio e dióxido de carbono (CAZÓN et al.; 2017; DHALL, 2013; PERESSINI et al., 2003).

Filmes elaborados com metilcelulose vêm sendo pesquisados para a produção de embalagens ativas biodegradáveis. No estudo realizado por Lee et al. (2019) filmes de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foram combinados com nanoemulsão de óleo essencial de orégano foram capazes de produzir filmes ativos com capacidade antioxidante e antibacteriana. De acordo com Nunes et al. (2018), filmes com (2% m/v) metilcelulose contendo nanopartículas de prata biossintetizadas em extrato ativo de *Lippia alba*, apresentaram atividade antioxidante de 69,6% de inibição do radical DPPH e atividade antimicrobiana com halos de 8,0 mm para *E. coli* e de 7,0 mm para *S. aureus*, podendo ser usados na preparação de filmes para a produção de embalagens ativas biodegradáveis. No trabalho desenvolvido por Suppakul

et al. (2016), a otimização na formulação dos filmes de 4,1% (m/v) de metilcelulose, com incorporação de compostos ativos de purê de groselha indiana (0,5% m/m), apresentaram grande atividade antioxidante e prolongamento da vida útil da castanha de caju torrada em 90 dias, durante o armazenamento em condições ambientais aceleradas. Na pesquisa realizada por Romano et al. (2014), mostrou que filmes de metilcelulose 1,5% (m/v) contendo 3% (m/v) frutoligossacarídeos podem ser uma boa estratégia para imobilizar e armazenar bactérias lácticas, com potenciais aplicações no desenvolvimento de alimentos funcionais.

3.5 EMBALAGEM ATIVA

O termo embalagem ativa foi utilizado pela primeira vez por Labuza (1987) e definido como uma categoria de embalagem que exerce um papel adicional na preservação de alimentos, e não somente o de barreira inerte contra influências externas (ROONEY, 2005). No entanto, as embalagens ativas surgiram como uma alternativa inovadora em que seletivamente visa a superfície de alimentos, onde a maioria dos processos de deterioração ocorrem. O uso de embalagens ativas nos permite reduzir o uso de aditivos e conservantes em alimentos, garantindo que o consumidor receba produtos de qualidade e com prazo de validade mais longo (QUINTERO et al., 2013).

A incorporação de compostos ativos na embalagem de alimentos aumenta a eficiência da conservação de alimentos (MORENO et al., 2014). Entre as substâncias bioativas que são mais adequadas para incorporação no material estrutural das embalagens ou no espaço livre desta, estão: fitoquímicos, vitaminas, nanofibras e prebióticos (LOPEZ-RUBIO; GAVARA; LAGARON, 2006). Estes compostos ativos são liberados no alimento prolongando a vida útil, restringindo o crescimento microbiológico, reduzindo a oxidação e mantendo a segurança alimentar, mesmo para alimentos não estéreis (REALINI; MARCOS, 2014; SÁNCHEZ-GARCÍA; GIMÉNEZ; LAGARON, 2008). No entanto, é conveniente lembrar que estes aditivos podem alterar adversamente a resistência ao vapor, gás ou transporte de soluto dos filmes. A influência de um aditivo nas propriedades dos filmes dependerá de sua concentração, estrutura química, grau de dispersão e da extensão desta interação com o polímero (KESTER; FENNEMA, 1986).

O estudo realizado por Pineros-Hernandez et al. (2017), demonstrou a bioatividade de embalagens com extrato de alecrim, rico em polifenóis, incorporados em filmes de amido de mandioca para produzir embalagens de alimentos ativos com propriedades antioxidantes. De acordo com Romani, Prentice-Hernández e Martins (2018), a incorporação de compostos

fenólicos de pimenta rosa em filmes de amido de arroz e proteína de pescado produziram filmes com atividade antioxidante inibindo o escurecimento enzimático de maçãs minimamente processadas. Embalagens ativas, elaboradas por Xu et al. (2018), de amido de tapioca incorporados de nanocristais de celulose e extratos de bagaço de uva, apresentaram atividade antibacteriana quando aplicados em carne de frango pronta para consumo, durante o período de armazenamento sob refrigeração.

3.6 COMPOSTOS ATIVOS

Conservantes sintéticos, como os sorbatos e propionatos, são amplamente utilizados pela indústria de alimentos para inibir o crescimento de micro-organismos e controlar o processo de oxidação lipídica, estendendo a vida útil e segurança dos produtos alimentares. No entanto, a preferência do consumidor por aditivos de fontes naturais e a preocupação com a segurança quanto ao uso de conservantes sintéticos, levaram a indústria de alimentos a buscar alternativas (AZIZ; KARBOUNE, 2018). Compostos extraídos de plantas, vêm sendo alvo de muita atenção por apresentarem propriedades ativas com grande capacidade de aplicação em filmes biodegradáveis, tornando-se uma alternativa aos agentes sintéticos, pois estes possuem elevadas concentrações de compostos fenólicos com atividade antioxidante e antimicrobiana (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; VILELA et al., 2018).

Óleos essenciais (OEs) são líquidos voláteis, oleosos e aromáticos, obtidos a partir de plantas, folhas, sementes, raízes e outras partes da planta, usados como agentes aromatizantes e conservantes naturais em alimentos porque são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) certificado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (HILBIG et al., 2016; HUANG et al., 2017; ZHANG et al., 2020). Compostos vegetais naturais com atividade antimicrobiana incluem: compostos fenólicos, ácidos fenólicos, quininos, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e alcaloides (SAVOIA, 2012), produzidos por plantas como alecrim, cravo, orégano, coentro, *tea tree*, erva cidreira, manjerição e canela. Seus componentes isolados como, o carvacrol, eugenol, timol e cinamaldeído, mostram alta eficiência inibindo o crescimento de micro-organismos (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*), estes geralmente são utilizados como agentes antimicrobianos na elaboração de embalagens ativas de alimentos (MAISANABA et al., 2017).

A degradação oxidativa é, após o crescimento microbiano, a principal razão de deterioração dos alimentos. Os OEs e seus constituintes desempenham um papel fundamental no exercício da atividade antioxidante, capazes de prevenir, alterar e até mesmo inibir reações oxidativas, em concentrações relativamente baixas (FALLEH et al., 2020). Desta forma, os OEs auxiliam aumentando a estabilidade dos componentes dos alimentos, mantendo o valor nutricional e a cor, evitando a rancidez oxidativa, a degradação e a descoloração (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014). De acordo com Macheix, Fleuriet e Sarni-Manchado (2006), vários compostos fenólicos foram identificados no reino vegetal, e todos eles têm em comum a presença de um ou vários anéis benzênicos ligados à hidroxila, sendo que esses grupos funcionais conferem poder antioxidante a essas substâncias. Esses compostos se diferenciam pela estrutura da cadeia carbônica de base (cadeias simples ou polimerizadas), e também pelo grau de modificação (grau de oxidação, hidroxilação e metilação), ou ainda pelas ligações com outras moléculas (glicídeos, lipídios e proteínas).

A litsea cubeba é um arbusto perene conhecido por seu aroma agradável e sabor único semelhante a uma mistura de pimenta, gengibre e frutas cítricas (LIU; YANG, 2012). Nativo do sul da China, Japão, bem como países do sudeste asiático, seus frutos são utilizados em produtos farmacêuticos, perfumaria e alimentos. O óleo essencial pode ser extraído de diferentes partes da planta, incluindo o fruto, raiz e flor, bem como caule e folha, com diversidade significativa na composição e rendimento. O óleo obtido dos frutos pode ser constituído por mais de 50 compostos diferentes, os principais são: citral (cerca de 50 a 80% entre geranial e neral), D-limoneno (18,82%) e linalol (2,36%). As concentrações dos compostos podem variar de acordo com o tempo de cultivo, colheita e fatores locais, climáticos e sazonais, bem como ao tempo de armazenamento (SI et al., 2012; YANG et al., 2014; ZHENG et al., 2018). Estudos indicaram que o óleo essencial de litsea cubeba possui atividade antibacteriana, antioxidante e antifúngica (GOGOI; BARUAH; NATH, 1997; THIELMANN; MURANYI; KAZMAN, 2019; YANG et al., 2014).

A casca da canela é usada há centenas de anos como aditivos de aroma e sabor em alimentos e bebidas. O óleo essencial obtido da casca de canela é um dos óleos essenciais mais eficazes contra patógenos comuns de origem alimentar, além de apresentar excelentes propriedades antioxidantes. Com uma mistura de moléculas, a bioatividade do óleo essencial está diretamente relacionada à presença de seus componentes principais e secundários, que variam de acordo com o tipo genético, fatores ambientais ou método de extração. O cinamaldeído é o principal componente, variando de 50 a 90% do óleo de canela, outros

constituintes menores incluem eugenol, linalol e α -pineno (HUANG et al., 2019; KIM et al., 2015; ZHENG et al., 2018).

O óleo essencial de tomilho é um metabólito secundário vegetal natural, seguro e não tóxico. Apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana contra uma série de diferentes patógenos alimentares e micro-organismos deteriorantes, devido a presença de substâncias fenólicas, especialmente timol e carvacrol. O timol é estruturalmente muito semelhante ao carvacrol, tendo o grupo hidroxila em uma posição diferente no anel fenólico (ZHANG et al., 2020). A atividade antimicrobiana desses compostos está relacionada à presença do grupo –OH que danifica a membrana celular bacteriana causando vazamento de componentes celulares (AGRIMONTI et al., 2019). A concentração de compostos fenólicos no óleo essencial de tomilho é muito afetada por condições ambientais, como composição do solo e teor de nitrogênio, que podem modificar os constituintes das plantas, alterando o nível desses compostos e a produção de óleos essenciais (ALSARAF et al., 2020; BADI et al., 2004).

O mecanismo de ação dos OEs sobre os micro-organismos é complexo e ainda não foi totalmente elucidado, porém já é bem conhecido o caráter hidrofóbico dos OEs e seus componentes, o que permite a sua ligação aos lipídios da membrana celular e mitocôndrias, modificando suas estruturas e aumentando a sua permeabilidade. Devido a esta permeabilidade alterada, pode ocorrer a passagem de íons e outros constituintes celulares provocando a destruição da célula, sendo este o principal mecanismo pelo qual os OEs têm ações letais (BURT, 2004). As bactérias gram-negativas, são geralmente, menos suscetíveis aos danos dos óleos essenciais do que as bactérias gram-positivas. A membrana externa das bactérias gram-negativas contém lipopolissacarídeos hidrofílicos, que criam uma barreira para macromoléculas e compostos hidrofóbicos, tornando as bactérias gram-negativas mais tolerantes a compostos antimicrobianos hidrofóbicos como os encontrados em óleos essenciais (FALLEH et al., 2020; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; SOOFI et al., 2021).

3.7 PRODUÇÃO DE FILMES

Os filmes podem ser formados por dois mecanismos principais: os chamados processos secos, como a extrusão termoplástica, que estão baseados nas propriedades termoplásticas dos polímeros quando plastificados e aquecidos acima da sua temperatura de transição vítrea; e o processo úmido, que está baseado na dispersão ou solubilização dos biopolímeros em uma fase líquida (água, etanol ou ácidos orgânicos) obtendo-se uma dispersão ou solução filmogênica. O método de *casting*, é um processo úmido que está entre os mais

utilizados, principalmente, em escala laboratorial. Alguns aditivos, como plastificantes e emulsificantes, podem ser usados na produção dos filmes. Após o preparo, estas soluções devem passar por secagem para a formação dos filmes ou serem utilizados como revestimentos diretamente em produtos alimentícios por imersão ou pulverização (MELLINAS et al., 2016; PERESSINI et al., 2003).

O plastificante é um aditivo, de baixa massa molar, não volátil, com um alto ponto de ebulição, que quando misturado a um polímero pode alterar suas propriedades físicas e/ou mecânicas. Quando adicionado à solução filmogênica, modifica a organização tridimensional, diminuindo as forças intermoleculares, e aumentando o volume livre e mobilidade das cadeias poliméricas. Como resultado dessas mudanças na organização molecular, o plastificante altera as propriedades funcionais dos filmes, promovendo maior extensibilidade e flexibilidade, diminuindo a rigidez, resistência mecânica, temperatura de transição vítrea, barreira a gases e ao vapor de água (GHASEMLOU et al., 2011; OZCALIK; TIHMINLIOGLU, 2013).

Diversos materiais plastificantes podem ser adicionados aos filmes, como os mono e oligossacarídeos (glicose e sacarose), lipídios (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e surfactantes) e os polióis (glicerol e sorbitol) (ESPITIA et al., 2014). Destes, o glicerol, é o agente plastificante de grau alimentício mais utilizado na composição de soluções filmogênicas, devido a sua estabilidade, baixa massa molar e compatibilidade com as cadeias biopoliméricas dos filmes (CHILLO et al., 2008; RAZAVI; AMINI; ZAHEDI, 2015).

Os métodos utilizados para avaliação dos filmes são derivados dos métodos clássicos, aplicados aos materiais sintéticos, os quais sofreram adaptações em função das características dos filmes biopoliméricos, como por exemplo, sua sensibilidade à umidade relativa e temperatura. A funcionalidade e a performance dos filmes biodegradáveis dependem de suas propriedades térmicas, mecânicas e de barreira, e essas características por sua vez, são dependentes da composição do filme, do processo de formação e do alimento no qual for aplicado (PELISSARI, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os biopolímeros utilizados para a produção dos filmes foram, metilcelulose cedida pela empresa Colorcon do Brasil Ltda., contendo 99% de pureza, e proteínas de colágeno em pó cedida pela JBS S.A., contendo 96% de proteínas.

Os compostos ativos utilizados foram os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*), litsea cubeba (*Litsea cubeba*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), todos adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda com 100% de pureza. Todos os óleos foram obtidos por destilação a vapor das folhas, talos e casca da canela (ANEXO 1), dos frutos da litsea cubeba (ANEXO 2) e flores e folhas do tomilho (ANEXO 3).

Os reagentes utilizados nas análises foram todos de padrão analítico (PA) e o trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

4.2 PRODUÇÃO DOS FILMES ATIVOS

Os filmes de metilcelulose foram produzidos nas concentrações de 1 e 1,5% (m/v), com glicerol na proporção de 1:10 (glicerol:massa do polímero). Os filmes de colágeno foram produzidos nas concentrações de 6,5 e 7% (m/v), com glicerol na proporção de 1:3 (glicerol:massa do polímero). Para o preparo das soluções foi utilizado água como solvente (FILIPINI; ROMANI; MARTINS, 2020). Os óleos essenciais foram incorporados nas soluções filmogênicas desenvolvidas, nas concentrações de 0,25 e 0,5% como pode ser observado na Tabela 1.

Os filmes foram produzidos pelo método de “*casting*”. As soluções filmogênicas foram homogeneizadas a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) por 30 min, e após em banho termostático (BROOKFIELD, TC-102, Estados Unidos) por mais 30 min, nas temperaturas de 50 °C para a metilcelulose e 80 °C para o colágeno. O banho termostático foi acoplado a um reator encamisado de vidro e mantido sob agitação de 1000 rpm com o auxílio de um agitador mecânico de hélice (FISATOM, 712, Brasil).

A incorporação do óleo essencial na solução filmogênica, foi realizada após resfriamento da solução para 40 °C, e então mantido sob agitação mecânica a 1000 rpm por 10

min. Para remoção das bolhas de ar, nas soluções filmogênicas de metilcelulose, aplicou-se o banho ultrassônico (ULTRONIQUE, Eco-Sonic Q3.8L, Brasil) 40kHz por 5 min.

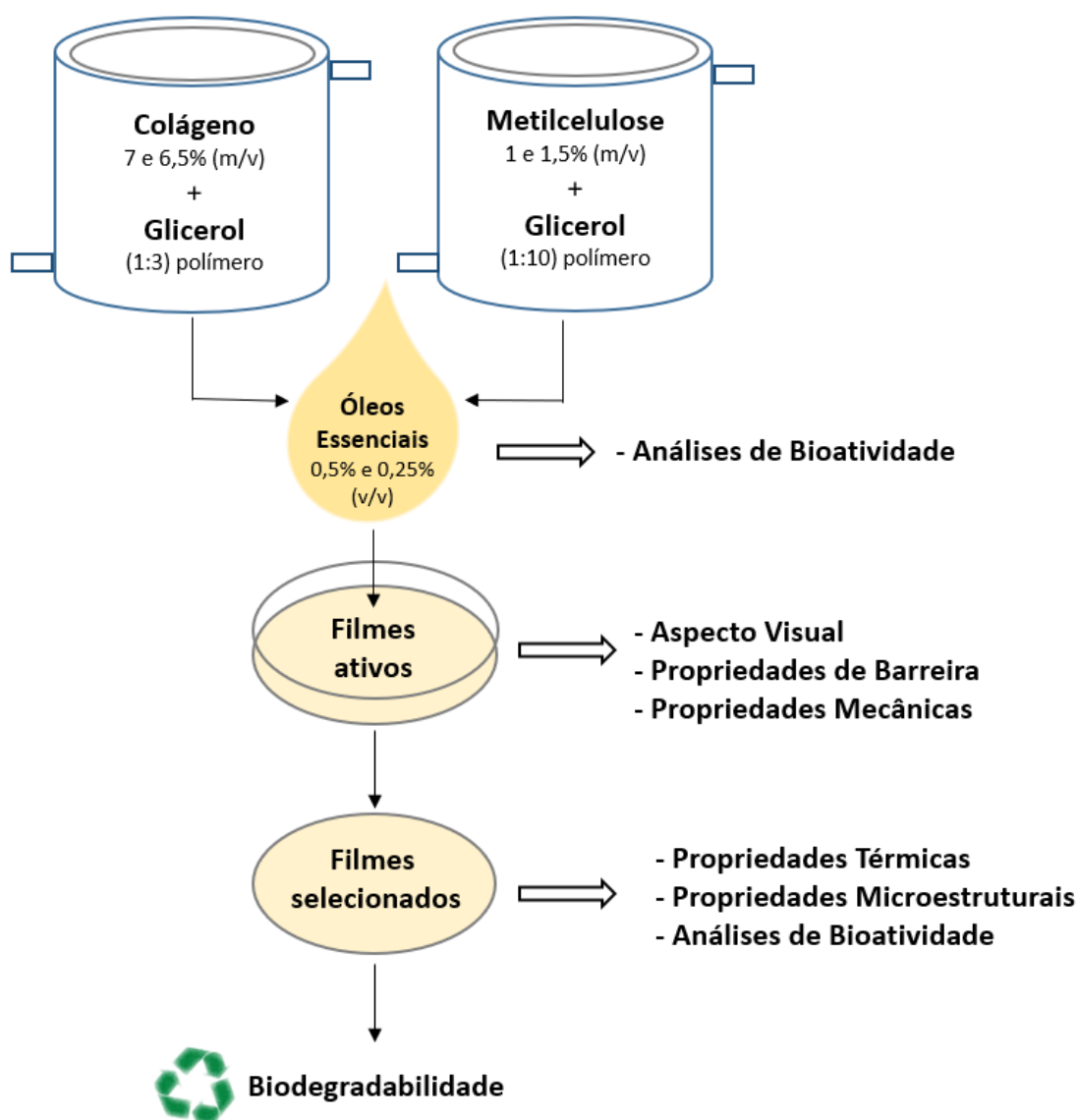
Tabela 1 – Codificação e filmes produzidos.

