



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Produção e caracterização de filmes bioativos à base de nanocelulose por incorporação de óleo essencial de cravinho-da-Índia e eugenol

(Versão final após defesa)

Vasco Miguel Pires Lopes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotechnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Maria Emília Amaral
Coorientador: Professor Doutor Rogério Simões

Covilhã, Novembro de 2018

Dedicatória

Aos meus pais.

Agradecimentos

Findada esta jornada de um ano de dissertação, chega a hora de dedicar umas palavras de agradecimento a todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente neste trabalho. Assim, quero expressar o meu maior agradecimento há minha excelentíssima orientadora professora Doutora Maria Emília Amaral bem como também ao excelente coorientador professor Doutor Rogério Simões.

Também quero expressar os meus agradecimentos à Doutorada Sónia Sousa a minha “madrinha” de laboratório por tudo em que me ajudou. Ao Doutorado Ângelo Luís por toda a disponibilidade e paciência demonstrada ao longo de todos os ensaios microbiológicos.

Quero também agradecer aos meus excelentíssimos colegas de laboratório, Marta Tenreiro, Henrique Guilherme, Diogo Santos e João Parente que deram o seu contributo à sua maneira. Também deixar uma palavra de agradecimento a todas as pessoas envolvidas no funcionamento dos laboratórios que permitem efetuar a nossa investigação.

Por fim, resta-me agradecer á minha família e em particular aos meus pais que foram os grandes responsáveis pelo meu percurso académico e que foram o grande suporte para aqui continuar e terminar esta jornada ao longo dos difíceis anos e que sempre acreditaram em mim e na minha capacidade. A todos e em jeito da Beira Interior, o meu mais profundo Bem-haja!

Resumo

A manutenção da segurança alimentar e a garantia da qualidade são cruciais para a indústria alimentar. A necessidade de materiais de embalagem que possam aumentar consideravelmente as propriedades de barreira, prolongar a vida útil em prateleira e biodegradáveis fazem da nanocelulose um biomaterial com um tremendo potencial. Um dos materiais mais promissores para embalagens alimentares são materiais à base de nanocelulose com propriedades antibacterianas, melhores propriedades mecânicas e de barreira e que sejam biodegradáveis. No presente trabalho, a celulose nanofibrilada (CNF) ou nanocelulose foi produzida a partir de duas pastas comerciais branqueadas de *Eucalyptus globulus*, com características iniciais distintas. Estas foram sujeitas a um tratamento químico de oxidação mediada por TEMPO e tratamentos mecânicos, ambos contribuem para a desconstrução da parede celular, libertando nanofibrilas e formando suspensões de CNF. Estes materiais foram caracterizados de acordo com o teor de grupos carboxílicos, viscosidade intrínseca, rendimento de fibrilação, potencial zeta e propriedades reológicas, tendo em conta o seu estado face aos tratamentos. Produziram-se filmes de CNF pelo processo de evaporação de solvente, com e sem incorporação de óleo essencial de cravinho, ou eugenol. Os óleos essenciais representam um “ingrediente” interessante para ser usado em embalagens alimentares, principalmente devido à sua origem natural e às suas propriedades funcionais (antioxidante e antimicrobiana). Os filmes produzidos foram analisados por diferentes métodos de caracterização e análise, tais como, o FTIR, a morfologia da estrutura interna por SEM, as propriedades mecânicas e de barreira, a atividade antioxidante e antimicrobiana. Os resultados mostraram que o sistema TEMPO/NaClO/NaBr produziu pastas altamente oxidadas, com viscosidades intrínsecas baixas, resultando em baixos graus de polimerização. As suspensões de CNF produzidas apresentaram elevados rendimentos em fibrilação, potenciais zeta muito negativos e ainda características reológicas distintas em parte relacionadas com a origem das pastas, ao sulfito e ao sulfato. Os filmes de CNF incorporados com CLO e EU possuem boas propriedades mecânicas (resistência à tração de 60 MPa, 5% de alongamento, módulo de elasticidade de 6000 MPa). A conjugação AK1/EU e AK2/CLO revelam ser mais eficazes à razão de transmissão de moléculas de vapor de água, melhores propriedades de barreira. As propriedades morfológicas da estrutura dos filmes demonstraram um elevado empacotamento da estrutura de todos os filmes, podendo contribuir para as baixas concentrações obtidas nos ensaios de libertação e a ineficácia contra a inibição do crescimento microbiano, quando estes compostos antimicrobianos estão incorporados na suspensão de nanocelulose.

Palavras-chave

nanocelulose; óleo essencial de cravinho; eugenol; filmes antimicrobianos; propriedades físicas.

Abstract

The preservation of the food safety and the quality assurance are crucial for the food industry. The need for packaging materials that can dramatically increase barrier properties, prolong shelf life and are biodegradable, make nanocellulose a biomaterial with tremendous potential. One of the most promising materials for food packaging is nanocellulose-based materials with antibacterial properties, improved mechanical and barrier properties and are biodegradable. In the present work, nanofibrillated cellulose (CNF) or nanocellulose was produced from two bleached commercial pulps of *Eucalyptus globulus*, with different initial characteristics. These were subjected to a TEMPO-mediated chemical oxidation treatment and mechanical treatments, both of which contribute to the deconstruction of the cell wall, releasing nanofibrils and forming CNF suspensions. These materials were characterized according to the content of carboxylic groups, intrinsic viscosity, fibrillation yield, zeta potential and rheological properties, taking into account their state against the treatments. CNF films were produced by the solvent evaporation process, with and without the incorporation of clove essential oil, or eugenol. Essential oils represent an interesting "ingredient" for use in food packaging, mainly because of its natural origin and its functional properties (antioxidant and antimicrobial). The films produced were analysed by different characterization and analysis methods, such as FTIR, internal structure morphology by SEM, mechanical and barrier properties, antioxidant and antimicrobial activity. The results showed that the TEMPO / NaClO / NaBr system produced highly oxidized pulps with low intrinsic viscosities, resulting in low degrees of polymerization. The suspensions of CNF produced showed high yields in fibrillation, very negative zeta potentials and distinct rheological characteristics in part related to the origin of the pulps, sulphite and sulphate. CNF films incorporated with CLO and EU have good mechanical properties (tensile strength of 60 MPa, 5% elongation, Young modulus of 6000 MPa). The AK1 / EU and AK2 / CLO conjugation prove to be more effective at the vapor water transmission rate, better barrier properties. The morphological properties of the structure of the films showed a high packaging of the structure of all the films and could contribute to the low concentrations obtained in the release assays and the inefficacy against the inhibition of the microbial growth when these antimicrobial compounds are incorporated in the suspension of nanocellulose.

Keywords

nanocellulose; eugenol; clove essential oil; antimicrobial films; physical properties.