Codificação do filme	Concentração do biopolímero	Concentração do óleo essencial
FC1	Colágeno 6,5%	-
FC1-C1	Colágeno 6,5%	Canela 0,5%
FC1-C2	Colágeno 6,5%	Canela 0,25%
FC1-L1	Colágeno 6,5%	Litsea cubeba 0,5%
FC1-L2	Colágeno 6,5%	Litsea cubeba 0,25%
FC1-T1	Colágeno 6,5%	Tomilho 0,5%
FC1-T2	Colágeno 6,5%	Tomilho 0,25%
FC2	Colágeno 7%	-
FC2-C1	Colágeno 7%	Canela 0,5%
FC2-C2	Colágeno 7%	Canela 0,25%
FC2-L1	Colágeno 7%	Litsea cubeba 0,5%
FC2-L2	Colágeno 7%	Litsea cubeba 0,25%
FC2-T1	Colágeno 7%	Tomilho 0,5%
FC2-T2	Colágeno 7%	Tomilho 0,25%
FM1	Metilcelulose 1%	-
FM1-C1	Metilcelulose 1%	Canela 0,5%
FM1-C2	Metilcelulose 1%	Canela 0,25%
FM1-L1	Metilcelulose 1%	Litsea cubeba 0,5%
FM1-L2	Metilcelulose 1%	Litsea cubeba 0,25%
FM1-T1	Metilcelulose 1%	Tomilho 0,5%
FM1-T2	Metilcelulose 1%	Tomilho 0,25%
FM2	Metilcelulose 1,5%	-
FM2-C1	Metilcelulose 1,5%	Canela 0,5%
FM2-C2	Metilcelulose 1,5%	Canela 0,25%
FM2-L1	Metilcelulose 1,5%	Litsea cubeba 0,5%
FM2-L2	Metilcelulose 1,5%	Litsea cubeba 0,25%
FM2-T1	Metilcelulose 1,5%	Tomilho 0,5%
FM2-T2	Metilcelulose 1,5%	Tomilho 0,25%

Ao final da dissolução, foi realizado o espalhamento das soluções em placas de Petri de poliestireno com 9 cm de diâmetro, 10 g para as soluções de colágeno e 20 g para soluções de metilcelulose. A secagem de todos os filmes foi realizada em estufa com circulação forçada de ar (QUIMIS, 314D, Brasil) a 40 °C por 18 h. Os filmes foram armazenados em dessecadores com umidade relativa de 55 ± 2 % controlada com brometo de sódio (NaBr), a 25 ± 2 °C, por no mínimo 48 h, para análises posteriores.

Todos os filmes produzidos foram avaliados quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira. O diagrama do estudo está apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática para elaboração e avaliação dos filmes.



4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.3.1 Aspecto visual

As análises visuais e táteis foram realizadas de forma subjetiva (GONTARD, 1991). Os filmes foram avaliados considerando parâmetros como homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou bolhas visíveis ao olho nu, ou zonas de opacidade e coloração desuniforme), continuidade (ausência de rupturas ou fraturas após a secagem) e manuseabilidade (possibilidade de ser manuseado sem riscos de ruptura).

4.3.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se micrômetro digital (INSIZE, IP54, São Paulo, Brasil, resolução 0,0001 mm). A espessura final foi calculada pela média aritmética de dez medidas aleatórias da espessura do filme (GONTARD et al., 1994).

4.3.3 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo método proposto e adaptado por Gontard et al. (1994). Três discos de cada amostra de filme, com 2 cm de diâmetro, foram previamente levados a estufa por 24 h a 105°C, após foram pesados e imersos em 50 mL de água destilada. O sistema foi mantido sob agitação a 100 rpm em incubadora *Shaker* (CIENTEC, CT-712RNT, São Paulo, Brasil) a 25°C durante 24 h. Após o processo de solubilização a amostra foi seca novamente, em estufa (DELEO, A15E, Brasil) a 105°C até peso constante. A solubilidade do filme representará o total de matéria solúvel dissolvida em água, incluindo proteínas solúveis, água e glicerol. A porcentagem de matéria solúvel foi calculada pela Equação 1, onde ms_i é a massa seca inicial da amostra (g) e ms_f é a massa seca final da amostra (g).

$$S (\%) = \frac{ms_i - ms_f}{ms_i} \cdot 100 \quad (1)$$

4.3.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada pelo método gravimétrico conforme E96-00 da ASTM (2000). O filme foi selado em uma célula de permeação contendo cloreto de cálcio (0% UR). A célula foi armazenada em dessecador, com solução saturada de cloreto de sódio (75% UR). A massa da célula foi verificada em intervalos de 24 h, durante 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água foi calculada pela Equação 2, onde M_p é o ganho de massa pela célula CaCl_2 (g); t é o tempo total do teste (h); L é a espessura do filme (mm); A é a área da superfície exposta do filme (m^2) e ΔP é a diferença de pressão parcial através do filme (kPa).

$$P_{VA} \left(\frac{\text{g} \cdot \text{mm}}{\text{kPa} \cdot \text{horas} \cdot \text{m}^2} \right) = \frac{M_p}{t} \cdot \frac{L}{A \Delta P} \quad (2)$$

4.3.5 Propriedades Mecânicas

A tensão na ruptura (T_R) e a elongação (E) dos filmes foram obtidas segundo o método D882-02 (ASTM, 2002), utilizando um texturômetro (Stable Micro Systems, TA.XTplus, Reino Unido). Uma tira do filme (85mm x 25 mm) foi fixada pelas duas garras do equipamento distantes 50 mm entre si, e submetida à tração de velocidade de 50 mm/min. Para determinação dos valores de tensão de ruptura foi utilizada a Equação 3, em que F_m é a força máxima no momento da ruptura do filme (N) e A é a área da seção transversal do filme (m^2).

$$T_R (\text{Mpa}) = \frac{F_m}{A} \quad (3)$$

O alongamento (E) foi determinado pela Equação 4, em que d_r (mm) corresponde a distância final de alongamento do filme e d_i (mm) é a distância inicial entre as garras (50 mm).

$$E (\%) = \frac{d_r}{d_i} \cdot 100 \quad (4)$$

4.3.6 Propriedades Térmicas

A variação de massa dos filmes foi verificada pela análise termogravimétrica (TGA), no Centro Integrado de Análises (CIA/FURG), utilizando-se um medidor termoanalítico (SHIMADZU, modelo DTG-60, Japão). As análises foram conduzidas a partir da temperatura ambiente até alcançar 400 °C, com atmosfera estática de ar com fluxo constante de 20 mL / min e taxa de aquecimento de 10 °C / min, utilizando cerca de 30 mg de amostra.

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada utilizando um calorímetro de varredura (SHIMADZU, modelo TA-60WS, Japão). As amostras foram pesadas e seladas hermeticamente em cápsulas de alumínio para posterior análise. A varredura foi realizada em um intervalo de temperatura de 30 a 300°C a uma taxa de aquecimento de 10 °C / min.

4.3.7 Propriedades Microestruturais

A microestrutura dos filmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando microscópio eletrônico (JEOL, modelo JSM-6060, Japão), operando a 10 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande. As amostras dos filmes foram colocadas em suporte de alumínio (*stubs*) e recobertas com ouro sob vácuo (Sputter Coater, SCDO50) para melhorar a condutibilidade. As imagens foram capturadas com ampliação de 2000x na superfície e 500x na seção transversal.

A análise da cristalinidade por difração de raios-X (DRX) foi realizada nas amostras de filmes, utilizando um difratômetro (BRUKER, D8 Advance, Estados Unidos), no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande. As amostras foram fragmentadas em pedaços retangulares (6 cm²), utilizando tubos de cobre (Cu), comprimento de onda (λ) de 0,15418 Å, voltagem de 40 kV e corrente 40 mA. O intervalo de medida de ângulo em 2 θ variando de 2 a 50°. A porcentagem de cristalinidade dos filmes foi obtida pela relação entre a área cristalina sobre a área total, sendo a área total, a soma das áreas cristalina e amorfa.

4.4 BIOATIVIDADE

4.4.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada pelo teste de inibição de acordo com o método descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). As culturas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram cultivadas e inoculadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*). Após 24 h, um *swab* estéril imerso na suspensão padronizada de 1×10^8 UFC/ mL (padrão McFarland 0,5) foi espalhado brevemente sobre a superfície da placa de petri com ágar MH (*Mueller-Hinton*). Os filmes foram assepticamente cortados em discos de 15 mm, e foram expostos à luz ultravioleta (UV) por 3 min e adicionados à placa contendo o ágar MH inoculado com os diferentes micro-organismos, com auxílio de pinça estéril. Para os óleos essenciais foram utilizados discos de papel estéril com 2 mm de diâmetro, embebidos em 20 µL de óleos essenciais e adicionados nas placas para incubação. As placas foram incubadas invertidas a 37°C durante 24 h. O diâmetro do halo de inibição (mm) foi utilizado para determinar o efeito antimicrobiano das amostras testadas e o resultado final foi expresso como a média de três medições.

4.4.2 Atividade antioxidante

4.4.2.1 Método DPPH

A atividade antioxidante dos filmes e dos óleos essenciais foram medidas pela redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrihidrazil (DPPH) de acordo com Romani, Hernández e Martins (2018), com modificações. As amostras foram solubilizadas utilizando 0,1g de filme em 5 mL de água destilada e 0,04 g de óleo essencial puro em 50 mL de água destilada. As amostras foram mantidas sob agitação orbital (Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm, durante 3 h a 25 °C protegidas da luz. Adicionou-se 20 µL das amostras solubilizadas a 280 µL da solução etanólica de DPPH (32 µg/mL), as medições foram realizadas em leitora de microplacas (Polaris, MA 616, Belo Horizonte, Brasil) a 515 nm após 30 min ao abrigo da luz. A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade de eliminação dos radicais livres, expressa em percentagem (%) com base nas medidas de absorbância dos reagentes ($abs_{controle}$) e absorbância das amostras ($abs_{amostra}$), segundo a Equação 5:

$$AAO_{DPPH} (\%) = \frac{(abs_{controle} - abs_{amostra})}{abs_{controle}} \cdot 100 \quad (5)$$

4.4.2.2 Método ABTS (ABTS^{•+})

A capacidade de captura do radical catiônico ABTS^{•+} pelos filmes e pelos óleos essenciais, foi avaliada segundo método descrito por Dicastillo et al. (2016), com adaptações. A solução estoque do radical ABTS^{•+}, foi elaborada a partir de uma solução de ABTS (7 mM) em persulfato de potássio (140 mM). As amostras foram solubilizadas utilizando 0,1 g de filme em 5 mL de água destilada e 0,04 g de óleo essencial puro em 50 mL de água destilada. As amostras foram mantidas sob agitação em *Shaker* (Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm, durante 3 h a 25 °C protegidas da luz. Adicionou-se 20 µL das amostras solubilizadas a 280 µL da solução de ABTS^{•+} e a redução de sua absorbância foi obtida a 734 nm em leitora de microplacas (Polaris, MA 616, Belo Horizonte, Brasil) após 30 min ao abrigo da luz. A porcentagem de inibição do radical ABTS foi a resposta obtida para mensurar a atividade antioxidante (AAO_{ABTS}) dos filmes com base nas medidas de absorbância dos reagentes (abs_{controle}) e absorbância das amostras (abs_{amostra}), Equação 6:

$$AAO_{ABTS} (\%) = \frac{(abs_{controle} - abs_{amostra})}{abs_{controle}} \cdot 100 \quad (6)$$

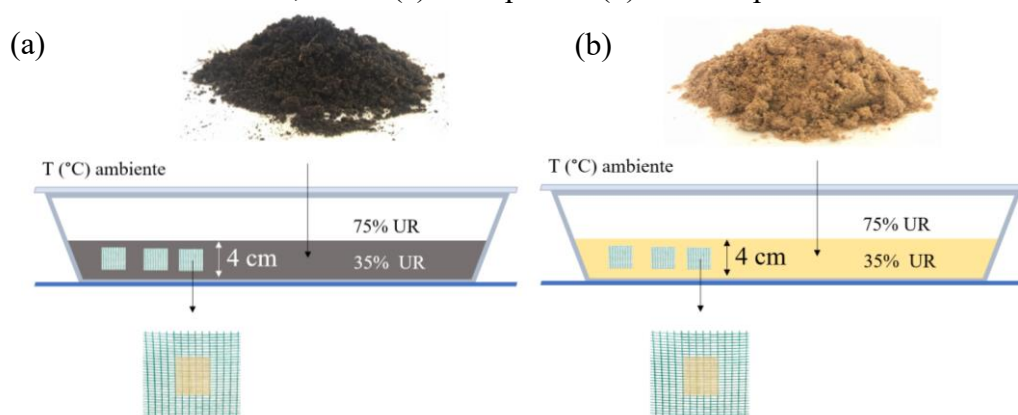
4.4.2.3 Método Poder redutor

O poder redutor dos filmes ativos e dos óleos essenciais, foram determinados de acordo com Moalla et al. (2021) com adaptações para microplacas. Foram solubilizadas 0,1 g de filme em 5 mL de água destilada e 0,04 g de óleo essencial em 5 mL de água destilada, sob agitação em *Shaker* orbital (Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm, protegidas da luz. Após 3 h a 25 °C, 5 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) foram adicionados a cada amostra, e levados novamente sob agitação a 150 rpm, por 15 min a 25 °C. Em microplaca, uma alíquota de 70 µL das amostras solubilizadas foram homogeneizadas com 35 µL de ferricianeto de potássio a 1% (p/v) e incubadas durante 20 min a 50 °C. Em seguida foi adicionado 135 µL de água destilada, 33 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v) e 27 µL de cloreto férrico 0,1% (m/v) e incubou-se durante 10 min a 25 °C. A absorbância das soluções foi mensurada a 700 nm em leitor de microplacas Polaris (Celer, MA 616, Belo Horizonte, Brasil). Quanto maior a absorbância maior é o poder redutor das amostras testadas.

4.5 BIODEGRADABILIDADE

A biodegradação dos filmes foi realizada de acordo com o método descrito por Jaramillo et al. (2017), com modificações. O primeiro solo utilizado foi areia preta coletada no campus da Universidade Federal de Rio Grande e o segundo foi a areia da praia, coletada de acordo com Passos et al. (2011) na área litorânea a 5 m de distância da linha de costa da praia do Cassino em Rio Grande – RS. Os filmes foram cortados em quadrados de 2 x 2 cm e acondicionados em cartuchos de tela. Estes cartuchos foram enterrados 1 cm abaixo da superfície, em caixas plásticas (60 x 40 x 10 cm) contendo 4 cm de solo. As caixas, foram mantidas à temperatura ambiente 25 ± 5 °C e umidade relativa do ar de 75% por 30 dias (Figura 2). A umidade dos solos foi mantida a 35% com aspersão de água em intervalos regulares. A cada 5 dias as amostras eram retiradas do solo, e cuidadosamente, com um pincel removia-se toda a areia e se fazia o registro fotográfico. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 2 – Representação dos sistemas para avaliação da biodegradabilidade dos filmes em solo, sendo (a) areia preta e (b) areia da praia.



T(°C) ambiente: temperatura ambiente; UR: umidade relativa.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os dados foram avaliados pelo programa Statistic (versão 7.0, StatSoft, Inc., Tulsa, Estados Unidos).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

5.1.1 Aspecto visual

Análises visuais e táteis, foram realizadas de forma subjetiva nos filmes após a adição dos óleos essenciais. Características como continuidade, homogeneidade e manuseabilidade foram observadas, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.

A característica de continuidade dos filmes de colágeno, apresentou-se excelente, sem fissuras ou fraturas após a secagem. Mesmo com ausência de partículas insolúveis ou bolhas visíveis ao olho nu, a homogeneidade foi reduzida para boa após a adição dos óleos, devido a coloração levemente desuniforme em algumas amostras. A manuseabilidade ficou um pouco comprometida após a incorporação dos óleos essenciais, devido ao aumento da aderência do filme na superfície das placas de poliestireno, causando alongação e deformação nas extremidades dos filmes de colágeno no momento da remoção das placas de petri (Figura 3).

Os filmes de metilcelulose apresentaram boa continuidade (Figura 4), com regiões mais frágeis e quebradiças nas extremidades após a incorporação dos óleos essenciais. Foram observadas nas superfícies de algumas amostras, pequenas bolhas de ar, isto ocorre devido a capacidade emulsionante da metilcelulose e ao resfriamento da solução para adição dos óleos essenciais, tornando-a mais viscosa e dificultando a remoção total das bolhas de ar mesmo com banho ultrassônico. A manuseabilidade ficou um pouco mais difícil, pois o filme tornou-se mais frágil nas extremidades após a incorporação dos óleos essenciais. Nos filmes FM1-C1, FM1-C2, FM2-C1 e FM2-C2, foram utilizadas placas de petri de vidro, em função da grande aderência nas placas de poliestireno, impossibilitando a remoção dos filmes para avaliação.

Os filmes FM1-T1, FM1-T2, FM2-T1 e FM2-T2, foram avaliados como deficientes em todos os parâmetros. Observou-se após a secagem um aumento da concentração da solução filmogênica no centro da placa, criando uma zona mais espessa, rígida, opaca e com coloração desuniforme, tornando as extremidades finas e quebradiças (Figura 5). De acordo com a avaliação visual, os filmes de metilcelulose adicionados com óleo essencial de tomilho, não apresentaram as características necessárias para dar continuidade aos experimentos propostos neste estudo. Apesar do caráter hidrofóbico dos óleos essenciais, os óleos essenciais de canela e litsea cubeba foram incorporados na solução polimérica de metilcelulose, o que não ocorreu com óleo essencial de tomilho. De acordo com Tongnuanchan et al. (2016) para incorporação uniforme de uma substância oleosa em uma solução filmogênica, é necessário antes realizar a

dispersão em um surfactante devido a diferença de polaridade. O surfactante apresenta comportamento anfifílico, sendo que a parte hidrofóbica uma cadeia carbônica que interage com substâncias apolares, e a hidrofílica ou iônica que reage com substâncias polares, formando soluções filmogênicas homogêneas.

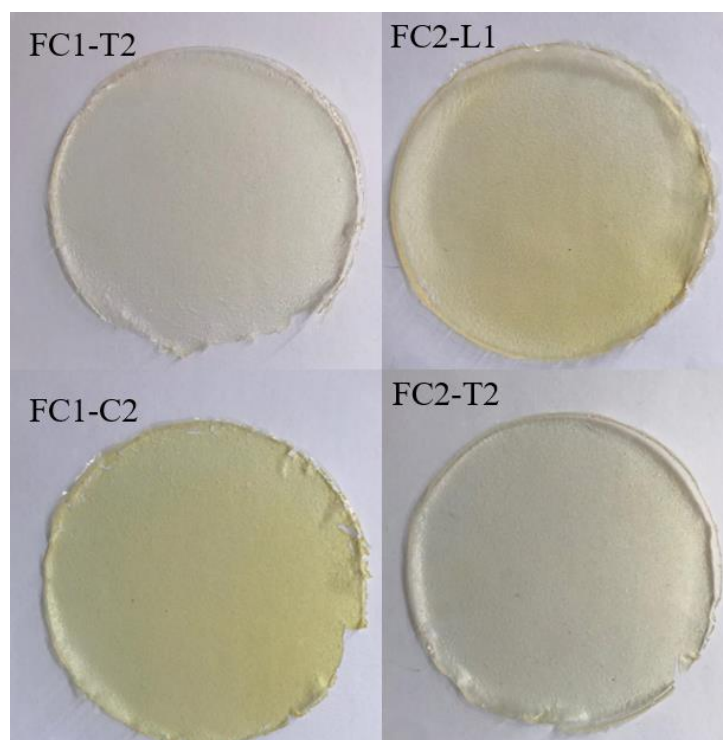
Tabela 2 – Avaliação subjetiva dos filmes.

Filmes	C	H	M
FC1	XXX	XXX	XXX
FC1-C1	XXX	XX	XX
FC1-C2	XXX	XX	XX
FC1-L1	XXX	XX	XX
FC1-L2	XXX	XX	XX
FC1-T1	XXX	XX	XX
FC1-T2	XXX	XX	XX
FC2	XXX	XXX	XXX
FC2-C1	XXX	XX	XX
FC2-C2	XXX	XX	XX
FC2-L1	XXX	XX	XX
FC2-L2	XXX	XX	XX
FC2-T1	XXX	XX	XX
FC2-T2	XXX	XX	XX
FM1	XXX	XXX	XXX
FM1-C1	XX	XX	XX
FM1-C2	XX	XX	XX
FM1-L1	XX	XX	XX
FM1-L2	XX	XX	XX
FM1-T1	X	X	X
FM1-T2	X	X	X
FM2	XXX	XXX	XXX
FM2-C1	XX	XX	XX
FM2-C2	XX	XX	XX
FM2-L1	XX	XX	XX
FM2-L2	XX	XX	XX

Tabela 2 – Avaliação subjetiva dos filmes (continuação).

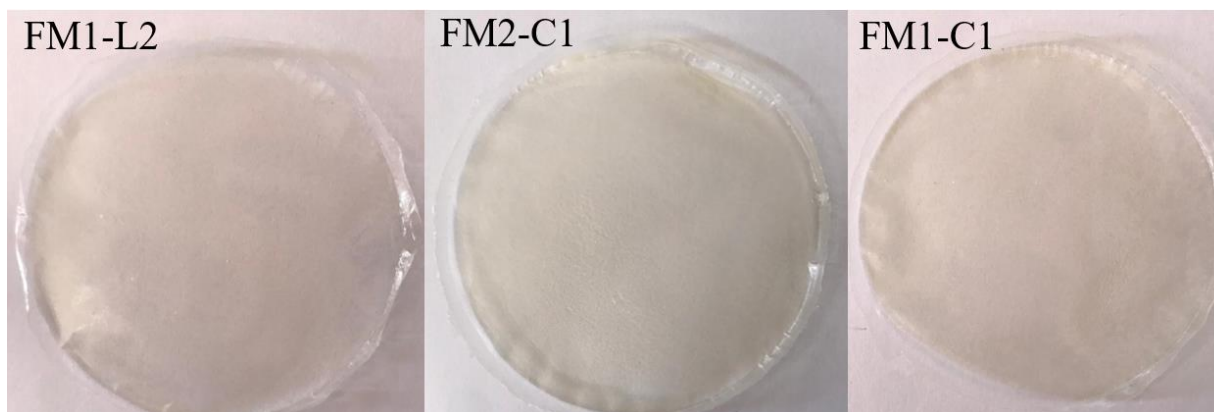
Filmes	C	H	M
FM2-T1	X	X	X
FM2-T2	X	X	X

C: Continuidade; H: Homogeneidade; M: manuseabilidade; XXX excelente; XX boa; X deficiente. FC1: filme de colágeno 6,5%; FC1-C1: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FC1-C2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de canela 0,25%; FC1-L1: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC1-L2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC1-T1: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,5%; FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FC2: filme de colágeno 7,0%; FC2-C1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FC2-C2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de canela 0,25%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC2-L2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC2-T1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,5%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FM1: filme de metilcelulose 1,0%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-C2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,25%; FM1-L1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM1-T1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de tomilho 0,5%; FM1-T2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FM2: filme de metilcelulose 1,5%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM2-C2: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,25%; FM2-L1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FM2-L2: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM2-T1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de tomilho 0,5%; FM2-T2: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%

Figura 3 – Filmes de colágeno com óleos essenciais.

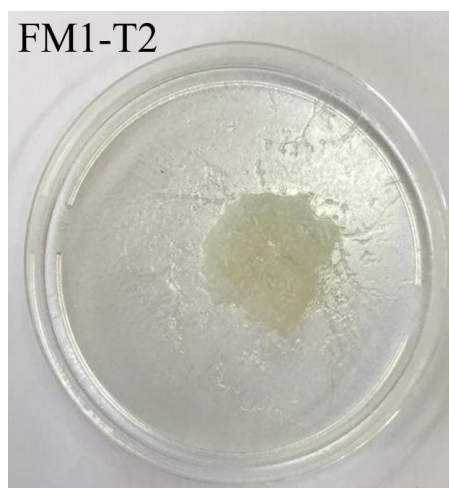
FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC1-C2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de canela 0,25%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%.

Figura 4 – Filmes de metilcelulose com óleos essenciais.



FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%.

Figura 5 – Filme de metilcelulose com óleo essencial de tomilho.



FM1-T2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%.

5.1.2 Espessura, Solubilidade, Permeabilidade e Propriedades Mecânicas

Os filmes foram avaliados separadamente em quatro grupos, de acordo com a concentração do biopolímero e variando somente o tipo e a concentração do óleo essencial utilizado. A Tabela 3, apresenta os resultados da espessura, propriedades mecânicas e de barreira dos filmes com 6,5% de colágeno, adicionados de óleos essenciais de canela, litsea cubeba e tomilho, nas concentrações de 0,5 e 0,25%.

Tabela 3 – Caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 6,5% de colágeno.

Filmes	ESP (mm)	PVA	SOL (%)	TR (MPa)	E (%)
		(g mm/m ² h KPa)			
FC1	0,120±0,007 ^a	0,675±0,027 ^a	76,39±8,13 ^a	2,71±0,26 ^e	97,95±1,51 ^d
FC1-C1	0,130±0,008 ^a	0,675±0,042 ^a	29,60±8,57 ^b	4,03±0,15 ^d	163,87±2,78 ^b
FC1-C2	0,131±0,005 ^a	0,689±0,147 ^a	28,37±5,39 ^b	4,41±0,12 ^{cd}	166,09±4,48 ^b
FC1-L1	0,133±0,004 ^a	0,571±0,126 ^a	25,70±2,82 ^b	4,83±0,91 ^{cd}	164,76±4,41 ^b
FC1-L2	0,131±0,004 ^a	0,524±0,100 ^a	27,92±3,19 ^b	6,33±0,16 ^{ab}	189,48±6,34 ^a
FC1-T1	0,124±0,007 ^a	0,647±0,022 ^a	26,84±3,62 ^b	5,45±0,08 ^{bc}	157,85±3,14 ^b
FC1-T2	0,122±0,004 ^a	0,536±0,083 ^a	31,81±2,13 ^b	6,91±0,32 ^a	121,87±5,37 ^c

ESP: Espessura; PVA: Permeabilidade ao vapor d'água; SOL: Solubilidade em água; TR: Tensão na ruptura; E: Elongação. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$). FC1: filme de colágeno 6,5%; FC1-C1: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FC1-C2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de canela 0,25%; FC1-L1: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC1-L2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC1-T1: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,5%; FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%;

Os filmes de colágeno não apresentaram diferença significativa na espessura, após a incorporação dos óleos essenciais ($p > 0,05$). De acordo com Cázon et al. (2017) quanto maior a concentração de sólidos, maior será a espessura apresentada pelos filmes. Mesmo com a variação na concentração dos óleos essenciais, a espessura dos filmes não diferiu significativamente do filme padrão, não contribuindo para o aumento de sólidos no mesmo volume de dispersão. Hosseini et al. (2016) sugeriram que possíveis perdas de óleo poderiam ocorrer durante a etapa de secagem do filme, o que pode proporcionar uma maior compactação da matriz polimérica, mantendo o filme com a mesma espessura ou até mesmo com menor espessura.

De acordo com a Tabela 3, os valores de permeabilidade ao vapor d'água (PVA), não apresentaram diferença significativa após a incorporação dos óleos essenciais ($p > 0,05$). De acordo com Villadiego et al. (2005) filmes proteicos apresentam caráter hidrofílico, com grupos polares que formam pontes de hidrogênio absorvendo com facilidade a umidade do ambiente, o que afeta significativamente as propriedades de barreira dos filmes. Mesmo com o aumento da hidrofobicidade, característica dos OEs, esses não apresentaram efeito significativo na redução da PVA dos filmes. O mesmo resultado para a PVA foi obtido por Li et al. (2014), com filmes à base de gelatina incorporados com diferentes extratos de semente de uva e gengibre, onde não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Oliveira et al.

(2020) produziram filmes de goma de caju e gelatina, sem alteração significativa na PVA após a reticulação com ácido ferúlico e incorporação de óleo essencial capim-limão.

As solubilidades dos filmes de colágeno apresentaram uma diferença significativa do filme padrão. Uma redução média de mais de 60% da solubilidade foi obtida após a incorporação dos óleos essenciais na matriz polimérica. Compostos fenólicos naturais contendo anel aromático e grupos hidroxila podem interagir com proteínas devido a formação de ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, além das interações hidrofóbicas não covalentes. A distribuição uniforme pela matriz, aliado ao comportamento hidrofóbico que o óleo essencial possui, contribuem assim para um produto com maior resistência a dissolução em água (YU et al., 2015). Resultado semelhante foi obtido por Bhuimbar, Bhagwat e Dandge (2019) quando adicionou 5% de extrato da casca de romã em filmes de colágeno-quitosana e observaram uma redução significativa na solubilidade de 50% para 18,1%.

O ensaio mecânico de tensão na ruptura (TR) apresentou um aumento significativo após a incorporação dos óleos essenciais, diferindo estatisticamente do padrão ($p < 0,05$). O filme FC1-T2 apresentou o maior resultado de TR (6,91 MPa), seguido pelo filme FC1-L2 (6,33 MPa) quando comparados ao padrão FC1 (2,71 MPa). Ao comparar os filmes adicionados com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho, FC1-T2 (6,91 MPa) e FC1-T1 (5,45 MPa), observou-se uma diferença significativa, onde o filme com a menor porcentagem de óleo essencial apresentou a maior resistência na ruptura. O mesmo resultado foi obtido, entre os filmes incorporados com OE de litsea cubeba, FC1-L2 (6,33 MPa) é significativamente maior que FC1-L1 (4,83 MPa). Segundo Wu et al. (2018), este comportamento pode ocorrer quando pequenas quantidades de compostos são adicionadas em filmes proteicos, sem afetar as interações inter e intramoleculares, podendo melhorar a resistência e elasticidade dos filmes. No entanto, em concentração elevada, a estrutura da rede de colágeno pode ser interrompida. Os filmes FC1-C1 e FC1-C2, não apresentaram diferença significativa entre si, após adição do OE canela, mas se diferenciaram do padrão.

De acordo com Sothornvit e Krochta, (2001) e Tongnuanchan et al. (2016), as propriedades mecânicas são afetadas com a incorporação de óleos essenciais na matriz polimérica dos filmes. Estes são capazes de aumentar o volume livre entre as moléculas de proteínas e proporcionar maior mobilidade, causando assim uma maior flexibilidade e menor resistência dos filmes resultantes. No entanto, a quantidade adicionada e as diferentes composições químicas dos óleos essenciais podem também influenciar as ligações ou interações com as moléculas de proteína na matriz do filme, produzindo um aumento nessas propriedades mecânicas. Sun et al. (2021) elaboraram filmes de gelatina com diferentes concentrações de

nanoemulsões de óleo essencial de lavanda. Segundo os autores em baixas concentrações os filmes aumentaram o valor da TR de 40 a 140 MPa e em seguida, diminuíram com o aumento do conteúdo de óleo essencial.

A adição dos óleos essenciais, apresentou grande influência na elongação (E) dos filmes elaborados, com um aumento significativo ($p < 0,05$) nos resultados obtidos neste ensaio mecânico. O filme FC1-L2 obteve o maior valor de E com 189,48%, quase o dobro do valor do filme padrão (FC1) 97,95%. A elongação aumentada nos filmes de colágeno contendo OEs foi provavelmente causada, pela menor interação entre as cadeias proteicas da matriz do filme devido a presença dos OEs, aumentando assim a flexibilidade. Resultado semelhante foi obtido por Silva et al. (2021) quando observou o aumento de E em filmes de gelatina de pescado incorporados com diferentes óleos essenciais. A elongação dos filmes de colágeno 6,5% produzidos nesse estudo são comparáveis ao polietileno de alta densidade 150% e muito inferiores ao polietileno de baixa densidade 400% (LEE et al., 2019).

As propriedades mecânicas TR e E são importantes na caracterização de filmes, pois expressam a resistência do material ao alongamento e ao rompimento quando submetido à tração. As propriedades mecânicas dos filmes devem resistir ao estresse normal encontrado durante sua aplicação e serem flexíveis o suficiente para adaptar-se a eventuais deformações dos alimentos mantendo sua integridade (CAZÓN et al.; 2017; WIHODO; MORARU, 2013).

A Tabela 4, apresenta os resultados da caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 7% de colágeno, adicionados de óleos essenciais de canela, litsea cubeba e tomilho, nas concentrações de 0,5 e 0,25%.

De acordo com a Tabela 4, os filmes não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) na espessura após a adição dos óleos essenciais quando comparados ao padrão FC2. Resultado semelhante foi obtido por Fonseca et al. (2020) ao incorporar diferentes concentrações de dióxido de titânio (TiO_2) em filmes de gelatina sem alterar significativamente a espessura. Segundo Ahmad et al. (2012) os OEs podem ser perdidos em diferentes graus durante a etapa de secagem dos filmes, devido a sua volatilidade e capacidade de ligação do óleo a matriz polimérica, resultando na formação de uma estrutura mais ou menos compacta.

A espessura do filme desempenha um papel importante nas propriedades físicas dos filmes e nas propriedades de barreira, incluindo a PVA. A menor permeabilidade ao vapor d'água foi obtida para o filme FC2-L1 com $0,547 \text{ g mm/m}^2 \text{ h KPa}$, resultado expressivo quando comparado ao filme FC2 com $0,811 \text{ g.mm/m}^2 \text{ .h.KPa}$, obtendo assim uma redução de aproximadamente 32% na PVA. Tendência semelhante foi encontrada por Pelissari et al. (2009) e Hosseini et al. (2016) em filmes adicionados de óleos essenciais. Pode-se presumir que as

interações dos constituintes do óleo com as proteínas poderiam induzir a diminuição na natureza hidrofílica da matriz proteica. Em geral, menores taxas de PVA são desejáveis ao se tratar de embalagens para alimentos (BOURTOOM, 2008), pois para a conservação é importante evitar a desidratação ou absorção de umidade do meio ambiente (CAZÓN et al., 2017).

Tabela 4 – Caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 7% de colágeno.

Filmes	ESP (mm)	PVA	SOL (%)	TR (MPa)	E (%)
		(g mm/m ² h KPa)			
FC2	0,128±0,013 ^a	0,811±0,029 ^a	65,63±3,59 ^a	5,76±0,35 ^{bc}	196,47±4,82 ^a
FC2-C1	0,132±0,005 ^a	0,729±0,096 ^{ab}	23,34±1,89 ^b	5,25±0,15 ^c	163,46±5,83 ^{bc}
FC2-C2	0,129±0,006 ^a	0,573±0,132 ^{ab}	26,15±5,42 ^b	5,56±0,35 ^c	154,03±8,34 ^c
FC2-L1	0,140±0,003 ^a	0,547±0,086 ^b	24,82±1,98 ^b	7,22±0,48 ^a	137,67±4,67 ^d
FC2-L2	0,142±0,004 ^a	0,593±0,146 ^{ab}	26,84±1,82 ^b	6,71±0,38 ^{ab}	157,45±5,39 ^{bc}
FC2-T1	0,133±0,004 ^a	0,572±0,028 ^{ab}	22,43±1,81 ^b	6,46±0,14 ^{ab}	161,40±5,05 ^{bc}
FC2-T2	0,129±0,004 ^a	0,563±0,040 ^{ab}	23,54±1,75 ^b	7,41±0,49 ^a	169,44±2,43 ^b

ESP: Espessura; PVA: Permeabilidade ao vapor d'água; SOL: Solubilidade em água; TR: Tensão na ruptura; E: Elongação. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$). FC2: filme de colágeno 7,0%; FC2-C1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FC2-C2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de canela 0,25%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC2-L2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC2-T1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,5%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%;

A solubilidade dos filmes de colágeno produzidos com os óleos essenciais, apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) em comparação ao filme padrão (FC2). Observou-se uma redução média de mais de 60% da solubilidade dos filmes, após a incorporação do óleo essencial na matriz polimérica. Esta redução da solubilidade se deve ao comportamento hidrofóbico do óleo essencial e a homogeneidade na incorporação do óleo pelo polímero, contribuindo assim para um produto mais coeso e menos solúvel em água (TURHAN; SAHBAZ, 2004; YU et al., 2014).