Índice

Capítulo 1 - Introdução geral	1
1.1. Contextualização.....	2
1.2. Materiais celulósicos	3
1.3. Da madeira à nanocelulose.....	4
1.3.1. Processos de produção de celulose nanofibrilada	6
1.3.1.1. Pré-tratamentos enzimático e químico	7
1.3.1.2. Tratamentos mecânicos	9
1.4. Propriedades e caracterização das suspensões dos materiais nanocelulósicos	10
1.4.1. Potencial eletrocinético	10
1.4.2. Titulação condutimétrica	10
1.4.3. Reologia	10
1.4.4. Rendimento em celulose nanofibrilada.....	11
1.5. Preparação de filmes de nanocelulose e suas propriedades	12
1.6. Filmes de nanoceluloses com incorporação de agentes antimicrobianos	15
1.7. Agentes antimicrobianos vs atividade antimicrobiana - óleo essencial de cravinho e o eugenol	16
1.7.1. Os microorganismos ensaiados	17
1.7.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos filmes - Método da difusão em agar	17
1.8. Ensaio de Libertação	18
Capítulo 2 - Materiais e Métodos.....	20
2.1. Produção das nanoceluloses	21
2.1.1. Processo de oxidação das pastas mediada por TEMPO.....	21

2.1.1.1. Caraterização do material celulósico obtido antes e depois da oxidação por TEMPO	22
2.1.1.1.1. Teor em grupos carboxílicos.....	22
2.1.1.1.2. Viscosidade intrínseca e grau de polimerização	23
2.1.2. Tratamento mecânico	25
2.2. Caraterização suspensões de nanoceluloses	26
2.2.1. Rendimento em celulose nanofibrilada.....	26
2.2.2. Potencial zeta.....	26
2.2.3. Ensaio de reologia	27
2.3. Produção de filmes de nanocelulose	28
2.3.1 Análise FTIR dos filmes produzidos.....	28
2.3.2. Análise morfológica dos filmes produzidos por SEM.....	28
2.4. Avaliação das propriedades físicas dos filmes produzidos.....	29
Os filmes foram caraterizados em termos das suas propriedades estruturais, mecânicas e de barreira (velocidade de transmissão de vapor de água).	
2.4.1. Determinação das propriedades estruturais	29
2.4.2. Determinação das propriedades mecânicas	29
2.4.3. Determinação da propriedade barreira.....	30
2.5. Atividade sequestradora do radical DPPH	31
2.6. Ensaio de libertação em meio aquoso e em meio de etanol.....	31
2.7. Avaliação da atividade antibacteriana	32
2.7.1. Microorganismos	32
2.7.2. Teste da difusão em agar	32
2.7.3. Agentes antimicrobianos	32
2.7.4. Filmes incorporados com os AG e com Tween 80.....	33

Capítulo 3 - Resultados e Discussão	34
3.1. Processo de oxidação das pastas por TEMPO.....	35
3.2. Propriedades das suspensões de CNF.....	36
3.2.1. Efeito do tratamento mecânico - obtenção de géis de nanocelulose	36
3.2.2. Reologia das suspensões de nanocelulose.....	38
3.2.3. Resultados dos ensaios oscilatórios	39
3.2.3.1. Resultados dos ensaios oscilatório das suspensões de NF	40
3.2.3.2. Resultados dos ensaios oscilatório das suspensões de AK1	41
3.2.3.3. Resultados dos ensaios oscilatório das suspensões de AK2	42
3.3. Produção de filmes	42
3.4. Caracterização dos filmes de CNF.....	43
3.4.1. Análise dos espectros FTIR dos filmes produzidos sem AG	43
3.4.1.1. Filmes sulfito (NF).....	43
3.4.1.2. Filmes kraft (AK1)	44
3.4.1.3. Filmes kraft (AK2)	45
3.4.2. Análise dos espectros FTIR dos filmes com CLO e EU	46
3.4.2.1. Análise dos espectros FTIR para NF, AK1 e AK2 com CLO	46
3.4.2.2. Análise dos espectros FTIR para NF, AK1 e AK2 com EU.....	47
3.5. Morfologia dos filmes de NF, AK1 e AK2, com e sem AG.....	48
3.5.1. Imagens SEM dos filmes de CNF sem AG	48
3.5.1.1. Filmes NF.....	48
3.5.1.2. Filmes AK1	49
3.5.1.3. Filmes AK2	50
3.5.2. Imagens SEM dos filmes de CNF com CLO e EU.....	52

3.5.2.1.	Filmes NF	52
3.5.2.2.	Filmes AK1	53
3.5.2.3.	Filmes AK2	55
3.5.3.	Propriedades estruturais, mecânicas e de barreira dos filmes.....	56
3.6.	Atividade sequestradora do radical DPPH	60
3.7.	Resultados dos ensaios de libertação em meio aquoso e em etanol.....	61
3.7.1.	Libertação de CLO e EU em filmes de NF, em meio aquoso e em etanol.	61
3.7.2.	Libertação de CLO e EU em filmes de AK1, em meio aquoso e em etanol	62
3.7.3.	Libertação de CLO e EU em filmes de AK2, em meio aquoso e em etanol.	63
3.8.	Resultados dos ensaios antimicrobianos	64
Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas futuras.....		71
Comunicações		75
Comunicações em poster no âmbito da dissertação - Anexo A		77
Comunicação oral no âmbito da dissertação - Anexo B		77
Referências Bibliográficas.....		79
Anexos		89
Anexos A - Apresentação de poster.....		91
Anexos B - Comunicação oral		92

Lista de Figuras

Figura 1.1: Estrutura hierárquica da madeira: da árvore à celulose (Reproduzido de Dufresne, 2013).	4
Figura 1.2: Representação da ligação β -1,4 glicosídica no polímero de celulose (Reproduzido de Nechyporchuk <i>et al.</i> 2015).	5
Figura 1.3: Quantificação dos pré-tratamentos aplicados com mais frequência para a produção de CMF (Reproduzido de Lavoine <i>et al.</i> , 2012).	7
Figura 1.4: Mecanismo representativo da ação combinada do sistema TEMPO/NaBr/NaClO (reproduzido de Isogai <i>et al.</i> , 2011).	8
Figura 1.5: Os processos de tratamento mecânico mais utilizados na produção de celulose microfibrilada: o homogeneizador, o microfluidificador e o moinho (Reproduzido de Lavoine <i>et al.</i> , 2012).	9
Figura 1.6: Imagem representativa da propriedade barreira dos filmes de CNF quando incorporados com agentes plastificantes (reproduzido de Hubbe <i>et al.</i> , 2017).	13
Figura 1.7: Representação esquemática das ligações por pontes de hidrogênio dos filmes de CNF (reproduzida de Hubbe <i>et al.</i> , 2017).	14
Figura 1.8: Imagem representativa das propriedades barreira dos filmes de CNF (reproduzida de Hubbe <i>et al.</i> , 2017).	15
Figura 2.1: Celulose oxidada depois das várias lavagens até pH neutro.	22
Figura 2.2: Montagem dos vários acessórios para a titulação condutimétrica, o titulador automático, o condutivímetro e o sensor de pH.	23
Figura 2.3: Ilustração da toma da amostra de CED para medir a viscosidade, com o viscosímetro.	24
Figura 2.4: Homogeneizador de alta pressão GEA Panther NS 3006L.	25
Figura 2.5: Equipamento de medição do potencial zeta das suspensões de nanocelulose	26
Figura 2.6: Reómetro Rheostress Rs 150 da Hakke com prato rugoso.	27
Figura 2.7: Micrómetro para medir a espessura dos filmes.	29
Figura 2.8: Ilustração de um ensaio de mecânico com uma tira de filme de nanocelulose a ser testada.	30
Figura 2.9: Caixas para medir a transferência de vapor de água (WVTR) nos filmes de nanocelulose.	30