A tensão na ruptura (TR) dos filmes de colágeno, apresentaram diferenças significativas nos resultados. Um aumento significativo da TR em relação ao padrão FC2 (5,76 MPa) foi obtido nos filmes FC2-T2 (7,41 MPa) e FC2-L1 (7,22 MPa). Resultado semelhante ao obtido por Sivarrooban, Hettiarachchy e Johnson (2008), após adicionar extrato de semente de uva em filmes de proteína de soja. Os filmes com OE de canela FC2-C1 e FC2-C2 não apresentaram diferença significativa do filme padrão Segundo Ahmad et al. (2012) os OEs apresentam diferentes compostos fenólicos que afetam a interação com a proteína de formas

diferentes. Essa diferença pode ocorrer devido as características estruturais dos compostos, causando à quebra de interações moleculares no filme, resultando em um filme descontínuo em comparação com o filme controle. Quando incorporados em um nível adequado, podem fortalecer a matriz do filme pelo aumento da interação entre as cadeias das proteínas.

Os resultados obtidos no ensaio mecânico de alongação (E) apresentaram uma redução significativa após a incorporação dos OEs. O filme FC2-T2 obteve a menor diferença de E, 169,44%, apresentando uma redução de 13% em relação ao padrão FC2 de 196,47%. O filme FC2-L1 apresentou a maior redução na alongação 137,67%, quase 30% quando comparado ao filme padrão. Resultado semelhante foi obtido por Wu et al. (2017) com redução de 20% na alongação de filmes de gelatina de pele de pescado, incorporados com diferentes concentrações de óleo essencial de canela. De acordo com Hosseini, Razavi e Mousavi (2009) e Wu et al., (2017), estas mudanças podem ter ocorrido por interações formadas entre as moléculas de proteína e dos óleos essenciais, diminuindo a flexibilidade e mobilidade dos filmes. Além disso, o OE é geralmente líquido à temperatura ambiente e sua presença na estrutura do filme na forma de gotículas de óleo pode facilmente deformar, fazendo com que a distribuição da força externa em cada vínculo de matriz torna-se desigual, levando a um declínio da resistência mecânica do sistema.

A Tabela 5, apresenta os resultados da caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 1,0% de metilcelulose, adicionados de óleos essenciais de canela e litsea cubeba, nas concentrações de 0,5 e 0,25%.

As espessuras dos filmes de metilcelulose não apresentaram diferença significativa após a incorporação dos óleos essenciais. As concentrações dos OEs adicionados foram insuficientes para aumentar a matéria sólida na solução filmogênica e produzir uma variação significativa na espessura dos filmes após o processo de secagem. Resultado semelhante foi obtido por Kalkan, Otağ e Engin (2020) após adicionar extrato de ruibargo sírio (*Rheum ribes L.*) em filmes de metilcelulose e Silva et al. (2019) quando incorporaram curcumina nativa em filmes de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes de metilcelulose incorporados de OEs, apresentaram diferença significativa. Ao compararmos os filmes FM1-C2 (0,229 g mm/m² h KPa) e FM1-C1 (0,165 g mm /m² h Kpa), com diferentes concentrações de OE de canela, observamos uma redução significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 28% na PVA, com o aumento da concentração do OE. O mesmo ocorre com os filmes elaborados com OE de litsea cubeba, os valores de PVA diminuem significativamente em 36% com o aumento da concentração dos OE. Resultados semelhantes foram obtidos por Lee et al. (2019), ao adicionar

óleo essencial de orégano em filmes de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Segundo o autor a maior concentração de OE influenciou na redução da PVA, devido ao aumento da hidrofobicidade característica dos OEs. Os resultados obtidos para os filmes FM1-C2 e FM1-L2, também foram semelhantes a PVA do celofane $0,248 \text{ g mm/m}^2 \text{ h Kpa}$ e superiores ao polietileno de baixa densidade $0,0072 \text{ g mm /m}^2 \text{ h Kpa}$ (HOSSEINI et al., 2015), ambos polímeros utilizados em embalagens de alimentos.

Tabela 5 – Caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 1,0% de metilcelulose.

Filmes	ESP (mm)	PVA (g mm/m ² h KPa)	SOL (%)	TR (MPa)	E (%)
FM1	0,036±0,008 ^a	0,219±0,022 ^{ab}	100±0,00 ^a	33,82±0,89 ^a	13,88±5,63 ^b
FM1-C1	0,042±0,001 ^a	0,165±0,022 ^b	92,84±6,10 ^a	20,72±0,58 ^b	11,59±0,68 ^b
FM1-C2	0,045±0,014 ^a	0,229±0,019 ^a	96,21±2,21 ^a	21,23±1,78 ^b	12,70±2,26 ^b
FM1-L1	0,066±0,047 ^a	0,166±0,018 ^b	90,15±5,84 ^a	15,45±0,26 ^c	10,94±1,11 ^b
FM1-L2	0,039±0,002 ^a	0,259±0,030 ^a	95,17±2,92 ^a	34,56±1,04 ^a	25,97±1,05 ^a

ESP: Espessura; PVA: Permeabilidade ao vapor d'água; SOL: Solubilidade em água; TR: Tensão na ruptura; E: Elongação. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$). FM1: filme de metilcelulose 1,0%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-C2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,25%; FM1-L1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%;

As solubilidades dos filmes de metilcelulose não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). Durante a obtenção da metilcelulose, grupos hidroxila de celulose são substituídos por grupos metoxila e as ligações de hidrogênio são enfraquecidas, resultando em alta solubilidade da metilcelulose (VIERA et al., 2007). Yu et al. (2015) sugerem que este comportamento pode ser reduzido pela adição de maiores concentrações de compostos ativos, aumentando as ligações de hidrogênio entre seus grupos OH e a estrutura do filme. As interações hidrofóbicas específicas e as ligações de hidrogênio podem levar à reticulação física da metilcelulose, capaz de converter o filme de metilcelulose solúvel em insolúvel.

A tensão na ruptura (TR) obtida no filme FM1-L2 (34,56 MPa) não apresentou diferenças significativa do filme padrão FM1 (33,82 MPa) após a incorporação dos OEs. Os demais filmes FM1-C1 (20,72 MPa), FM1-C2 (21,23 MPa) e FM1-L1 (15,45 MPa) apresentaram uma redução nos valores da tensão na ruptura após a adição dos óleos essenciais. De acordo com Moghimi, Aliahmadi e Rafati (2017) e Sánchez-González et al., (2009), as diferenças entre as propriedades mecânicas podem ser atribuídas às diferentes composições

químicas dos OEs e diferentes interações com as cadeias do polímero. A diminuição da TR ocorre, provavelmente, devido à geração de descontinuidades na matriz do polímero quando o óleo essencial é incorporado, resultando na substituição de interações polímero-polímero que são mais fortes por interações polímero-óleo que são mais fracas. Efeito semelhante dos OEs nas propriedades mecânicas de filmes também foi relatado em estudos anteriores por Hosseini et al. (2015) e Lee et al. (2019).

A elongação (E) nos filmes FM1-C1, FM1-C2 e FM1-L1 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) após a adição dos óleos essenciais. No entanto, o filme FM1-L2 obteve um aumento significativo de, aproximadamente, 87% na elongação após a incorporação do OE de litsea cubeba. O efeito dos compostos ativos nas propriedades mecânicas de filmes de metilcelulose, podem reduzir a atração intermolecular, formando ou bloqueando as ligações de hidrogênio entre as cadeias do polímero. Resultando em uma matriz menos rígida, promovendo o movimento das cadeias do polímero e aumentando a elasticidade do filme (KLANGMUANG; SOTHORNVIT, 2016; SUPPAKUL et al., (2016); TONGNUANCHAN et al., 2016).

A Tabela 6, apresenta os resultados da caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 1,5% de metilcelulose, adicionados de óleos essenciais de canela e litsea cubeba, nas concentrações de 0,5 e 0,25%.

Tabela 6 – Caracterização e propriedades mecânicas dos filmes com 1,5% de metilcelulose.

Filmes	ESP (mm)	PVA (g mm/m ² h KPa)	SOL (%)	TR (MPa)	E (%)
FM2	0,051±0,003 ^a	0,341±0,024 ^a	100±0,00 ^a	37,85±1,9 ^a	14,61±4,89 ^a
FM2-C1	0,048±0,001 ^a	0,204±0,011 ^{cd}	91,84±1,93 ^b	21,61±0,51 ^c	15,25±4,06 ^a
FM2-C2	0,051±0,002 ^a	0,238±0,020 ^{bc}	95,51±2,82 ^{ab}	32,11±0,77 ^b	21,03±7,34 ^a
FM2-L1	0,054±0,004 ^a	0,185±0,001 ^d	94,39±1,36 ^b	35,75±1,95 ^{ab}	20,26±0,96 ^a
FM2-L2	0,054±0,003 ^a	0,279±0,016 ^b	96,09±0,96 ^{ab}	38,45±3,26 ^a	16,57±4,78 ^a

ESP: Espessura; PVA: Permeabilidade ao vapor d'água; SOL: Solubilidade em água; TR: Tensão na ruptura; E: Elongação. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$). FM2: filme de metilcelulose 1,5%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM2-C2: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,25%; FM2-L1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FM2-L2: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%;

A espessura dos filmes de metilcelulose não apresentaram diferença significativa após a adição dos óleos essenciais. Choi, Singh e Lee (2016) apresentaram resultados

semelhantes ao incorporar com óleos essenciais de orégano e bergamota em filmes de metilcelulose.

Ao avaliar a permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes, os fatores para serem considerados são a estrutura do polímero e a sua interação com o óleo essencial. Como pode ser visto na Tabela 6, os filmes de metilcelulose apresentaram uma redução na PVA após a incorporação dos OEs, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) do filme padrão FM2. Polissacarídeos como a metilcelulose, são polímeros hidrofílicos e esta característica contribui para o aumento da PVA destes materiais. No entanto, a adição de óleos essenciais na preparação do filme resultou em uma redução significativa na permeabilidade destes filmes, reduzindo tanto a solubilidade quanto a difusividade das moléculas de água através da matriz do filme. Yu et al. (2015) também observaram redução da PVA de filmes ativos de metilcelulose reticulada com catequinas de chá.

Os filmes de metilcelulose (FM2) apresentaram 100% de solubilidade em água, após a incorporação dos óleos essenciais esta capacidade reduziu significativamente para 91,84 e 94,39%, nos filmes FM2-C1 e FM2-L1, respectivamente.

A resistência mecânica é necessária para um filme manter sua integridade e tolerar o estresse externo. A influência da incorporação dos OEs na tensão na ruptura (TR) causou uma significativa queda ($p < 0,05$) nos filmes com óleo essencial de canela FM2-C1 (21,61 MPa) e FM2-C2 (32,11 MPa) quando comparados ao padrão FM2 (37,85 MPa). FM2-L1 (35,75 MPa) e FM2-L2 (38,45 MPa), não apresentaram diferença significativa quando comparados ao padrão. Isso coincide com os resultados relatados por outros autores, Klangmuang e Sothornvit (2016) e Sánchez-González et al. (2009) quando adicionaram diferentes tipos de OEs à matriz de filmes de hidroxipropilmetilcelulose, produzindo diminuição das propriedades mecânicas. No entanto, o TR dos filmes produzidos ainda é comparável ao do polietileno de alta densidade (22-23 MPa) e polietileno de baixa densidade (19-44 MPa), que são comumente usados em embalagens comerciais (LEE et al., 2019)

A elongação nos filmes de metilcelulose apresentados na Tabela 6, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Resultado semelhante foi obtido por Lee et al. (2019) ao adicionar nanoemulsão de óleo essencial de tomilho em filmes de metilcelulose e por Hosseini et al. (2015) que incorporam óleo essencial de orégano em filmes de gelatina de pescado e quitosana. Esta propriedade mecânica avalia a plasticidade dos filmes, e mesmo sem diferença estatística, observa-se um aumento na elongação para todas as amostras após a incorporação dos OEs à matriz polimérica. Isso pode ser atribuído a atividade plastificante do

óleo essencial que resultou no aumento das propriedades dúcteis (KLANGMUANG; SOTHORNVIT, 2016).

5.1.3 Propriedades Térmicas

A avaliação das propriedades térmicas nos filmes de colágeno e metilcelulose adicionados de óleos essenciais, foram realizadas nos filmes que apresentaram os melhores resultados em relação as características, e propriedades mecânicas e de barreira para aplicação como embalagem de alimentos. As propriedades térmicas dos filmes foram avaliadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC), onde obteve-se a temperatura média de dois picos endotérmicos, temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_m). E também, análise termogravimétrica (TGA) que mostra a perda de massa dos filmes até a temperatura de fusão (T_m). Estas propriedades são capazes de descrever o comportamento dos filmes sob diferentes condições de temperatura e fluxo de calor, relacionando a mobilidade das cadeias poliméricas e a degradação térmica.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 7, todos os filmes de colágeno e metilcelulose, apresentaram um aumento na temperatura de transição vítrea (T_g) após a adição dos óleos essenciais. Devido as novas interações formadas entre os biopolímeros e os óleos essenciais diminuir a mobilidade, tornou-se necessário mais energia para ocorrer a transição vítrea, em média a temperatura aumentou aproximadamente 37% nos filmes de metilcelulose e 10% nos filmes de colágeno. Esse aumento de temperatura é necessário para o aquecimento do material polimérico, que está em um nível muito baixo de temperatura, permitindo assim que as cadeias do polímero que estão em uma fase amorfa, se tornarem móveis, alterando a conformação da estrutura (HALIM; KAMARI; PHILLIP, 2018). Desta forma os filmes ativos podem ser submetidos a temperaturas maiores que os filmes controles.

O segundo pico endotérmico obtido na análise de DSC, corresponde à temperatura de fusão (T_m), representando a temperatura necessária capaz de elevar o estado de agitação molecular do composto, para que os os filmes passem do estado sólido para o estado líquido (SCUDELER et al., 2020). A T_m em todos os filmes de metilcelulose apresentaram valores superiores a 200 °C, com as maiores temperaturas de fusão para os filmes FM1-C1 (282 °C) e FM2-L1 (268 °C). Um aumento expressivo na temperatura de fusão (T_m), também foi observado nos filmes de colágeno FC2-T2 e FC1-T2, ambos os filmes adicionados de óleo essencial de tomilho, atingindo 270 °C. Este aumento na temperatura de fusão (T_m) pela

presença do óleo essencial mostra quando as cadeias do biopolímero mudam de estado, adquirindo mobilidade e viscosidade, aumentando a estabilidade térmica dos filmes. O aumento da estabilidade ao calor pode ser atribuído à natureza mais hidrofóbica e maior massa molar dos OEs. Este resultado está de acordo com os obtidos por Ahmad et al. (2012) e Ghasemlou et al (2011), que observaram aumento significativo da estabilidade térmica de filmes após a adição de lipídios. Nisar et al. (2018) também obtiveram aumento na T_m após a incorporação de OE de cravo em filmes de pectina.

Tabela 7 – Propriedades térmicas dos filmes de colágeno e metilcelulose, obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA).

Filmes	DSC		TGA
	Tg (°C)	Tm (°C)	Perda de massa (%) até Tm (°C)
FC1	79	193	17,7
FC1-L2	86	195	17,3
FC1-T2	81	270	28,0
FC2	77	184	18,5
FC2-L1	85	197	14,0
FC2-T2	90	270	25,3
FM1	55	209	17,1
FM1-C1	89	282	22,3
FM1-L2	86	259	20,5
FM2	54	211	23,0
FM2-C1	79	256	16,0
FM2-L1	90	268	21,3

Tg: temperatura de transição vítrea; Tm: temperatura de fusão; FC1: filme de colágeno 6,5%; FC1-L2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FC2: filme de colágeno 7,0%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FM1: filme de metilcelulose 1,0%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM2: filme de metilcelulose 1,5%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM2-L1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%.

Os resultados da perda de massa (TGA) até a T_m , mostraram que os filmes FC2-L1 (14%) e FM2-C1 (16%), apresentaram maior estabilidade térmica do que os filmes controles

FC2 (18,5%) e FM2 (23%). A perda de massa no primeiro estágio de aquecimento, variou entre as temperaturas de 79 e 90°C nos filmes de colágeno e, 54 e 90°C nos filmes de metilcelulose. O primeiro estágio de perda de massa pode ser devido à evaporação de água, já que todas as amostras são mantidas em ambiente com umidade controlada a 55%. As temperaturas em um segundo estágio ficaram entre 184 e 270 °C para os filmes de colágeno e, entre 209 e 282 °C para os filmes de metilcelulose. Nesta segunda faixa de temperatura, a porcentagem de perda de massa pode estar relacionada à perda da água estrutural, óleos essenciais ligados a matriz, glicerol e dos biopolímeros. Este aumento de temperatura após a incorporação dos óleos essenciais pode ser devido à alta estabilidade das ligações formadas entre os grupos funcionais dos OEs e dos biopolímeros, que exigiu temperaturas mais altas para romper essas ligações.

Os resultados das propriedades térmicas estão de acordo com o ensaio mecânico de tensão na ruptura (TR) e solubilidade para os filmes de colágeno FC1-T2 e FC2-T2, apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Isto é, mostrou que a interação entre o OE e a matriz polimérica formou uma ligação química estável, capaz de aumentar a resistência térmica e mecânica e, reduzir a solubilidade dos filmes. Para o filme de metilcelulose FM1-C1, mesmo com um alto valor de T_m (282 °C), o ensaio de tensão na ruptura apresentou uma redução significativa após a incorporação dos OEs e não influenciou na redução da solubilidade do filme (Tabela 5). No filme FM2-L1, o valor da TR, não apresentou diferença significativa do filme controle, no entanto reduziu significativamente a PVA e a solubilidade (Tabela 6) e aumentou a resistência térmica. Estes parâmetros são essenciais para aplicação dos biopolímeros como material de embalagem, pois demonstram as potencialidades e as limitações de cada material para moldagem e aplicação como embalagens.