Figura 3.1: Géis de nanocelulose: a) pasta sulfito (NF); b) e c) pasta ao sulfato AK1 e AK2 respectivamente.	36
Figura 3.2: Viscosidade dinâmica em função da velocidade de cisalhamento para todas as amostras de nanocelulose.	38
Figura 3.3: Tensão de corte em função da velocidade de cisalhamento para as amostras de nanocelulose.	39
Figura 3.4: Módulo de perda G' e módulo de armazenamento G'' para NF em ensaios oscilatórios.	40
Figura 3.5: Módulo de perda G' e módulo de armazenamento G'' para AK1 em ensaios oscilatórios.	41
Figura 3.6: Módulo de perda G' e módulo de armazenamento G'' para AK2 em ensaios oscilatórios.	42
Figura 3.7: Espectro FTIR de filmes de NF.	43
Figura 3.8: Espectro FTIR de filmes de AK1.	44
Figura 3.9: Espectro FTIR de filmes de AK2.	45
Figura 3.10: Espectro FTIR dos filmes NF, AK1 e AK2, incorporados com CLO (com o EU como componente principal).	46
Figura 3.11: Espectro FTIR dos filmes NF, AK1 e AK2, incorporados com EU.	47
Figura 3.12: Imagem da superfície de um filme NF.	48
Figura 3.13: Imagem de secção transversal de um filme de NF.	48
Figura 3.14: Imagem de secção transversal de um filme de NF com medição da espessura. ...	49
Figura 3.15: Imagem de superfície de um filme de AK1.	49
Figura 3.16: Imagem de corte transversal de um filme de AK1.	49
Figura 3.17: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com medição da espessura. ...	50
Figura 3.18: Imagem de superfície de um filme de AK2.	50
Figura 3.19: Imagem de corte transversal de um filme de AK2.	50
Figura 3.20: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com medição da espessura. ...	51
Figura 3.21: Imagem de corte transversal de um filme de NF com CLO.	52
Figura 3.22: Imagem de corte transversal de um filme de NF com CLO com medição da espessura.	52
Figura 3.23: Imagem de corte transversal de um filme de NF com EU.	52
Figura 3.24: Imagem de corte transversal de um filme de NF com EU com medição da espessura.	53
Figura 3.25: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com CLO.	53
Figura 3.26: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com CLO com medição da espessura.	53
Figura 3.27: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com EU.	54
Figura 3.28: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com EU com medição da espessura.	54
Figura 3.29: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com CLO.	55

Figura 3.30: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com CLO com medição da espessura.	55
Figura 3.31: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com EU.	55
Figura 3.32: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com EU com medição da espessura.	56
Figura 3.33: A) Módulo da resistência à tração para filmes controle e com CLO e EU. B) Alongamento para filmes controle e com CLO e EU.	58
Figura 3.34: A) Módulo da elasticidade para filmes controle e com CLO e EU; B) Velocidade de transmissão de vapor de água em filmes controle e com CLO e EU.	58
Figura 3.35: Atividade sequestradora do radical DPPH em filmes controle e filmes de com EU e CLO.	60
Figura 3.36: Representação da libertação de CLO e EU em filmes NF em meio aquoso.	61
Figura 3.37: Representação da libertação de CLO e EU em filmes NF em etanol.	61
Figura 3.38: Representação da libertação de CLO e EU em filmes AK1 em meio aquoso.	62
Figura 3.39: Representação da libertação de CLO e EU em filmes AK1 em etanol.	62
Figura 3.40: Representação da libertação de CLO e EU em filmes AK2 em meio aquoso.	63
Figura 3.41: Representação da libertação de CLO e EU em filmes AK2 em etanol.	63
Figura 3.42: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> LMG 13305 para CLO e EU.	65
Figura 3.43: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 para CLO e EU.	65
Figura 3.44: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 para CLO e EU.	65
Figura 3.45: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 para CLO e EU.	66
Figura 3.46: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 para CLO e EU em filmes NF, AK1 e AK2.	66
Figura 3.47: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 para CLO e EU em filmes NF, AK1 e AK2.	67
Figura 3.48: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 para CLO e EU em filmes NF, AK1 e AK2.	67
Figura 3.49: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> LMG 13305 para CLO e EU em filmes NF, AK1 e AK2.	67
Figura 3.50: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> LMG 13305 para CLO e EU a 50% e 100% respetivamente em filmes de AK2.	68
Figura 3.51: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 para CLO e EU a 50% e 100% respetivamente em filmes de AK2.	68
Figura 3.52: Resultado em placa de agar na inibição de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 para CLO e EU a 50% e 100% respetivamente em filmes de AK2.	68

Figura 3.53: Resultado em placa de agar na inibição de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 para CLO e EU a 50% e 100% respectivamente em filmes de AK2. 69

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Equações obtidas das curvas de calibração e respectivos R-quadrado para os diferentes solventes para CLO e EU	32
Tabela 3.1: Resultados da caracterização das pastas antes de depois da oxidação com o reagente TEMPO.....	35
Tabela 3.2: Resultados obtidos para o rendimento de fibrilação, viscosidade intrínseca e potencial zeta (pH≈ 6) das suspensões.....	36
Tabela 3.3: Grupos identificados nos filmes NF.....	43
Tabela 3.4: Grupos identificados nos filmes AK1.....	44
Tabela 3.5: Grupos identificados nos filmes AK2.....	45
Tabela 3.6: Grupos característicos da molécula de EU identificados nos filmes.....	46
Tabela 3.7: Grupos característicos da molécula de EU identificados nos filmes.....	47
Tabela 3.8: Tabela resumo das características dos filmes com CLO e EU para cada uma das nanoceluloses em relação à espessura, gramagem e densidade.....	57
Tabela 3.9: Diâmetros dos halos de inibição (mm) dos compostos antimicrobianos relativamente aos microrganismos estudados.....	64