5.1.4 Propriedades microestruturais

5.1.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Imagens do microscópio eletrônico de varredura (MEV) fornecem informações visuais sobre a homogeneidade da superfície e da seção transversal dos filmes, presença de materiais insolúveis, corpos estranhos, bolhas, fissuras e outros. A interação entre os componentes da formulação, bem como, a influência dos parâmetros do processo de preparo, podem influenciar diretamente na estrutura final de um filme. Um filme homogêneo pode ser considerado um indicador de integridade estrutural, e sugere que as propriedades mecânicas e PVA de tais filmes sejam boas (NISAR et al., 2018; SILVA et al., 2019). As micrografias da

superfície e seção transversal dos filmes, combinados com diferentes concentrações de OEs, são apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

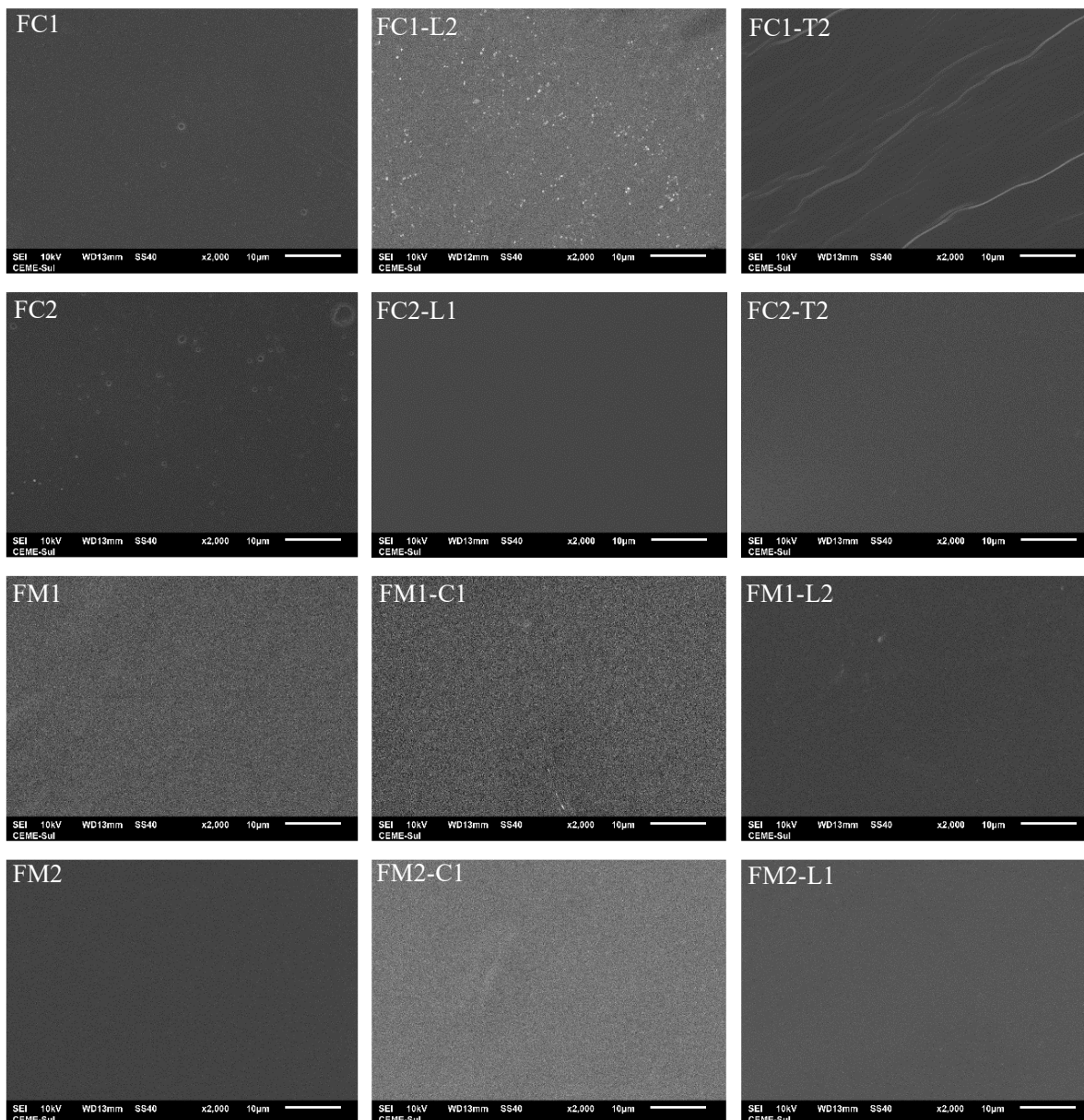
Os filmes de colágeno FC1 e FC2 sem a incorporação dos OEs, apresentaram pequenas bolhas de ar na superfície, e na seção transversal, mostraram algumas ranhuras longitudinais, criando um aspecto de camadas, além de partículas dispersas. Após a adição do OE de litsea cubeba no filme FC1-L2, observou-se a presença de pequenas partículas insolúveis sobre a superfície do filme, assim como, a presença de algumas fissuras na seção transversal. No filme adicionado de OE de tomilho FC1-T2, destacam-se irregularidades sobre a superfície do filme, formando ondulações, que podem ser melhor observadas na imagem da seção transversal, juntamente com a presença de partículas e fissuras. A imagem da superfície dos filmes FC2-L1 e FC2-T2, eram lisas e uniformes, no entanto, na seção transversal do filme FC2-L1, é possível evidenciar um aspecto mais denso, onde é possível visualizar a distribuição estruturada do OE de litsea com a matriz de colágeno, formando uma rede compacta. Resultado semelhante aos obtidos por Sun et al. (2021) quando incorporou 100µL de OE de lavanda em filmes de gelatina, apresentando superfícies lisas e seção transversal formando estruturas em camadas mais densas após modificação por OE. No filme FC2-T2, as fissuras estavam presentes por toda a seção transversal da amostra, com a presença de partículas na matriz do filme. Soofi et al. (2021) apresentaram fissuras semelhantes na superfície de filmes à base de pó residual de limão produzido com a incorporação de diferentes concentrações de nanofibras de celulose.

As imagens de MEV da superfície das amostras dos filmes de metilcelulose, com e sem a adição dos OEs, mostradas na Figura 6, apresentaram-se lisas e homogêneas. Resultado semelhante foi obtido por Halim, Kamari e Phillip (2018) ao observar a superfície de filmes de metilcelulose incorporados com ácido tânico e Vieira et al. (2020) ao incorporar nanopartículas de prata em filmes de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). O filme controle FM1, apresentou na imagem da seção transversal um aspecto denso e rugoso, provavelmente isso aconteceu devido ao recorte irregular do filme no preparo da amostra. Quando observamos a seção transversal das amostras FM2, FM2-C1, FM2-L1 e FM1-C1, é possível visualizar perda de parte da homogeneidade e da integridade estrutural. Neste caso, observou-se uma laminação por toda extensão longitudinal das amostras, indicando uma possível separação de fases entre os componentes. Devido à sua hidrofobicidade característica, os OEs podem não ser totalmente incorporados na matriz polimérica, ocasionando uma separação de fases durante o processo de secagem dos filmes. O Filme FM1-L2 apresentou nas respectivas imagens de superfície e seção transversal excelente homogeneidade e compactação. Estrutura semelhante foi obtida por Sun

et al. (2019), ao produzir filmes ativos de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) com κ -carragenina.

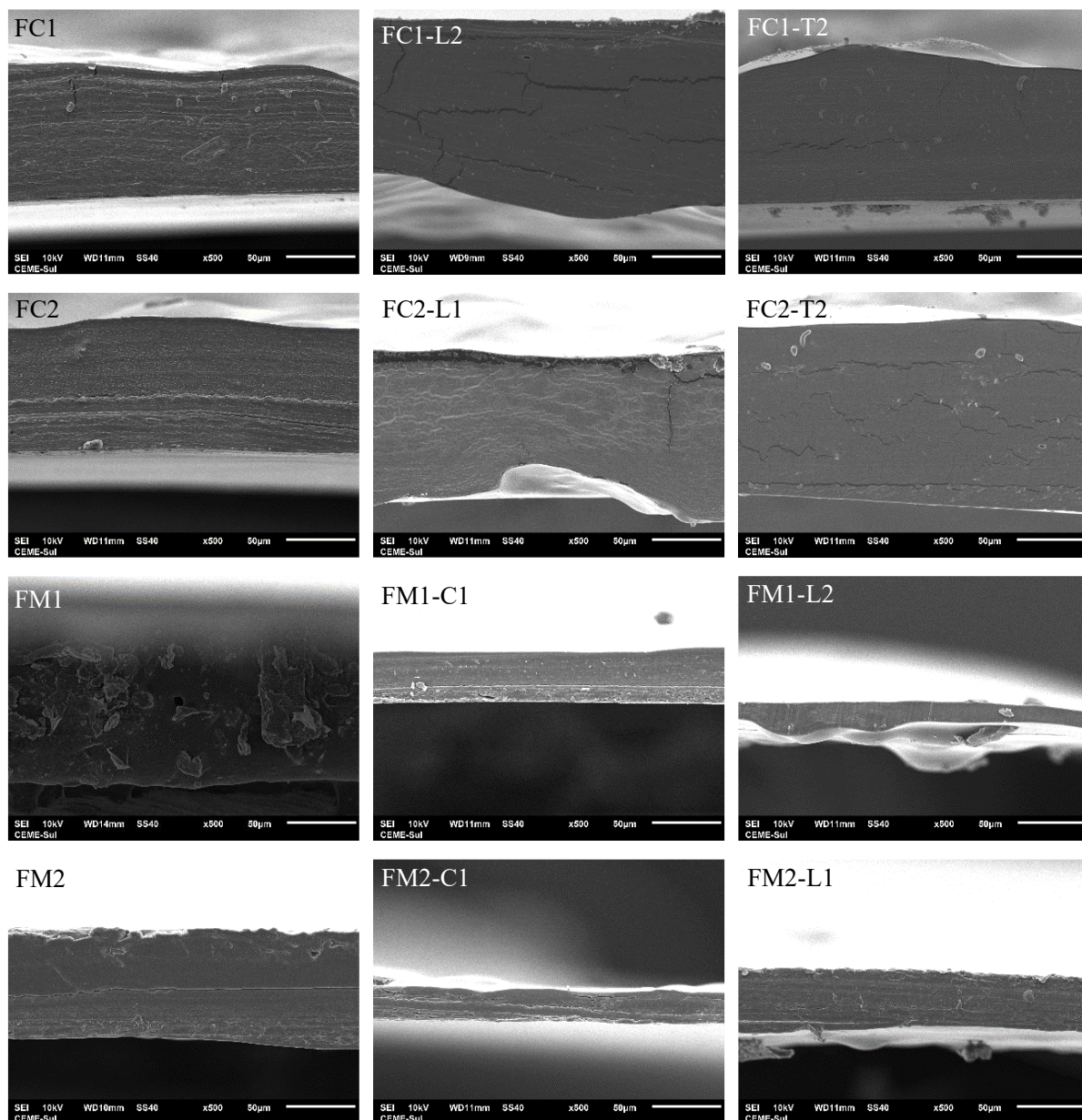
De acordo com os resultados obtidos por MEV, os filmes de colágeno FC2-L1 e metilcelulose FM1-L2, ambos adicionados de óleo essencial de litsea cubeba, apresentaram maior homogeneidade na superfície e seção transversal. Ao associarmos as imagens de MEV com os resultados dos ensaios mecânicos, observamos que o filme FC2-L1 aumentou o valor da TR e diminuiu a PVA. O filme FM1-L2 não apresentou diferença significativa após a adição dos OEs para TR e PVA. Este conceito é notável, levando em consideração que além da vantagem de usar óleos essenciais para fornecer bioatividade, eles também podem contribuir para a melhoria de outras propriedades importantes para o revestimento de alimentos, como propriedades de mecânicas e PVA.

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura na superfície dos filmes.



FC1: filme de colágeno 6,5%; FC1-L2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FC2: filme de colágeno 7,0%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FM1: filme de metilcelulose 1,0%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM2: filme de metilcelulose 1,5%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM2-L1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%.

Figura 7- Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal.



FC1: filme de colágeno 6,5%; FC1-L2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FC2: filme de colágeno 7,0%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FM1: filme de metilcelulose 1,0%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM2: filme de metilcelulose 1,5%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM2-L1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%.

5.1.4.2 Cristalinidade por difração de raios X (DRX)

Através da análise de difração de raios X (DRX), é possível verificar a formação de estruturas cristalinas no polímero, auxiliando na caracterização morfológica e tecnológica dos filmes. Filmes biodegradáveis possuem porções cristalinas e amorfas e a variação dessas proporções influenciam diretamente nas diferentes propriedades dos materiais. A fim de investigar a influência do óleo essencial na estrutura cristalina dos filmes, análises de DRX foram realizadas. A Tabela 8 apresenta a porcentagem de cristalinidade dos filmes de colágeno e metilcelulose, adicionados de óleos essenciais.

Tabela 8 – Cristalinidade dos filmes de colágeno e metilcelulose

Filmes	Cristalinidade (%)
FC1	35,5
FC1-L2	37,2
FC1-T2	39,5
FC2	36,1
FC2-L1	37,5
FC2-T2	36,4
FM1	49,1
FM1-C1	50,7
FM1-L2	53,3
FM2	48,3
FM2-C1	49,9
FM2-L1	52,1

FC1: filme de colágeno 6,5%; FC1-L2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FC2: filme de colágeno 7,0%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FM1: filme de metilcelulose 1,0%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM2: filme de metilcelulose 1,5%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM2-L1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%.

De acordo com os resultados apresentados na análise de DRX (Tabela 8), é possível observar um aumento na cristalinidade de todos os filmes após a incorporação dos óleos essenciais. Hosseini et al. (2016) observaram um efeito semelhante em filmes ativos de gelatina de peixe e quitosana, incorporadas de óleo essencial de orégano.

No entanto, a porcentagem de cristalinidade é maior nos filmes de metilcelulose em comparação aos filmes de colágeno. De acordo Filipini, Romani e Martins (2020) em geral filmes biodegradáveis com menor percentual de cristalinidade apresentam maior densidade, transparência, resistência à tração e maiores barreiras ao vapor de água. Algumas amostras estão de acordo com a relação inversa entre esses parâmetros. O aumento da cristalinidade reduziu algumas propriedades: FC2-L1 (PVA e E); FM1-C1 (TR); FM2-C1 (TR e PVA) e FM2-L1 (PVA).

Embora os OEs possam interagir com algumas cadeias dos biopolímeros, estes também podem promover a movimentação de segmentos das cadeias, aumentando a chance de colisão, contribuindo assim para o aumento da cristalinidade do filme (VIEIRA et al., 2020). Fonseca et al. (2020) sugerem que algumas ligações de hidrogênio na matriz do filme, possam ser interrompidas com a adição dos OEs, e o aumento da cristalinidade pode ser devido ao aumento da interação hidrofóbica entre as cadeias da matriz e os OEs (FONSECA et al., 2020).

5.2 BIOATIVIDADE

A avaliação das atividades antibacterianas e antioxidantes, foi realizada nos óleos essenciais e também nos filmes de colágeno e metilcelulose que apresentaram os melhores resultados em relação as características físicas e propriedades mecânicas e de barreira.

5.2.1 Atividade Antibacteriana

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de canela, tomilho e litsea cubeba, através do método de difusão em ágar para os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Os micro-organismos *S. aureus* e *E. coli* foram inibidos por todos os óleos essenciais testados, diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Com base nos resultados encontrados na Tabela 9, o óleo essencial de canela apresentou diferença significativa, com os maiores halos de inibição para ambos micro-organismos, seguido em ordem decrescente pelos OEs de tomilho e litsea cubeba. Para os óleos essenciais de tomilho e litsea cubeba, a ação antimicrobiana foi menos pronunciada, formando halos menores e irregulares ao redor dos discos, como pode-se observar na Figura 8. Os OEs de canela e listsea cubeba, obtiveram maior halo de inibição para *E. coli* 43,0 mm e 22,5 mm quando comparados ao *S. aureus* 41,0 mm e

18,2, respectivamente. No entanto, o OE de tomilho apresentou maior halo de inibição para *S. aureus* 33,0 mm que para *E. coli* 31,0 mm. De acordo com Burt (2004) e Falleh et al. (2020), os OEs são geralmente mais eficientes contra bactérias gram-positivas do que bactérias gram-negativas devido as características de suas paredes celulares. Embora a *E. coli* seja gram-negativa e *S. aureus* gram-positiva, os óleos essenciais de canela e Litsea cubeba foram mais eficazes contra as bactérias gram-negativas.

Tabela 9 – Halos médios de inibição apresentados pelos óleos essenciais.

Óleos essenciais	Halos de inibição (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Canela	43,0±0,8 ^{aA}	41,0±1,0 ^{aB}
Tomilho	31,0±0,6 ^{bB}	33,0±1,8 ^{bA}
Litsea cubeba	22,5±0,8 ^{cA}	18,2±0,6 ^{cB}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os óleos testados ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre os microrganismos testados ($p < 0,05$) pelo teste t-student.

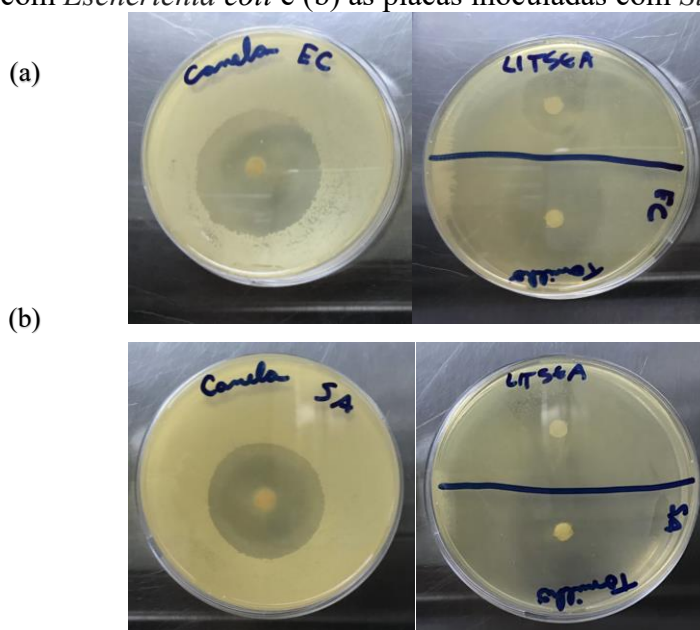
Di Pasqua et al. (2006) e Hyldgaard, Mygind e Meyer (2012) afirmam que um dos principais constituintes do OE de canela é o cinamaldeído ou aldeído cinâmico. Este composto em baixas concentrações, inibe diferentes enzimas envolvidas em funções celulares menos importantes, em concentrações maiores ou subletais, atua como um inibidor da ATPase, e em concentrações letais, atinge a membrana celular, mesmo em bactérias gram-negativas como a *E. coli*. De acordo com o laudo técnico (ANEXO 1), o OE de canela apresenta 80% de aldeído cinâmico, sendo assim, esta alta concentração foi suficiente para alterar o perfil lipídico da membrana celular de ambas bactérias, resultando na liberação de conteúdo celular e inibindo o seu crescimento.