Lista de Acrónimos

PHAs	polihidroxicanoatos
CMF	celulose microfibrilada
NCC	nanocristais de celulose
CNF	nanofibras de celulose
MNC	materiais nanocelulósicos
COPA	cisalhamento oscilatório de pequena amplitude
RVL	resposta viscoelástica linear
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
TMS	teor de matéria seca
CED	cuprietenodiamina
GP	grau de polimerização
Sc	teor de sólidos
CLO	óleo essencial de cravinho-da-índia
EU	eugenol
Au	ouro
WVTR	velocidade de transmissão de vapor de água
HR	humidade relativa
DPPH	2-2-difenil-1-picrihidrazila
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
AG	agentes antimicrobianos
DMSO	dimetilsulfóxido
MHA	Müller-Hinton Agar
NF	pasta ao sulfito comercial
AK	pasta kraft comercial
CMC	carboximetilcelulose
DLS	dispersão de luz dinâmica
SEM	microscópio eletrônico de varrimento

Capítulo 1 - Introdução geral

1.1. Contextualização

Nos dias de hoje, a indústria de embalagens para a área alimentar tem sido identificada como a maior consumidora de materiais plásticos derivados do petróleo. O uso destes materiais gera problemas tanto económicos como ambientais, principalmente devido à falta de uma correta eliminação e de um bom sistema de gestão de resíduos (municipal, regional, nacional, etc.), estes materiais não são biodegradáveis (Johansson *et al.*, 2012; Geueke *et al.*, 2018). Para evitar esse impacto negativo no meio ambiente, organizações internacionais como a União Europeia e empresas privadas, como por exemplo a Tetra Pack, estão a promover diferentes estratégias para enfrentar este problema, tal como o desenvolvimento de novos materiais baseados em recursos renováveis (Tetra Pack, 2009) <https://www.tetrapak.com/sustainability/customer-focus/sustainable-packages>; POEU, 2011;) em simultâneo com diferentes técnicas, como a avaliação do ciclo de vida e avaliação do impacto ambiental (Arvanitoyannis & Bosnea, 2001). O uso de biopolímeros é uma estratégia interessante para a substituição de polímeros não renováveis. Existem dois tipos de biopolímeros: aqueles que vêm de organismos vivos, como os polissacáridos (amido, celulose), as proteínas (glúten de trigo, proteína de soja, gelatina) e poliésteres como polihidroxicanoatos (PHAs), que são produzidos por bactérias. O segundo tipo de biopolímero inclui o ácido poliláctico que precisa ser polimerizado, mas têm por base recursos renováveis (Tang *et al.*, 2012). O uso de biocompósitos para embalagens alimentares ativas é uma das abordagens mais estudadas nos últimos anos em materiais em contato com alimentos (Valdés *et al.*, 2014).

O conceito de “embalagem ativa” foi introduzido pelo Regulamento da União Europeia (EC) 1935/2004 (EU 2004) e foi ainda regulamentado pelo Regulamento (CE) Nº 450/2009 (UE 2009). Este Regulamento define no artigo 3º «materiais e objetos ativos», “destinados a alargar o prazo de validade ou manter ou melhorar o estado dos alimentos embalados. São concebidos de forma a incorporar deliberadamente componentes que libertem substâncias para os alimentos embalados ou o ambiente que os envolve ou que absorvam tais substâncias desses alimentos ou do ambiente que os envolve ” e cria um quadro jurídico para o futuro desenvolvimento de legislação relativa às embalagens ativas (Comissão Europeia, 2009).

A embalagem ativa envolve o suporte, o revestimento ou a absorção de componentes ativos numa matriz sólida da qual eles podem ser libertados para a atmosfera e agir como agentes de conservação de alimentos (Seydim & Sarikus, 2006; Comissão Europeia, 2009).

A embalagem ativa antimicrobiana é uma forma de embalagem que visa estender a estabilidade dos alimentos e assegurar a sua qualidade / segurança durante a vida em prateleira (Seydim & Sarikus, 2006). Além destes requisitos as propriedades de barreira os alimentos e o meio ambiente, diminuindo a razão de alterações químicas, físicas e microbiológicas. A permeabilidade ao vapor de água e a permeabilidade ao oxigénio são atributos importantes para materiais destinados à proteção de alimentos. A diminuição da solubilidade em água dos materiais hidrofílicos também é importante, uma vez que um certo

grau de resistência à água é desejável para a maioria das aplicações de alimentos, especialmente para evitar a desintegração do filme quando em contato com superfícies de alimentos húmidos, como carne e frutas frescas. As propriedades de resistência são importantes para proteger os alimentos contra danos mecânicos. A transparência também é geralmente desejável, para que o consumidor possa ver o produto (Azeredo *et al.*, 2017). O uso de nanoestruturas de celulose para produzir filmes para embalagens alimentares de base biológica representará uma mais-valia no *design* de uma embalagem ativa e renovável.

O objetivo deste estudo foi produzir um bio-nano-material, a nanocelulose, formar filmes à base de nanocelulose incorporados com compostos antimicrobianos, o óleo essencial de cravinho-da-índia e o eugenol.

No capítulo 1 apresenta-se a revisão da literatura, dando a conhecer o que foi feito e desenvolvido por outros autores. Apresentadas as mais-valias da matéria-prima celulose, os principais métodos de caracterização de suspensões e de filmes, bem como uma apresentação dos compostos antimicrobianos e antioxidantes, métodos de avaliação e os microorganismos.

No capítulo 2 apresenta-se as principais metodologias de produção, caracterização, e libertação dos compostos da matriz de nanocelulose e teste antimicrobiano.

Por fim, no capítulo 3 compilaram-se todos os resultados, procurou-se descrever e caracterizar os comportamentos da nanocelulose desde o processo de produção à formação dos filmes. Estudaram-se as suas propriedades estruturais, mecânicas e de barreira, a sua estrutura interna e ainda se caracterizou a incorporação dos compostos nas suas matrizes. Também se estudou o potencial ativo na libertação de compostos dos filmes produzidos quando incorporados com as moléculas de interesse, quer no potencial antioxidante e na capacidade de inibir crescimento microbiano. Destes ensaios retiraram-se conclusões das propriedades dos filmes. Desde o processo de produção da nanocelulose à libertação de compostos da matriz dos filmes mas também possíveis estratégias para continuar a desenvolver e estudar esta área dos materiais que apresenta enormes potencialidades.

1.2. Materiais celulósicos

A nanocelulose é um material que apresenta renovabilidade e biodegradabilidade altamente valorizadas atendendo às exigências atuais em conformidade ambiental. Além disto, exhibe excelente resistência mecânica, grande área de superfície, grande biocompatibilidade, alta hidrofiliabilidade e uma ampla capacidade de modificação química (Klemm *et al.*, 2011; Habibi, 2014).

Como resultado, a nanocelulose está a promover uma revolução no domínio dos materiais sustentáveis para diversas aplicações: transportador de fármacos, embalagem de alimentos, dispositivos eletrónicos flexíveis, engenharia de tecidos *scaffolds*, materiais biomiméticos, reforço de nanocompósitos, etc (Siró & Plackett, 2010; Isogai, 2013).

1.3. Da madeira à nanocelulose

A natureza produz biocompósitos hierárquicos celulares como a madeira que são essencialmente matrizes amorfas reforçadas com microfibrilas de celulose semicristalina onde se incluem hemicelulose, lenhina, ceras, extrativos e oligoelementos como esquematizado na figura 1.1 (Dufresne, 2013). A celulose pode ser encontrada principalmente nas plantas lenhosas (madeira), plantas anuais e nos vegetais. As duas categorias principais de fibras de madeira são fibras provenientes de madeira de folhosas e fibras de madeira de resinosa que têm dimensões e composições químicas diferentes.

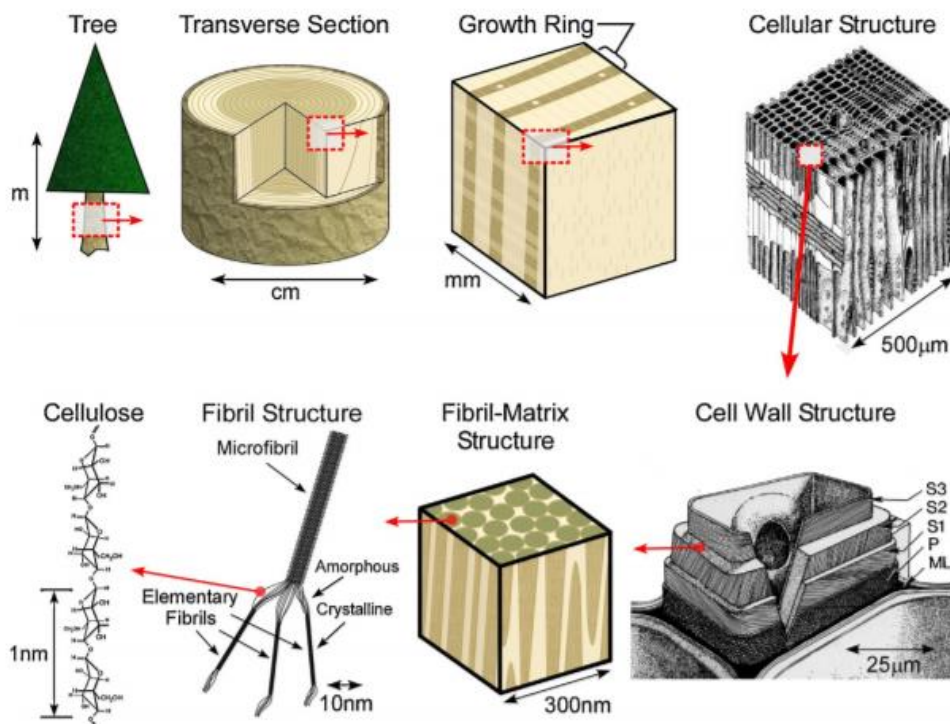


Figura 1.1: Estrutura hierárquica da madeira: da árvore à celulose (Reproduzido de Dufresne, 2013).

A celulose é o polímero mais abundante na Terra, é um recurso renovável e biodegradável, bem como não tóxico (Dufresne, 2013). É um polissacárido linear composto de uma unidade de repetição, chamada celobiose, que é uma combinação de dois anéis de anidroglicose unidos via uma ligação β-1,4 glicosídica (Siqueira, *et al.*, 2010) como mostrado na Figura 1.2.

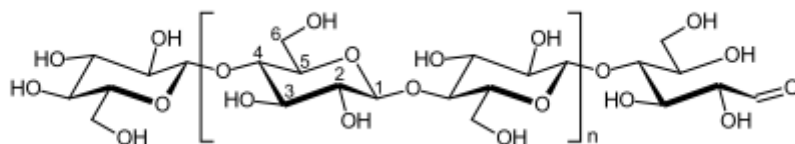


Figura 1.2: Representação da ligação β -1,4 glicosídica no polímero de celulose (Reproduzido de Nechyporchuk *et al.*, 2015).

As moléculas de celulose são pequenas peças que se agregam em 30 a 40 cadeias, formando microfibrilas (fibrilas elementares) individuais de cerca de 5 a 10 nm de diâmetro. Estas agregam-se em feixes, as macrofibrilas, formando a parede celular das fibras (Isogai *et al.*, 2011; Lavoine *et al.*, 2012). Esta estrutura é muito sólida graças às interações entre esses pequenos elementos, mas um forte tratamento mecânico, como várias passagens de uma suspensão de pasta a alta pressão (600 a 1500 bar) em um homogeneizador pode quebrar as ligações, e torna possível a individualização das microfibrilas e feixes de microfibrilas (Spence *et al.*, 2011). Os elementos fibrosos em micro ou nanoescala presentes na pasta resultante será então denominada celulose microfibrilada (CMF), composta por zonas cristalinas e amorfas de forma alternada (Bras *et al.*, 2010).

Uma forte hidrólise ácida do material celulósico, a pasta, é capaz de remover toda a celulose amorfa, dando uma suspensão de cristais nanométricos denominados nanocristais de celulose (NCC) (Siqueira, Bras, & Dufresne, 2009). Na literatura, os nanocristais de celulose também podem ser encontrados sob os nomes de “whiskers” ou bigodes, bigodes de celulose, nano-whiskers ou nanopartículas de celulose cristalina. A CMF e NCC são as duas principais variedades de nanoceluloses, embora exista uma outra forma denominada celulose bacteriana - uma celulose microfibrilada muito pura produzida por bactérias (Lavoine *et al.*, 2012). Os tipos de CMF e NCC distinguidos pelo seu processo de produção e os tratamentos de modificação química, como por exemplo a oxidação mediada por TEMPO (Isogai *et al.*, 2011).

Os termos mais aceites atualmente na literatura são CNF (celulose nanofibrilada) ou CMF (celulose microfibrilada), mas uma grande variedade de outros nomes pode ser encontrada na literatura referente a este material: microfibrilas de celulose, nanofibrilas de celulose, nanocelulose, celulose nanofibrilada, nanofibras de celulose, filamentos de celulose, nanopartículas de celulose, ou nanofibras de celulose oxidadas por TEMPO (Lavoine *et al.*, 2012; Dufresne, 2013). De fato, existem numerosos tipos de CMF, dependendo da fonte de celulose e dos tratamentos físicos e químicos usados para produzi-las (Dufresne, 2013). As diferentes fontes de matérias primas acima citadas podem ser usadas para produzir a CMF, contudo, a madeira é obviamente o material mais importante industrialmente para produzir pastas “base fibras de celulose”, sendo a pasta branqueada ao sulfato (kraft) mais usada do que a pasta branqueada ao sulfito (Lavoine *et al.*, 2012).