O OE litsea cubeba apresentou o menor efeito inibitório entre as bactérias analisadas, quando comparado aos demais óleos essenciais. De acordo com Li. W. R. (2014) os principais componentes do OE de litsea cubeba são o citral e o limoneno, responsáveis pela atividade antibacteriana devido ao seu efeito sinérgico. Segundo Dai et al. (2021) essa atividade antibacteriana pode ser atribuída principalmente a uma variedade de terpenos solúveis em gordura, existentes nos componentes do OE litsea cubeba, como Limoneno, β -Pineno e α -Pineno, que podem dissolver paredes celulares após interagir com bactérias. O óleo essencial de litsea cubeba utilizado neste estudo, apresenta o composto citral que contém 40% de

geraniale, 31% neral e 13% de limoneno (ANEXO 2), compostos capazes de inibir a atividade bacteriana com efeito maior para *E. coli* que para o *S.aureus*. Este resultado indica que OE litsea cubeba pode destruir a parede bacteriana e citomembrana, e causar um dano irreversível à estrutura celular.

O OE de tomilho obteve o efeito esperado de acordo com a literatura, com maior eficiência sobre as bactérias gram-positivas do que gram-negativas. O OE de tomilho é composto por 50 % de timol (ANEXO 3), este possui capacidade de causar danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática, afetando sua permeabilidade e impedindo a recuperação celular após exposição temporária. Estes efeitos também foram observados nas bactérias gram-negativas de *E. coli*, onde o timol causou a liberação de lipopolissacarídeos e rompimento da membrana celular (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; SHAPIRA; MIMRAN, 2007).

Figura 8 – Atividade antibacteriana dos óleos essenciais, onde (a) são as placas inoculadas com *Escherichia coli* e (b) as placas inoculadas com *Staphylococcus aureus*.



No entanto, cada vez mais evidências indicam que a atividade inerente dos óleos essenciais não pode depender exclusivamente da proporção em que os principais constituintes ativos estão presentes, mas também das interações entre estes e os constituintes menores nos óleos (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). A capacidade de inibição é de fundamental importância para incorporação em filmes, tornando-os um meio eficaz de controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, melhorando a segurança alimentar e aumentando a vida útil dos produtos (DU et al., 2011).

A Tabela 10, apresenta os resultados da atividade antibacteriana dos filmes de colágeno e metilcelulose, determinada pelos métodos de halo de inibição para os micro-organismos *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), usado como organismo teste para bactérias gram-positivas, e *Escherichia coli* (*E. coli*) para teste de bactérias gram-negativas.

Tabela 10 – Halos médios de inibição apresentados pelos filmes com óleos essenciais.

Filmes	Halos de inibição (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
FC1-L2	2,3±0,2 ^{aA}	2,3±0,3 ^{aA}
FC1-T2	1,7±0,1 ^{aA}	ND
FC2-L1	4,3±0,3 ^{aA}	4,7±0,2 ^{aA}
FC2-T2	1,7±0,2 ^{aA}	ND
FM1-C1	1,0±0,1 ^{aA}	ND
FM1-L2	2,0±0,2 ^{aA}	4,3±0,4 ^{aA}
FM2-C1	3,3±0,3 ^{aA}	4,7±0,1 ^{aA}
FM2-L1	ND	ND

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os óleos testados ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre os microrganismos testados ($p < 0,05$) pelo teste t-student. FC1: filme de colágeno 6,5%; FC1-L2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FC2: filme de colágeno 7,0%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FM1: filme de metilcelulose 1,0%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM2: filme de metilcelulose 1,5%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM2-L1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; ND: não detectável.

Os filmes de colágeno e metilcelulose utilizados para determinar a atividade antibacteriana contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, não apresentaram diferença significativa em relação ao tamanho dos halos de inibição. No entanto, pode-se observar que um número maior de filmes apresentou efeito inibitório sobre a bactéria *E. coli* (gram-negativa) do que para *S. aureus* (gram-positiva). Embora seja normalmente considerado que os OEs são ligeiramente mais ativos contra bactérias gram-positivas do que gram-negativas, nem todos os estudos de pesquisa sobre os OEs deduziram que os gram-positivos são mais suscetíveis. Hosseini et al. (2016) apresentaram filmes ativos mais eficazes contra bactérias gram-negativas (*E. coli*) do

que bactérias gram-positivas (*S. aureus*). Bhuimbar, Bhagwat e Dandge (2019) observaram a atividade antibacteriana dos filmes somente contra *E. coli*. Já Moghimi et al. (2017) e Kalkan, Otağ e Engin (2020) mostraram efeitos antimicrobianos contra ambos os micro-organismos *E. coli* e *S. aureus*. Isso ocorre, pois os OEs apresentam diferentes variações na composição química de seus principais constituintes influenciados pela origem geográfica, período de colheita, entre outros, resultando em diferentes graus de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. (BURT, 2004; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; LEE et al., 2019; PELISSARI et al., 2009).

Mesmo sem diferença significativa, os filmes FC2-L1 e FM2-C1, adicionados com 0,5% de óleo essencial de litsea cubeba e canela, respectivamente, apresentaram os maiores halos de inibição para ambos micro-organismos avaliados. Devemos observar também, que os óleos essenciais incorporados na matriz polimérica, não produziram o mesmo efeito inibitório que os OEs puros (Tabela 9) sobre os micro-organismos alvos. Esta redução da atividade antibacteriana dos filmes, pode estar associada a baixa concentração adicionada aos filmes, e também a possíveis perdas de compostos voláteis dos OEs nas etapas de produção dos filmes, como processos de agitação, secagem e oxidação durante a formação da rede polimérica (HOSSEINI et al., 2015; MATTA; TAVERA-QUIROZ; BERTOLA, 2019; SCUDELER et al., 2020). Wu et al. (2017) não apresentaram inibição contra *S. aureus* e *E. coli* quando incorporaram a mesma concentração (0,5%) de OE de canela em filmes de gelatina de pescado, foi então necessário aumentar a concentração para 1% para obter algum efeito inibidor. Lee et al. (2019) e Nisar et al. (2018), também observaram que quanto maior a concentração de OE no filme, maior era a inibição microbiológica.

Segundo Klangmuang e Sothornvit (2016), cada OE tem suas próprias características que devem ser consideradas antes da aplicação, como o aroma, que podem impactar no sabor final do produto alimentar (KLANGMUANG; SOTHORNVIT, 2016). De forma equilibrada, é possível que um filme se torne uma embalagem ativa, fornecendo proteção eficiente, com efeito antimicrobiano sendo liberado na superfície do produto, onde a contaminação microbiana geralmente ocorre, sem afetar a aceitabilidade dos alimentos (FALLEH et al., 2020).

5.2.2 Atividade Antioxidante

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante dos óleos essenciais de canela, tomilho e litsea cubeba, através dos métodos DPPH, ABTS e poder redutor, estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Atividade antioxidante dos óleos essenciais.

Óleos essenciais	DPPH (%)	ABTS (%)	Poder Redutor (Abs)
Canela	55,4±1,8 ^a	69,5±3,7 ^b	0,305±0,061 ^a
Tomilho	55,9±1,0 ^a	98,0±0,9 ^a	0,339±0,027 ^a
Litsea cubeba	54,0±2,2 ^a	65,3±6,4 ^b	0,291±0,058 ^a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os óleos testados ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais determinada pelo método DPPH, não apresentou diferença significativa entre os óleos avaliados. Isso pode ter ocorrido devido à alta volatilidade dos óleos essenciais, resultando em um tempo de reação mais curto de seus componentes ativos quando expostos sob as mesmas condições de análise (WANG et al, 2021). Entretanto, a atividade antioxidante dos óleos essenciais de, aproximadamente 55%, está relacionada aos compostos fenólicos presentes nos OEs de canela (80% de cinamaldeído), tomilho (50% timol) e litsea cubeba (40% de geranial), esses compostos apresentam excelentes capacidades antioxidantes (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; VILELA et al., 2018). Alsaraf et al. (2020) apresentaram atividade antioxidante semelhante de, aproximadamente 51%, para o OE de tomilho extraído das folhas, na concentração de 20µ/mL. Guo et al. (2021) avaliaram diferentes métodos de extração de OE de canela e obteve atividades antioxidantes que variaram entre 59 a 89%, aproximadamente, associando essas variações as diferentes concentrações obtidas de cinamaldeído e outros compostos bioativos. Wang et al. (2021) apresentou uma redução na atividade antioxidante de 77 para 65%, quando transformou o OE de litsea cubeba puro em nanoemulsões.

A atividade antioxidante determinada pelo método ABTS apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os óleos essenciais avaliados. O óleo essencial de tomilho obteve maior atividade antioxidante (98%), capaz de inibir a atividade oxidativa de forma mais eficaz que os demais óleos, de canela (69,5%) e tomilho (65,3%), que não diferiram estatisticamente entre si. Os diferentes resultados podem ser explicados pelas diferenças nas estruturas moleculares dos compostos fenólicos associados a capacidade do método para a avaliação

substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis, através da eliminação de radicais lipídicos ou peróxido de hidrogênio. Desta forma, a capacidade antioxidante determinada por ABTS, do óleo essencial de tomilho relacionado ao seu conteúdo fenólico bioativo, como timol, atuam como potentes sequestradores de radicais livres (AGRIMONTI et al., 2019; AVANÇO et al., 2017; ZHANG et al., 2020).

De acordo com os resultados das absorbâncias apresentadas, a atividade antioxidante dos óleos essenciais avaliadas pelo método poder redutor, não apresentaram diferença significativa. No entanto, os resultados obtidos mostraram que os OEs apresentaram a capacidade de redução com a absorbância média de, 0,311. Este resultado é um importante indicador da capacidade antioxidante, pois avalia a capacidade dos OEs em doar átomos de hidrogênio e interferir com a reação em cadeia livre. Avanço et al. (2017), obteve o efeito antioxidante do óleo essencial de cúrcuma em diferentes concentrações, através do poder redutor com variando a absorbância de 0,400 a 0,780 (nas concentrações de 1 a 4 mg/mL).

A atividade antioxidante dos filmes de colágeno e metilcelulose foram avaliadas pelos ensaios DPPH, ABTS e poder redutor (Tabela 12).

Tabela 12 – Atividade antioxidante dos filmes com óleos essenciais.

Filmes	DPPH (%)	ABTS (%)	Poder Redutor (Abs)
FC1-L2	15,8±1,3 ^{ab}	41,7±0,7 ^{cd}	0,278±0,066 ^a
FC1-T2	10,1±5,0 ^{bc}	81,7±4,5 ^a	0,297±0,075 ^a
FC2-L1	14,3±1,1 ^{ab}	44,2±1,1 ^{cd}	0,239±0,057 ^a
FC2-T2	7,8±1,6 ^c	68,9±1,9 ^b	0,219±0,036 ^a
FM1-C1	16,1±2,8 ^{ab}	39,1±1,1 ^d	0,196±0,029 ^a
FM1-L2	17,5±0,9 ^a	54,2±4,8 ^c	0,233±0,013 ^a
FM2-C1	16,1±0,9 ^{ab}	25,8±5,8 ^e	0,178±0,026 ^a
FM2-L1	16,2±1,0 ^{ab}	37,6±8,8 ^{de}	0,171±0,029 ^a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os óleos testados ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. FC1-L2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM2-L1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; ND: não detectável.

A eliminação de radicais livres por DPPH é amplamente utilizada como um método padrão para detectar a atividade antioxidante de filmes ativos. A Tabela 12 mostra o percentual de eliminação de radicais livres por DPPH nos filmes de colágeno e metilcelulose. Após a adição dos óleos essenciais os filmes apresentaram diferença significativa entre as amostras. A maior inibição de radicais livres DPPH dos filmes foi 17,5% no filme FM1-L2. No entanto, quando comparados aos OEs puros (Tabela 11), as baixas porcentagens da atividade antioxidante por DPPH dos filmes, podem estar relacionadas com a baixa concentração do óleo essencial utilizada na formulação dos filmes, com o solvente utilizado para extrair os compostos ativos, nível de absorção pela matriz, interação entre os compostos fenólicos e o polímero, e perdas no processo de produção (DICASTILLO et al., 2016; KALKAN; OTAĞ; ENGIN, 2020; MATTA; TAVERA-QUIROZ; BERTOLA, 2019; SUN et al.; 2019). Portanto, as propriedades antioxidantes dos OE incorporados nos filmes tendem a ser menores do que no seu estado puro.

A atividade antioxidante determinada por ABTS, apresentou diferença significativa entre as amostras avaliadas. Os filmes de colágeno, adicionados de OE de tomilho (FC1-T2 e FC2-T2), apresentaram as maiores atividades antioxidantes de 81,7 e 68,9%, respectivamente, resultado esse que está de acordo com a alta atividade antioxidante obtida por ABTS para o OE de tomilho puro 98% (Tabela 11). Entre os filmes de metilcelulose, as maiores atividades antioxidantes são para os filmes com OE de litsea cubeba FM1-L2 (54,2%) e OE de canela FM1-C1 (39,1%). O radical ABTS, apresenta alta solubilidade em água, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica. O método DPPH, apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais hidrofílicos (FILIPINI; ROMANI; MARTINS, 2020). Deste modo, pode-se dizer que os resultados da atividade antioxidante determinados pelo método ABTS apresentaram as maiores taxas de inibições devido a maior afinidade dos óleos essenciais com solventes durante a extração dos compostos da matriz polimérica. Yu et al. (2015) obtiveram resultado semelhante, com maior inibição pelo método ABTS que DPPH, para filmes de metilcelulose com catequinas de chá.

O poder redutor de um composto pode ser usado para medir seu potencial antioxidante, quanto maior o valor da absorbância, maior é o poder redutor dos filmes. A atividade antioxidante determinada pelo poder redutor entre as amostras de filmes adicionadas de OEs, não apresentaram diferença significativa. No entanto, é possível observar que existe capacidade antioxidante nos filmes, devido a presença dos compostos ativos presentes nos OEs como possíveis doadores de elétrons, e também da habilidade destes compostos em estabilizar ação oxidativa. Lin et al. (2021) não observaram diferença no poder redutor quando comparou diferentes composições em filmes de gelatina, pectina e polifenóis de maçã, mostrando que a

capacidade de redução aumenta com o aumento da concentração dos polifenóis. Moalla et al. (2021) obtiveram resultados semelhantes quando avaliou o poder redutor de filmes ativos de quitosana enriquecidos com diferentes tipos de extratos de *Artemisia campestris*, variando entre 0,132 a 0,272. Muitos fatores podem afetar a atividade antioxidante de filmes como a composição do ingrediente ativo, liberação e interação de polímeros com o ingrediente ativo e microestrutura do filme (SUN et al., 2019).

5.3 BIODegradabilidade

As imagens da análise qualitativa da biodegradabilidade em solo dos filmes de colágeno e metilcelulose, em função do tempo, estão nas Figuras 9 e 10. A análise da biodegradabilidade foi realizada no verão, entre os meses de janeiro e fevereiro, onde a temperatura média foi de 24 °C e umidade relativa média (UR) foi de 55%.

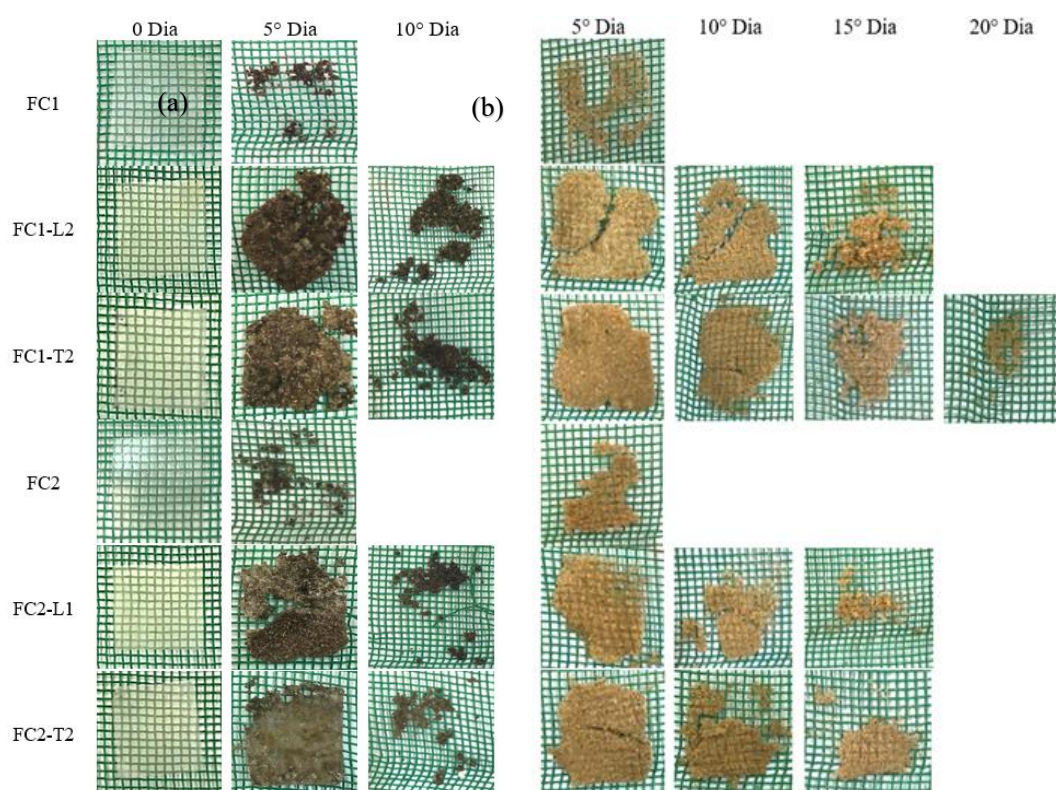
Pode-se observar que nos primeiros 5 dias, os filmes de colágeno FC1 e FC2 em solos de areia preta (Figura 9-a) e em areia da praia (Figura 9-b), foram rapidamente degradados. Neste mesmo período de tempo, todos os filmes, em ambos solos, sofreram mudanças na cor, aderência do solo e pequena decomposição, indicando o início da degradação. Após 10 dias, todos os filmes enterrados em solo com areia preta, estavam completamente degradados. Os mesmos filmes, em areia da praia, degradaram-se completamente em 15 dias, exceto a amostra FC1-T2, que apresentou o maior período de degradação entre os filmes de colágeno, totalizando 20 dias para decomposição.

Após a incorporação dos óleos essenciais, o tempo de decomposição dos filmes ativos aumentou em relação aos filmes controle. Para as amostras de colágeno houve um aumento de 5 dias, em areia preta, e de 10 a 15 dias, para as amostras colocadas em areia da praia. Os resultados para o aumento da biodegradabilidade após a adição dos OEs, nos filmes de colágeno, podem estar relacionados com as análises anteriores, pois houve aumento nos valores da TR e redução na solubilidade.