1.3.1. Processos de produção de celulose nanofibrilada

O processo de produção de celulose microfibrilada foi descoberto por (Herrick *et al.*, 1983) e patentado por (Turback *et al.*, 1985).

Atualmente, uma das metodologias mais utilizadas para preparar nanoceluloses oxidadas é a aplicação do reagente TEMPO (radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina1-oxilo) seguida de tratamento mecânico (Saito *et al.*, 2007 e 2009).

É de salientar que a matéria-prima de partida para a produção de celulose nanofibrilada tem influência no produto final que se obtém, um exemplo disso é o trabalho de (Meng *et al.*, 2016). Estes autores estudaram o sistema TEMPO/ NaBr/NaClO seguida de passagem no homogeneizador de alta pressão, nas mesmas condições, para pastas kraft branqueadas, mas para matérias-primas lenhosas (pinheiro e eucalipto) e não lenhosas (bamboo e bagaço), com teores e composições químicas distintas de hemiceluloses (Meng *et al.*, 2016). Para a pasta de resinosa, o teor em mananas causaram o consumo não benéfico de produtos químicos e a razão de oxidação mediada por TEMPO foi a mais rápida porque a maioria das mananas foi oxidada e removida durante a oxidação (Meng *et al.*, 2016).

Para as folhosas, a maioria das xilanas foi estável durante a oxidação e influenciou negativamente a formação de grupos carboxílicos, dificultando a acessibilidade química à celulose. Com menor nível de heteropolissacáridos na oxidação mediada por TEMPO, a suspensão correspondente foi mais transparente e com uma viscosidade mais baixa (Meng *et al.*, 2016).

1.3.1.1. Pré-tratamentos enzimático e químico

Na figura 1.3 apresenta-se uma síntese em termos dos pré-tratamentos aplicados mais frequentemente.

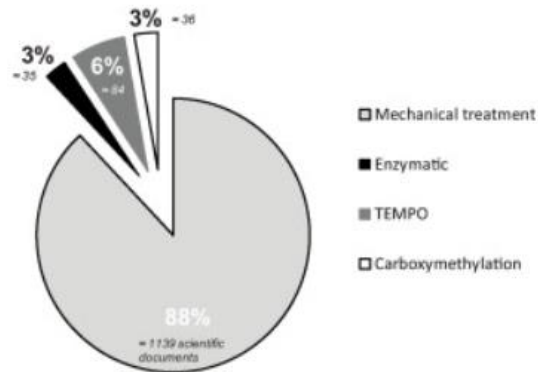


Figura 1.3: Quantificação dos pré-tratamentos aplicados com mais frequência para a produção de CMF (Reproduzido de Lavoine *et al.*, 2012).

A combinação do tratamento mecânico de refinação numa pasta, seguido de tratamento enzimático com endoglucanase, refinação, e passagem da suspensão fibrosa através do microfluidizador foi usado para obter CMF (Pääkko *et al.*, 2007).

Siqueira *et al.* (2011) estudaram o efeito de aplicação de dois tipos de enzimas a diferentes concentrações, nas propriedades finais das CMF obtidas. Este pré-tratamento é referido como amigo do ambiente e permite conferir uma estrutura adequada ao produto pretendido (Siqueira *et al.*, 2011). A oxidação de uma pasta mediada por TEMPO, para além de ser o processo de pré-tratamento mais usado, é também o mais promissor na modificação da superfície da celulose (Saito & Isogai, 2006; Saito *et al.*, 2007). O sistema TEMPO/NaBr/NaClO foi o usado neste trabalho e apresenta-se de forma esquemática na Figura 1.4.

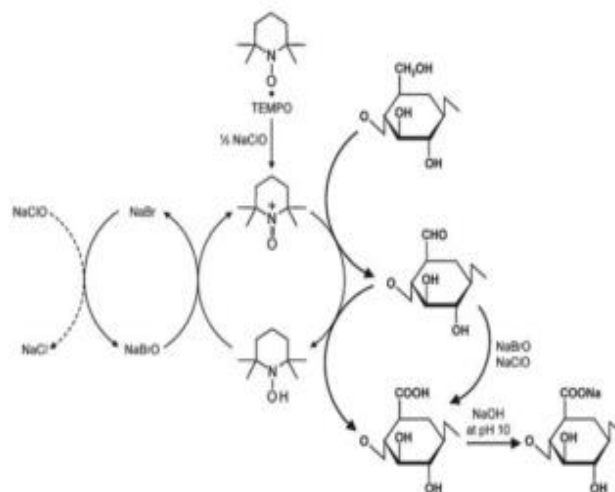


Figura 1.4: Mecanismo representativo da ação combinada do sistema TEMPO/NaBr/NaClO (reproduzido de Isogai *et al.*, 2011).

O princípio básico desta forma de pré-tratamento é a oxidação de fibras celulósicas pela adição de NaClO, como oxidante primário, a suspensões de celulose na presença de TEMPO com quantidades catalíticas de NaBr, a pH 10-11 e temperatura ambiente. Os grupos hidroxilos primários C6 da celulose são convertidos seletivamente em grupos carboxílicos, via os grupos aldeído C6 e apenas o NaClO e NaBr são consumidos (Saito & Isogai, 2006). Como resultado, as nanofibrilas dentro das fibras separam-se melhor umas das outras, devido às forças repulsivas entre os carboxílicos ionizados, que sobrecarregam as ligações de hidrogénio mantendo-as juntas (Eichhorn *et al.*, 2010). Quanto mais NaClO é adicionado, mais grupos carboxílicos são formados na superfície da CMF e o tempo de oxidação também aumenta (Saito *et al.*, 2007). Com um aumento na adição de NaClO de 3,8 a 5,0 mmol/g, o teor de carboxílicos aumentou de apenas 0,2-0,3 mmol/g, enquanto que o tempo de oxidação aumentou 40 a 45 min para 115 a 130 min (Saito *et al.*, 2007). Outros pré-tratamentos químicos foram testados como o sistema TEMPO/NaClO/NaClO₂ (Hirota *et al.*, 2010), a carboximetilação e a acetilação (Lavoine *et al.*, 2012). Existem vários tratamentos para obter as suspensões de celulose micro/nanofibrilada, contudo, para cada um deles é importante ter em atenção uma diminuição no consumo de energia para a sua produção, de modo a cumprir uma agenda política sustentável e angariar interesse de mercado. Como referido anteriormente, as várias propriedades destas suspensões são atraentes em diferentes campos, e os vários métodos de produção originam diferentes características que em seguida detalharemos.

1.3.1.2. Tratamentos mecânicos

Os tratamentos mecânicos foram os primeiros a ser usados para produzir a celulose microfibrilada, depois de desenvolvimento e conceção de diferentes equipamentos como os que se apresentam na figura 1.5. Os principais tratamentos mecânicos utilizados para a produção de CMF são realizados com o homogeneizador de pressão, detalhado a seguir, ou com o moinho (*grinder*).

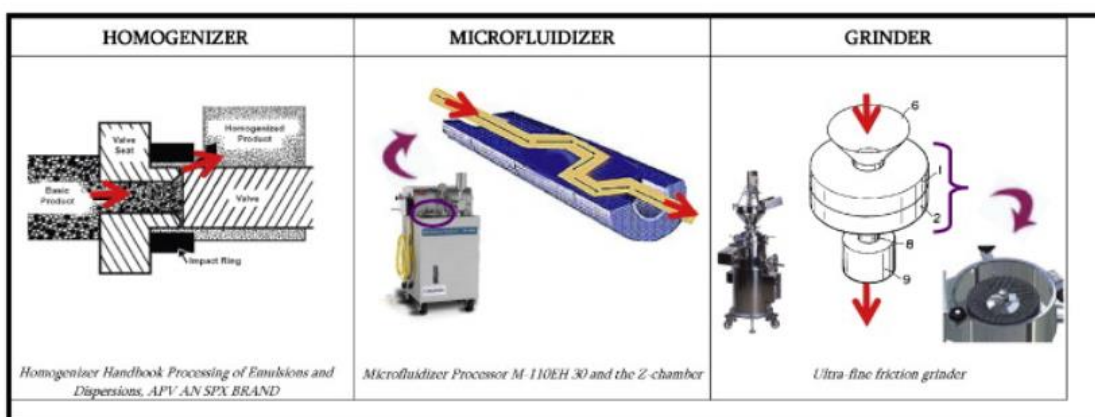


Figura 1.5: Os processos de tratamento mecânico mais utilizados na produção de celulose microfibrilada: o homogeneizador, o microfluidizador e o moinho (Reproduzido de Lavoine *et al.*, 2012).

Estes equipamentos, o homogeneizador de pressão, o microfluidizador e o processo de moagem (*grinder*) requerem frequentemente várias passagens da amostra para desconstruir a estrutura da celulose, produzindo nanocelulose, o que representa um elevado consumo de energia (Zimmermann *et al.*, 2010; Spence *et al.*, 2011). Este parâmetro tornaria inviável o uso à escala industrial, pelo que se passou a combinar com os pré-tratamentos enzimáticos e químicos (Zimmermann *et al.*, 2010).

O homogeneizador é o equipamento mais usado já que torna possível obter nanofibras de tamanho mais uniforme. De forma simples, o princípio de funcionamento é o seguinte: a pasta passa por câmaras finas em forma de z (com dimensões de canal que são geralmente 200-400 μm) sob alta pressão, ou seja, 2070 bar. A taxa de cisalhamento aplicada é muito alta (até 107 s^{-1}), o que resulta na formação de nanofibras de celulose muito finas (Siqueira *et al.*, 2010; Lavoine *et al.*, 2012).

1.4. Propriedades e caracterização das suspensões dos materiais nanocelulósicos

1.4.1. Potencial eletrocinético

O potencial zeta também designado como potencial eletrocinético é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, depende não somente da superfície da partícula, mas do dispersante e pode ser afetado pelo pH, temperatura ou força iônica do meio. A interação das partículas dá-se pela magnitude do potencial zeta e não pela sua carga de superfície, dessa forma, pode-se prever a estabilidade de suspensões coloidais (Bhattacharjee, 2016). A estabilidade coloidal das micro/nanoceluloses é frequentemente o resultado de repulsão eletrostática devido à presença de grupos carregados na superfície da partícula. Como resultado, o potencial zeta, está relacionado ao potencial de superfície e densidade de carga superficial e é usado para avaliar rapidamente a estabilidade coloidal da micro/nanoceluloses numa variedade de meios (Foster *et al.*, 2018). O potencial zeta pode ser medido usando um analisador de mobilidade eletroforético, pelo qual a mobilidade de uma partícula num campo elétrico aplicado é determinada por espalhamento de luz eletroforético. Este parâmetro é comumente relatado na literatura e é convencionalmente usado para avaliar mudanças relativas na estabilidade coloidal (Foster *et al.*, 2018).

1.4.2. Titulação condutimétrica

Geralmente, os materiais nanocelulósicos possuem pelo menos uma pequena densidade de carga de superfície que transmite repulsão eletrostática suficiente para torná-las coloidalmente estáveis em suspensão aquosa. Isto é particularmente relevante no caso da celulose nanofibrilada, em que a densidade de carga de superfície é mais frequentemente controlada para reduzir o consumo de energia necessário para delaminar as fibras (Klemm *et al.*, 2011), para avaliar as propriedades reológicas em suspensão (Araki *et al.*, 1998), as interações físico-químicas e estabilidade térmica (Roman & Winter, 2004).

Embora as titulações condutimétricas possam ser usadas para determinar a densidade de carga da superfície, elas não fornecem informações significativas sobre a agregação de partículas e / ou estabilidade coloidal, particularmente em meios de variação de pH e / ou força iônica (Foster *et al.*, 2018).

1.4.3. Reologia

A reologia é um instrumento usado para análise dos materiais nanocelulósicos (MNC) e tem como objetivos principais, determinar o impacto das propriedades físicas e químicas dos MNC no processamento, determinar os impactos do processamento na dispersão e como medida de controlo de qualidade para comparação de diferentes suspensões de MNC. A reologia, ou a

resposta deformativa de um material a uma força aplicada, é fundamental para entender o comportamento dos MNC no processamento e está diretamente ligada com o grau de dispersão e as interações entre o MNC e o solvente (Moberg *et al.*, 2017; Nechyporchuk *et al.*, 2016).

As propriedades reológicas são avaliadas num reómetro cujos dois principais modos de teste são: cisalhamento constante e cisalhamento oscilatório de pequena amplitude (COPA). O modo de cisalhamento constante é normalmente usado para determinar a viscosidade de cisalhamento em massa, (η) e/ ou η dependente do tempo de uma amostra, enquanto o COPA é particularmente útil na medição das propriedades viscoelásticas, por exemplo, viscosidade complexa (η^*), módulo de armazenamento de cisalhamento (G') e módulo de perda de cisalhamento (G'') da amostra (Nechyporchuk *et al.*, 2016; Foster *et al.*, 2018).

Citando o artigo de revisão de Foster *et al.*, (2018):

“para analisar o comportamento viscoelástico de uma suspensão de MNC é preciso determinar a dependência da amplitude de deformação do G' , do módulo de perda de cisalhamento (G'') e avaliar a região de deformação dentro da qual a resposta viscoelástica linear (RVL) da amostra é observada. Para encontrar a região de tensão RVL da amostra, o teste de varrimento de tensão oscilatório deve ser realizado com uma frequência constante. G' e G'' devem ser representados em função da deformação. A região RVL é a região de deformação dentro da qual G' permanece constante, e abaixo da deformação crítica no início do comportamento não-linear de G' . Se G' for maior que G'' , isso indica que a amostra exhibe comportamento tipo sólido na região RVL. As propriedades reológicas da amostra dependentes do tempo podem ser medidas usando o teste de varrimento de tempo oscilatório (deformação e frequência constantes)” (Foster *et al.*, 2018).