A diferença entre os tipos de solos também influenciou na decomposição dos filmes. De acordo com os resultados obtidos por Passos et al. (2014), a areia da praia do Cassino, apresenta maior contaminação por coliformes termotolerantes, que não são necessariamente patogênicos, mas são encontrados abundantemente em resíduos provenientes da ação humana, onde micro-organismos patogênicos podem estar presentes, como a *Escherichia coli*. Sugere-se então, que a areia da praia, por ter sido coletada em uma época do ano onde se tem uma maior circulação de pessoas, possa ter uma maior contaminação microbiológica da areia. Esta

contaminação da areia da praia pode ter influenciando no tempo de biodegradação dos filmes de colágeno, pois todas os filmes apresentaram inibição para *E. coli*. Portanto, pode-se concluir que o mesmo efeito inibitório na análises antibacteriana dos filmes possa ter reduzido a biodegradabilidade na areia da praia, aumentando o tempo de degradação dos filmes de colágeno.

Figura 9 – Biodegradabilidade dos filmes de colágeno em areia preta (a) e areia de praia (b).

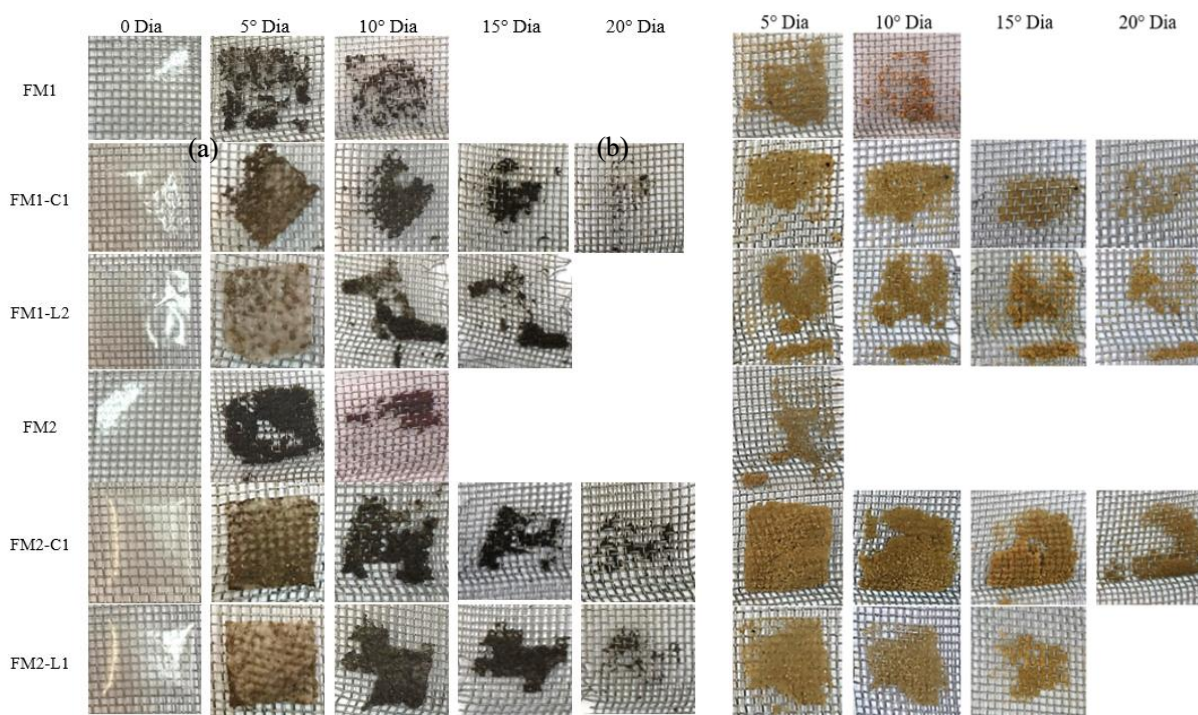


FC1: filme de colágeno 6,5%; FC1-L2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FC1-T2: filme de colágeno 6,5% com óleo essencial de tomilho 0,25%; FC2: filme de colágeno 7,0%; FC2-L1: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%; FC2-T2: filme de colágeno 7,0% com óleo essencial de tomilho 0,25%.

De acordo com a Figura 10, a biodegradabilidade dos filmes de metilcelulose, apresentaram maior resistência à decomposição do que os filmes de colágeno, em ambos os solos. Nos primeiros 5 dias de análise, apenas o filme controle de metilcelulose FM2, em solo de areia praia (Figura 10-b), foi rapidamente degradado. Neste período, todos os filmes em areia preta, estavam mais inteiros e com um pouco de areia aderido na superfície das amostras, sem início da degradação. As amostras em areia de praia apresentavam-se mais danificadas e com degradação iniciada. Somente após 10 dias os demais filmes controles, FM1 (ambos solos) e FM2 (solo de areia preta), apresentaram decomposição total. Com 15 dias, o ensaio foi

finalizado para as amostras FM1-L2 (areia preta) e FM2-L1 (areia de praia) e após o período de 20 dias todos os filmes já haviam sido desintegrados.

Figura 10 – Biodegradabilidade dos filmes metilcelulose em areia preta (a) areia de praia (b).



FM1: filme de metilcelulose 1,0%; FM1-C1: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de canela 0,5%; FM1-L2: filme de metilcelulose 1,0% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,25%; FM2: filme de metilcelulose 1,5%; FM2-C1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de canela 0,5%; FM2-L1: filme de metilcelulose 1,5% com óleo essencial de Litsea cubeba 0,5%.

Nos filmes de metilcelulose, após a incorporação dos OEs, o período de decomposição dos filmes ativos e controle se aproximam para 5 a 10 dias em areia preta, e de 10 a 15 dias em areia de praia. Os filmes controles de metilcelulose apresentam maior resistência à biodegradabilidade que os de colágeno. Desta forma, os resultados para essa menor diferença na biodegradabilidade entre os filmes de metilcelulose controles e ativos, podem estar relacionados com a redução das propriedades mecânicas (TR), alta solubilidade da metilcelulose e ao menor efeito da atividade antibacteriana.

Em todas as amostras, é possível visualizar solo residual aderido na superfície dos filmes, principalmente nas amostras em solo de areia de praia (Figuras 9-b e 10-b). Por este motivo, os valores da perda de massa não foram obtidos, pois o solo foi incorporado nas amostras sem a possibilidade de remoção, afetando a precisão da análise quantitativa.

Os resultados da biodegradabilidade no solo são decisivos quando se pensa sobre uma embalagem biodegradável. Segundo Haghighi et al. (2020), pesquisas em filmes à base de biopolímeros adicionados de compostos antimicrobianos, em geral, devem incluir biodegradabilidade entre os parâmetros alvo, pois os compostos que inibem a deterioração microbiana de alimentos também podem causar efeitos negativos no processo de degradação. Nesse sentido, todos os filmes desenvolvidos neste estudo são muito promissores para serem utilizados como materiais biodegradáveis no desenvolvimento de embalagem de alimentos. Considerando o tempo máximo de degradação dos filmes produzidos neste trabalho (20 dias), esses filmes ativos poderiam ser descartados em jardins urbanos e domiciliares, sem intervenção industrial, ajudando a reduzir gastos no processamento destes materiais.

6 CONCLUSÃO

Foram produzidos filmes ativos e biodegradáveis de colágeno e metilcelulose com a incorporação de óleos essenciais. Os filmes foram avaliados de forma subjetiva e apresentaram-se visualmente contínuos e homogêneos. Entretanto, a manuseabilidade foi reduzida, pois os filmes de colágeno tornaram-se mais elásticos e pegajosos, e os filmes de metilcelulose mais quebradiços nas extremidades, quando comparados ao padrão.

Os filmes de colágeno apresentaram um aumento na tensão de ruptura, redução da permeabilidade ao vapor d'água e na solubilidade. Nos filmes de metilcelulose houve pequena melhoria nas propriedades de barreira e redução na tensão de ruptura e alongação. As análises de DSC e TGA, mostraram um aumento na estabilidade térmica em todos os filmes após a incorporação dos óleos essenciais e redução na perda de massa nos filmes de colágeno com óleo de listsea cubeba (FC2-L1) e metilcelulose com óleo de canela (FM2-C1). Maior atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram encontradas para os filmes FC2-L1 e FM2-C1, e o filme de colágeno com óleo de tomilho (FC1-T2) apresentou uma atividade antioxidante de 81,7% pelo método de ABTS.

O tempo para a biodegradação dos filmes aumentou com a adição dos óleos essenciais, sendo que apresentaram um tempo máximo de 10 dias para os filmes de colágeno e 20 dias para os filmes de metilcelulose, quando em solo de areia preta. Em areia da praia os filmes precisaram de até 20 dias para total degradação. Os filmes produzidos neste estudo que apresentaram maior potencial para se tornarem embalagens ativas e biodegradáveis são: FC1-T2 e FM1-L2 como embalagens antioxidantes e FC2-L1 e FM2-C1 como embalagens antibacterianas.

7 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Os resíduos gerados foram placas de poliestireno, aproximadamente 30 unidades foram danificadas durante as análises e descartadas no lixo reciclável da Universidade, demais placas foram higienizadas e guardadas posterior para reaproveitamento.

Os resíduos gerados nas análises biológicas foram esterilizados em autoclave e descartados na seguinte forma: todos os meios inoculados em lixo orgânico; as placas de petri de poliestireno e luvas plásticas, em recicláveis.

Na determinação das análises antioxidantes, após a realização das análises, todas as amostras líquidas eram descartadas em frascos específicos de acordo com o reagente utilizado, devidamente rotulados e destinados a unidade de armazenamento temporário de resíduos químicos (UATRQ).

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Refazer os filmes utilizando um surfactante e aumentar a quantidade de óleo essencial utilizada;
- Incorporar os óleos na forma de emulsão;
- Avaliar a atividade antifúngica dos óleos e dos filmes;
- Com base na bioatividade dos óleos essenciais, produzir filmes utilizando mais de um tipo de óleo essencial na mesma amostra, avaliando a capacidade de sinergia;
- Realizar a aplicação na forma de filme e/ou recobrimento de algum alimento, comparar e analisar a vida útil do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIMONTI, C.; WHITE, J. C.; TONETTI, S.; MARMIROLI, N. Antimicrobial activity of cellulosic pads amended with emulsions of essential oils of oregano, thyme and cinnamon against microorganisms in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 305, n° 108246, 2019.
- AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; AGUSTINI, T. W. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 189-199, 2012.
- AL-TAYYAR, N. A.; YOUSSEF, A. M.; AL-HINDI, R. Antimicrobial Food Packaging Based on Sustainable Bio-based materials for Reducing Foodborne Pathogens: A Review. **Food Chemistry**, v. 310, n. 125915, 2020.
- ALSARAF, S.; HADI, Z.; AL-LAWATI, W. M.; AL-LAWATI, A. A.; KHAN, S. A. Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil along with in silico studies of its major constituent. **Journal of King Saud University – Science**, v. 32, p. 1021–1028, 2020.
- ARVANITOYANNIS, I; BILLIADERIS, C.G. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methylcellulose and soluble starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 105-119, 1999.
- ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-02. In: **Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, 2002.
- ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-00. In: **Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, 2000.
- AVANÇO, G. B.; FERREIRA, F. D.; BOMFIM, N. S.; SANTOS, P. A. S. R.; PERALTA, R. M.; BRUGNARI, T.; MALLMANN, C. A.; FILHO, B. A. A.; MIKCHA, J. M. G.; JUNIOR, M. M. Curcuma longa L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on Fusarium verticillioides and fumonisin production. **Food Control**, v. 73, p. 806-813, 2017.
- AZIZ, M.; KARBOUNE, S. Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review. **Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 486–511, 2018.
- BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, Thymus vulgaris L. **Industrial Crops and Products**, v. 19, p. 231–236, 2004.
- BHUIMBAR, M. V.; BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 7, 2019.
- BOURTOOM, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food**. Review Article in Research Journal, v. 15, p. 237-248, 2008.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CAZÓN, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A.; VAZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p.136-148, 2017.

CHILLO, S.; FLORES, S.; MASTROMETTEO, M.; CONTE, A.; GERSCHENSON, L.; DEL NOBILE, M.A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. **Journal of Food Engineering**, v.88, p. 159-168, 2008.

CHOI, W. S.; SINGH, S.; LEE, Y. S. Characterization of edible film containing essential oils in hydroxypropyl methylcellulose and its effect on quality attributes of “Formosa” plum (*Prunus salicina* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 213- 222, 2016.

CLSI. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 8 ed. **NCCLS: Pennsylvania**, p. 19087-1898, 2003.

DAI, J.; LI, C.; CUI, H.; LIN, L. Unraveling the anti-bacterial mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against *E. coli* O157:H7 and its application in vegetable juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, 2021.

DHALL, R. K. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 435-450, 2013.

DICASTILLO, C. L.; RODRÍGUEZ, F.; GUARDA, A.; GALOTTO, M. J. Antioxidant films based on cross-linked methyl cellulose and native Chilean berry for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1052–1060, 2016.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2745–2749, 2006.

DU, W.X.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; HUA, S.S.T.; MCHUGH, T.H. Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, p. 1124-1134, 2011.

ESPITIA, P. J. P.; DU, W. X.; AVENA-BUSTILLOS, R. D. J.; SOARES, N. D. F. F.; MCHUGH, T. H. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 287-296, 2014.

ETXABIDE, A., URANGA, J., GUERRERO, P.; LA CABA, K. Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 192–198, 2017.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, R. F.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas *Crimson*. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 27, p. 369-375, 2007.

- FALLEH, H.; JEMAA, M. B.; SAADA, M.; KSOURI, R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, v. 330, n. 127268, 2020.
- FILIPINI, G. S.; ROMANI, V. P.; MARTINS, V. G. Biodegradable and active-intelligent films based on methylcellulose and jambolão (*Syzygium cumini*) skins extract for food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 109, 106139, 2020.
- FOLLAIN, N.; JOLY, C.; DOLE, P.; BLIARD, C. Properties of starch-based blend. Part 2. Influence of poly vinyl alcohol addition and photocrosslinking on starch-based materials mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 185–192, 2005.
- FONSECA, J. M.; VALENCIA, G. A.; SOARES, L. S.; DOTTO, M. E. R.; CAMPOS, C. E. M.; MOREIRA, R. F.; FRITZ, A. R. M. Hydroxypropyl methylcellulose-TiO₂ and gelatin-TiO₂ nanocomposite films: Physicochemical and structural properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 944–956, 2020.
- FUERTES, S.; LACA, A.; OULEGO, P.; PAREDES, B.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Development and characterization of egg yolk and egg yolk fractions edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 229-239, 2017.
- GALLO, J. A. Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipidic hydrophobic, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. **Journal of Membrane Science**, v. 180, p. 37- 46, 2000.
- GAO, P.; WANG, F.; GU, F.; NING, J.; LIANG, J.; LI, N.; LUDESCHER, R. D. Preparation and characterization of zein thermo-modified starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1254–1260, 2017.
- GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F.; OROMIEHIE, A.; YARMAND, M. S. Characterization of edible emulsified films with low affinity to water based on kefir and oleic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 3, p. 378-384, 2011.
- GOGOI, P.; BARUAH, P.; NATH, S. C. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba Pers.* **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 213–215, 1997.
- GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNÁNDEZ-MUNOZ, P.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 42–51, 2014.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.
- GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties. **International Journal Food Science Technology**, v. 29, p. 39–50, 1994.
- GONTARD, N. Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten. 174 f. **Tese** (Doutorado em Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire) - Université Montpellier II, Montpellier, 1991.

- GUO, J.; YANG, R.; GONG, Y.; HU, K.; HU, Y.; SONG, F. Optimization and evaluation of the ultrasound-enhanced subcritical water extraction of cinnamon bark oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 147, n. 111673, 2021.
- HALIM, L. A.; KAMARI, A.; PHILLIP, E. Chitosan, gelatin and methylcellulose films incorporated with tannic acid for food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1119–1126, 2018.
- HAMBLETON, A.; DEBEAUFORT, F.; BONNOTTE, A.; VOILLEY, A. Influence of alginate emulsion-based films structure on its barrier properties and on the protection of microencapsulated aroma compound. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2116–2124, 2009.
- HILBIG, J.; MA, Q.; DAVIDSON, P. M.; WEISS, J.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial properties of cinnamon bark oil co-nanoemulsified by lauric arginate and Tween 80. **International Journal of Food Microbiology**, v. 233, p. 52–59, 2016.
- HOSSEINI, M. H.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, M. A. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, p. 727–743, 2009.
- HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 403–413, 2015.
- HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1266–1274, 2016.
- HUANG, Z.; JIA, S.; ZHANG, L.; LIU, X.; LUO, Y. Inhibitory effects and membrane damage caused to fish spoilage bacteria by cinnamon bark (*Cinnamomum tamala*) oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 112, n° 108195, 2019.
- HUANG, Z.; LIU, X.; JIA, S.; LUO, Y. Antimicrobial effects of cinnamon bark oil on microbial composition and quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during chilled storage. **Food Control**, v. 82, p. 316–324, 2017.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 1–24, 2012.
- JARAMILLO, C.; OCHOA-YEPES, O.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, n. May, p. 187–194, 2017.
- JIANG, Y.; LAN, W.; SAMEEN, D. E.; AHMED, S.; QIN, W.; ZHANG, Q.; CHEN, H.; DAI, J.; HE, L.; LIU, Y. Preparation and characterization of grass carp collagen-chitosan-lemon essential oil composite films for application as food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 160, p. 340–351, 2020.

KALKAN, S.; OTAĞ, M. R.; ENGIN, M. S. Physicochemical and bioactive properties of edible methylcellulose films containing *Rheum ribes* L. extract. **Food Chemistry**, v. 307, n. 125524, 2020.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.

KIM, Y. -G.; LEE, J. -H.; KIM, S. -I.; BAEK, K. -H.; LEE, J. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 195, p. 30–39, 2015.

KLANGMUANG, P.; SOTHORNVIT, R. Barrier properties, mechanical properties and antimicrobial activity of hydroxypropyl methylcellulose-based nanocomposite films incorporated with Thai essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 609 – 616, 2016.

LABUZA, T. P.; BREENE, W. M. Applications of active packaging for improvement of shelf- life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 13, p. 1-69, 1989.

LANDIM, A. P. M.; BERNARDO, C. O.; MARTINS, I. B. A.; FRANCISCO, M. R.; SANTOS, M. B.; MELO, N. R. Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. **Polímeros**, v. 26, p. 82-92, 2016.

LEE C. H.; SINGLA A.; LEE Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1-22, 2001.

LEE, J. H.; LEE, J.; SONG, K. B. Development of a chicken feet protein film containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 208-215, 2015.

LEE, J. Y.; GARCIA, C. V.; SHIN, G. H.; KIM, J. T. Antibacterial and antioxidant properties of hydroxypropyl methylcellulosebased active composite films incorporating oregano essential oil nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 106, p. 164 –171, 2019.

LI, J.H.; MIAO, J.; WU, J.L.; CHEN, S.F.; ZHANG, Q.Q. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloid**, v. 37, p. 166-173, 2014.

LI, W.R.; SHI, Q.S.; LIANG, Q.; XIE, X.B.; HUANG, X.M.; CHEN, Y.B. Antibacterial activity and kinetics of *Litsea cubeba* Oil on *E. coli*. **PLoS One**, v. 9, n. 11, 2014.

LIN, D.; XIAO, L.; WEN, Y.; QIN, W.; WU, D.; CHEN, H.; ZHANG, Q.; ZHANG, Q. Comparison of apple polyphenol-gelatin binary complex and apple polyphenolgelatin-pectin ternary complex: Antioxidant and structural characterization. **LWT - Food Science and Technology**, n. 111740, 2021.

LIU, J.; LIU, S.; WU, Q.; GU, Y.; KAN, J.; JIN, C. Effect of protocatechuic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antioxidant properties of chitosan film. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 90-100, 2017.

- LIU, T.-T.; YANG, T.-S. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 68–75, 2012.
- LOPEZ-RUBIO, A.; GAVARA, R.; LAGARON, J. M. Bioactive packaging: Turning foods into healthier foods through biomaterials. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 567–575, 2006.
- MACHEIX, J.-J.; FLEURIET, A.; SARNI-MANCHADO, P. Chapitre 1: Composés phénoliques dans la plante – Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: SARNI-MANCHADO, P.; CHEYNIER, V (Ed.), **Les polyphénols en agroalimentaire**. Lavoisier, p. 1 – 28, 2006.
- MAISANABA, S.; LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; GUTIÉRREZ-PRAENA, D.; PICHARDO, S.; PUERTO, M.; PRIETO, A. I.; JOS, A.; CAMEÁN, A. M. New advances in active packaging incorporated with essential oils or their main components for food preservation. **Food Reviews International**, v. 33, n. 5, p. 447–515, 2017.
- MARAN, J. P.; SIVAKUMAR, V.; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SRIDHAR, R. Degradation behavior of biocomposites based on cassava starchburied under indoor soil conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 20– 28, 2014.
- MATTA, E.; TAVERA-QUIROZ, M. J.; BERTOLA N. Active edible films of methylcellulose with extracts of green apple (Granny Smith) skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 1292–1298, 2019.
- MELLINAS, C.; VALDES, A.; RAMOS, M.; BURGOS, N.; GARRIGÓS, M. del C.; JIMENEZ, A. Active edible films: Current state and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, p.1-15, 2016.
- MIR. S. A.; DARA, B. N.; WANIB, A. A.; SHAHC, M. A. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 141–154, 2018.
- MOALLA, S.; AMMAR, I.; FAUCONNIER, M. L.; DANTHINE, S.; BLECKER, C.; BESBES, S.; ATTIA, H. Development and characterization of chitosan films carrying *Artemisia campestris* antioxidants for potential use as active food packaging materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, 2021.
- MOGHIMI, R.; ALIAHMADI, A.; RAFATI, H. Antibacterial hydroxypropyl methylcellulose edible films containing nanoemulsions of *Thymus daenensis* essential oil for food packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 241–248, 2017.
- MORENO, O.; PASTOR, C.; MULLER, J.; ATARÉS, L.; GONZÁLEZ, C.; CHIRALT, A. Physical and bioactive properties of corn starch – Buttermilk edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 141, p. 27–36, 2014.
- NUNES, M. R.; CASTILHO, M. S. M.; VEECK, A. P. L.; ROSA, C. G.; NORONHA, C. M.; MACIEL, M.V.O.B.; BARRETO, P. M. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing *Lippia alba* extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 37–43, 2018.

OLIVEIRA, M. A.; GONZAGA, M. L. C.; BASTOS, M. S. R.; MAGALHÃES, H. C. R.; BENEVIDES, S. D.; FURTADO, R. F.; ZAMBELLI, R. A.; GARRUTI, D. S. Packaging with cashew gum/gelatin/essential oil for bread: Release potential of the citral. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, 100431, 2020.

OTONI, C. G.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; OLSEN, C. W.; BILBAO-SAINZ, C.; MCHUGH, T. H. Mechanical and water barrier properties of isolated soy protein composite edible films as affected by carvacrol and cinnamaldehyde micro and nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 72–79, 2016.

OZCALIK, O.; TIHMINLIOGLU, F. Barrier properties of corn zein nanocomposite coated polypropylene films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 4, p. 505–513, 2013.

PASSOS, C. T.; SILVA, A. P. R.; BRAGA, A. R. C.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Variação sazonal da contaminação por coliformes na areia e água da praia do Cassino, Rio Grande-RS. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 44, n. 1, p. 21-26, 2011.

PAWAR, P.A.; PURWAR, A.H. Biodergradable Polymers in Food Packaging. **American Journal of Engineering Research**, v. 2, p. 151-164, 2013.

PELISSARI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E. A. G. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7499–7504, 2009.

PERESSINI, D.; BRAVIN, B.; LAPASIN, R.; RIZZOTTI, C.; SENSIDONI, A. Starch–methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 25–32, 2003.

PEREZ-GAGO, M. B.; RHIM, J.W. Edible Coating and Film Materials: Lipid Bilayers and Lipid Emulsions. **Innovations in food packaging**, v. 2, p. 325-350, 2014.

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

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, B.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; MARQUES, A. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 224-231, 2013.

QUINTERO, R. I.; GALOTTO, M. J.; GUARDA, A.; RODRÍGUEZ, F. J.; BRUNA, J.E. Preparation and Characterization of Cellulose Acetate Butyrate/ Organoclay Nanocomposites Produced by Extrusion. **Packaging Technology and Science**, v. 27, p. 495–507, 2013.

RAZAVI, S. M. A.; AMINI, A. M.; ZAHEDI, Y. Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticiser type and concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 290-298, 2015.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 404–419, 2014.

RHIM, J. W.; WANG, L.F.; HONG, S. I. Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 327–335, 2013.

ROMANI, V. P.; OLSEN, B.; COLLARES, M. P.; OLIVEIRA, J. R. M.; PRENTICE, C.; MARTINS, V. G. Cold plasma and carnauba wax as strategies to produce improved bi-layer films for sustainable food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 108, art. 10608, 2020.

ROMANI, V. P.; OLSEN, B.; COLLARES, M. P.; OLIVEIRA, J. R. M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; MARTINS, V. G. Improvement of fish protein films properties for food packaging through glow discharge plasma application. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 970–976, 2019.

ROMANI, V. P.; HERNÁNDEZ, C. P.; MARTINS, V. G. Pink pepper phenolic compounds incorporation in starch/protein blends and its potential to inhibit apple browning. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 151–158, 2018.

ROMANO, N.; TAVERA-QUIROZ, M. J.; BERTOLA, N.; MOBILI, P.; PINOTTI, A.; ZAVAGLIA, A. G. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 560–566, 2014.

ROONEY, M.L. Introduction to active food packaging technologies. **Food Science and Technology**, c. 5, p. 63–79, 2005.

SÁNCHEZ-GARCÍA, M. D.; GIMÉNEZ, E.; LAGARON, J. M. Morphology and barrier properties of solvent cast composites of thermoplastic biopolymers and purified cellulose fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 235–244, 2008.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; VARGAS, M.; MARTÍNEZ, C. G.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2102–2109, 2009.

SANI, M. A.; EHSANI, A.; HASHEMI, M. Whey protein isolate/cellulose nanofibre/TiO₂ nanoparticle/rosemary essential oil nanocomposite film: Its effect on microbial and sensory quality of lamb meat and growth of common foodborne pathogenic bacteria during refrigeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, p. 8–14, 2017.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979–990, 2012.

SCHERF, K. A.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Gluten and wheat sensitivities – An overview. **Journal of Cereal Science**, v. 67, p. 2–11, 2016.

SCUDELER, C. G. S.; COSTA, T. L.; CORTEZ-VEGA, W. R.; PRENTICE, C.; FONSECA, G. G. Development and characterization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein isolate-based biopolymer films incorporated with essential oils and nanoclay. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 25, n. 100542, 2020.

SHAPIRA, R., AND MIMRAN, E. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol. **Microbial Drug Resistance**, v. 13, p. 157–165, 2007.

SI, L.L.; CHEN, Y.C.; HAN, X.J.; ZHAN, Z.Y.; TIAN, S.P.; CUI, Q.Q.; WANG, Y.D. Chemical composition of essential oils of litsea cubeba harvested from its distribution areas in china. **Molecules**, n. 17, p. 7057–7066, 2012.

SILVA, M. N.; FONSECA, J. M.; FELDHAUS, H. K.; SOARES, L. N.; VALENCIA, G. A.; CAMPOS, C. E. M.; LUCCIO, M. D.; MONTEIRO, A. R. Physical and morphological properties of hydroxypropyl methylcellulose films with curcumin polymorphs. **Food Hydrocolloids**, v. 97, n. 105217, 2019.

SILVA, N. S.; FARIAS, F. S.; FREITAS, M. M. S.; HERNANDEZ, E. J. G. P.; DANTAS, V. V.; OLIVEIRA, M. E. C.; JOELE, M. R. S. P.; LOURENÇO, L. F. H. Artificial intelligence application for classification and selection of fish gelatin packaging film produced with incorporation of palm oil and plant essential oils. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 27, n. 100611, 2021.

SILVA, T.; PENNA, A. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n.3, p. 530-539, 2012.

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; ROSA, M. D. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 634-643, 2008.

SIVAROOBAN, T.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. **Food Research International**, v. 41, p. 781–785, 2008.

SMITH, J. P.; DAIFAS, D. P.; EL-KHOURY, W.; KOUKOUTSIS, J.; EL-KHOURY, A. Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products—A Review. **Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 19–55, 2004.

SOOFI, M.; ALIZADEH, A.; HAMISHEHKAR, H.; ALMASI, H.; ROUFEGARINEJAD, L. Preparation of nanobiocomposite film based on lemon waste containing cellulose nanofiber and savory essential oil: A new biodegradable active packaging system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 352–361, 2021.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, v. 50, n. 3, p. 149–155, 2001.

SUN, G.; CHI, W.; ZHANG, C.; XU, S.; LI, J.; WANG, L. Developing a green film with pH-sensitivity and antioxidant activity based on κ -carrageenan and hydroxypropylmethylcellulose incorporating *Prunus maackii* juice. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 345–353, 2019.

SUN, X.; WANG, J.; ZHANG, H.; DONG, M.; LI, L.; JIA, P.; BU, T.; WANG, X.; WANG, L. Development of functional gelatin-based composite films incorporating oil-in-water lavender essential oil nano-emulsions: Effects on physicochemical properties and cherry tomatoes preservation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 142, n. 110987, 2021.

SUPPAKUL, P.; BOONLERT, R.; BUAPHET, W.; SONKAEW, P.; LUCKANATINVONG, V. Efficacy of superior antioxidant Indian gooseberry extract incorporated edible Indian gooseberry puree/methylcellulose composite films on enhancing the shelf life of roasted cashew nut. **Food Control**, v. 69, p. 51-60, 2016.

- TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199-1218, 2010.
- THIELMANN, J.; MURANYI, P.; KAZMAN, P. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Heliyon** v. 5, e. 01860, 2019.
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; PISUCHPEN, S.; OSAKO, K. Mechanical, thermal and heat-sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. **Food Hydrocolloids**, v.56, p. 93-107, 2016.
- TURHAN, K. N.; SAHBAZ, F. Water vapor permeability, tensile proprieties and solubility of methylcellulose-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 459-466, 2004.
- VIERA, R. G. P.; FILHO, G. R.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; VIEIRA, J. G.; OLIVEIRA, G. S. Synthesis and characterization of methylcellulose from sugar cane bagasse cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 2, p. 182–189, 2007.
- VIEIRA, A. C. F.; FONSECA, J. M.; MENEZES, N. M. C.; MONTEIRO, A. R.; VALENCIA, G. A. Active coatings based on hydroxypropyl methylcellulose and silver nanoparticles to extend the papaya (*Carica papaya* L.) shelf life. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 489–498, 2020.
- VILELA, C.; KUREK, M.; HAYOUKA, Z.; RÖCKER, B.; YILDIRIM, S.; ANTUNES, M. D. C.; NYGAARD, J. N.; PETTERSEN, M. K.; FREIRE, C. S. R. A concise guide to active agents for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v.80, p. 212–222, 2018.
- VILLADIEGO, A.M.D.; SOARES, N.F.F.; ANDRADE, N.J.; PUSCMANN, R.; MINIM, V.P.R.; CRUZ, R. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, v. 52, p. 221-244, 2005.
- WALZ, F. H.; GIBIS, M.; LEIN, M.; HERRMANN, K.; HINRICHS, J.; WEISS, J. Influence of casing material on the formation of efflorescences on dry fermented sausages. **LWT-Food Science and Technology**, v. 89, p. 434–440, 2018.
- WANG, H.; YANG, Z.; YING, G.; YANG, M.; NIAN, Y.; WEI, F.; KONG, W. Antifungal evaluation of plant essential oils and their major components against toxigenic fungi. **Industrial Crops & Products**, v. 120, p. 180–186, 2018.
- WANG, Y.; CEN, C.; CHEN, J.; ZHOU, C.; FU, L. Nano-emulsification improves physical properties and bioactivities of litsea cubeba essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 137, n. 110361, 2021.
- WIHODO, M.; MORARU, C.I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films. **Journal of Food Engineering**, v.114, p. 292–302, 2013.
- 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**, v. 23, p. 1886-1894, 2009.

WU, J.; SUN, X.; GUO, X.; GE, S.; ZHANG, Q. Physicochemical properties, antimicrobial activity and oil release of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil. **Aquaculture and Fisheries**, v. 2, p. 185-192, 2017.

WU, X.; LIU, A.; WANG, W.; YE, R. Improved mechanical properties and thermal-stability of collagen fiber-based film by crosslinking with casein, keratin or SPI: Effect of crosslinking process and concentrations of proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1319–1328, 2018.

XU, J.; LIU, F.; WANG, T.; GOFF, H. D.; ZHONG, F. Fabrication of films with tailored properties by regulating the swelling of collagen fiber through pH adjustment. **Food Hydrocolloids**, v. 108, art. 106016, 2020.

XU, Y.; REHMANI, N.; ALSUBAIE, L.; KIM, C.; SISMOUR, E.; SCALES, A. Tapioca starch active nanocomposite films and their antimicrobial effectiveness on ready-to-eat chicken meat. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 86–91, 2018.

YANG, K.; WANG, C. F.; YOU, C. X.; GENG, Z. F.; SUN, R. Q.; GUO, S. S.; DU, S. S.; LIU, Z. L.; DENG, Z. W. Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, p. 459–466, 2014.

YU, S. H.; TSAI, M. L.; LIN, B. X.; LIN, C. W.; MI, F. L. Tea catechins-cross-linked methylcellulose active films for inhibition of light irradiation and lipid peroxidation induced β -carotene degradation. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 491–505, 2015.

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

ZHANG, Y.; ZHOU, L.; ZHANG, C.; SHOW, P.L.; DU, A.; FU, J. C.; ASHOKKUMAR, V. Preparation and characterization of curdlan/polyvinyl alcohol/ thyme essential oil blending film and its application to chilled meat preservation. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, n. 116670, 2020.

ZHENG, K.; LI, W.; FU, B.; FU, M.; REN, Q.; YANG, F.; QIN, C. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films containing hardleaf oatchestnut starch and *Litsea cubeba* oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 707–715, 2018.

ANEXO 1

**FERQUIMA**

LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Canela Cássia
(Cinnamomum cassia)

Lote: 225	CAS Number: 8007-80-5
Fabricação: Junho/2018	Validade: Junho/2021

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido	Líquido
Cor	Amarelo	Amarelo a Marrom
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	1,053	1,045 – 1,065
Índice de Refração (20°C)	1,612	1,595 – 1,615
Rotação Ótica		[-1º ; +1º]
Data da Análise	24/08/2018	
Origem	China	
Resultado	Aprovado	
Principais Componentes (aprox.)	Aldeído cinâmico = 80% Cumarina = 2% Benzaldeído = 2% Álcool cinâmico= 2 % Estireno = 2%	
Extração	Destilação a vapor das folhas, talos, casca	
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		
Este produto é 100% puro, isento de solvente e diluente e segundo a RDC 481/99, não suscetível a contaminação microbiológica.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos, máscara e luvas recomendável. Não ingerir. Não colocar o produto em contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Pode causar irritação à pele sensível. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Flash Point: 91°C.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se exclusivamente ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco: 60 / Número da ONU: 2810 / Classe ou Subclasse de risco: 6.1 / Descrição da classe ou subclasse: Tóxico, líquido, orgânico / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

ANEXO 2



LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Litsea Cubeba
(Litsea cubeba)

Lote: 244	CAS: 68855-99-2
Fabricação: Dezembro/2018	Validade: Dezembro/2020

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo	Amarelo
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,892	0,870 – 0,900
Índice de Refração (20°C)	1,487	1,470 – 1,490
Rotação Ótica	+9.36°	[+3° ; +12°]
Data da Análise	06/02/2019	
Resultado	Aprovado	
Origem	China	
Principais Componentes (valores aproximados)	Neral = 31% Limonene = 13%	Geranial = 40% Alfa-pineno = 1%0
Extração	Destilação a vapor dos frutos.	
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		
Este produto é 100% puro, isento de solvente e diluente e segundo a RDC 481/99, não suscetível a contaminação microbiológica.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Flash Point = 71°C
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco: 90 / Número da ONU: 3082 / Classe ou Subclasse de risco: 9 / Descrição da classe ou subclasse: Substâncias perigosas diversas / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

ANEXO 3

**FERQUIMA**

LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Tomilho Branco
(Thymus vulgaris)

Lote: 191	CAS: 8007-46-3
Fabricação: Janeiro/2019	Validade: Janeiro/2022

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Claro	Incolor a Amarelo Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,917	0,900 – 0,940
Índice de Refração (20°C)	1,500	1,490 – 1,510
Rotação Ótica	-2,20°	[-3,0° ; -0,1°]
Data da Análise	15/02/2019	
Resultado	Aprovado	
Origem	Espanha	
Principal componente (valor aproximado)	Timol: 50%	
Extração	Destilação a vapor das flores, folhas.	
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	O uso de óculos de segurança e luvas é recomendável. Não inalar diretamente o produto. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa: o produto pode causar irritação à pele sensível. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Emite vapores tóxicos em situação de incêndio. Ponto de Fulgor: 57°C.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de Risco: 3 / Número da Onu: UN 2924 / Classe ou Subclasse de Risco: 38 / Descrição da Classe ou Subclasse de Risco: Líquido Inflamável, Corrosivo / Grupo de Embalagem: II

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754