1.4.4. Rendimento em celulose nanofibrilada

O rendimento é definido como a razão entre da quantidade de celulose nanofibrilada (CNF) no sobrenadante em relação à quantidade inicial de CNF antes da sujeita a ultrassons e centrifugação. Isto mostrou ser um meio eficiente para separar os materiais não-fibrilados daqueles parcialmente fibrilados (Boufi & Chaker, 2016). O rendimento de fibrilação permite compreender como os efeitos mecânicos do homogeneizador de alta pressão em partir as fibras, como a eficiência do tratamento químico relacionando o conteúdo em grupos carboxílicos de facto afetam a morfologia das fibras presentes na CNF (Boufi & Chaker, 2016). Este parâmetro pode em parte ajudar também a entender os efeitos de barreira ao oxigénio característica comum nos filmes de CNF (Padberg, *et al.*, 2016).

1.5. Preparação de filmes de nanocelulose e suas propriedades

Os principais métodos para a formação de filmes de CNF podem ser divididos em métodos de processamento a seco e a húmido. O processo de extrusão (a seco) força a mistura de biopolímeros a um processo de alta pressão e temperatura, que permite adquirir a forma pretendida, i.e., folha, fibra, filamento ou outra (Azeredo *et al.*, 2010; Nechyporchuk *et al.*, 2015). Este tipo de processo é geralmente empregue na formação de embalagens laminadas ou de materiais de origem sintética (Azeredo *et al.*, 2010; Nechyporchuk *et al.*, 2015).

O método mais popular de produção dos filmes é por evaporação do solvente (*solvent casting*) onde uma suspensão de celulose microfibrilada com uma baixa percentagem de sólidos é colocada a uma temperatura monitorizada entre 23°C a 65°C e humidade de 50% ou temperatura ambiente, para que ocorra secagem livre (Hubbe *et al.*, 2017). Este processo poder ser conduzido em meio aquoso ou em meio não aquoso, normalmente usa etanol como solvente. Em meio aquoso existe a vantagem de se promover ligações de hidrogénio entre as nanopartículas de celulose durante o processo de secagem (Hubbe *et al.*, 2017). O processo não aquoso permite a dissolução de compostos inseridos na matriz com carácter hidrofóbico. Ambos apresentam vantagens, mas ambos são dependentes da dispersão formada e da razão sólido/líquido presente, que determinam a dispersão homogénea final do filme, como desvantagem, a necessidade de evaporar grandes quantidades de solvente (Hubbe *et al.*, 2017).

Na maioria dos casos, devido à sua relativa fragilidade e baixa ductilidade os filmes de CNF necessitam da presença de plastificantes. Os principais agentes plastificantes referidos na literatura são: o glicerol, a glicerina, o polietilenoglicol, o sorbitol, entre outros, estas soluções promovem a elasticidade e a ductilidade da CNF (Spoljaric *et al.*, 2015). Contudo, também aparenta existir um maior efeito de migração em filmes com agentes plastificantes quando comparados com filmes com apenas CNF e ainda uma redução significativa nas propriedades de resistência ao oxigénio, uma vez que os agentes plastificantes apresentam de uma maneira geral menor capacidade para formar ligações por pontes de hidrogénio impedindo a ligação entre cadeias de CNF com impacto na solidez e compatibilidade da estrutura (Spoljaric *et al.*, 2015; Bajpai, 2017; Hubbe *et al.*, 2017). O impacto da adição de plastificantes está representado na figura 1.6.

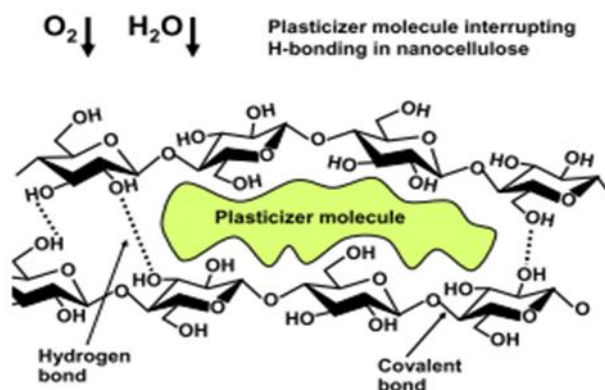


Figura 1.6: Imagem representativa da propriedade barreira dos filmes de CNF quando incorporados com agentes plastificantes (reproduzido de Hubbe *et al.*, 2017).

A produção de filmes de CNF requer ultrapassar alguns problemas colocados pelas características da CNF, desde logo, a sua elevada viscosidade resultante das suas propriedades reológicas, fazem com que seja necessário preparar suspensões aquosas de CNF (Kolakovic *et al.*, 2013). Tal pode ser explicado pelo fato do tratamento por TEMPO promover um aumento de cargas negativas à superfície que influenciam na relação com que ocorrem formação de agregados alterando as propriedades em termos de viscosidade, tensão de corte e propriedades viscoelásticas (Moberg *et al.*, 2017). Assim, o tratamento químico promove a introdução de grupos aniônicos fortes, que levam a repulsões electrostáticas entre as nanofibrilas com a mesma carga e impede a formação de ligações por pontes de hidrogénio e interações de Van der Waals, resultando nanoceluloses que não formam agregados e conseguem formar soluções coloidais estáveis, resultando em suspensões de nanoceluloses muito mais transparentes (Nechyporchuk *et al.*, 2016).

Os filmes de nanocelulose foram estruturas densas e compactas, com grupos hidroxilos à superfície capazes de formarem ligações com outras moléculas e entre cadeias de celulose, conferindo à estrutura estas características. A figura 1.7 ilustra estas ligações.

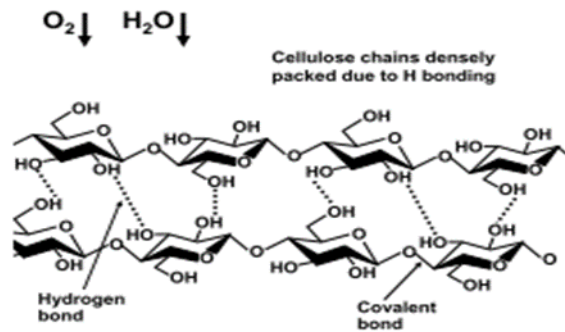


Figura 1.7: Representação esquemática das ligações por pontes de hidrogénio dos filmes de CNF (reproduzida de Hubbe *et al.*, 2017).

Os filmes produzidos apenas com nanocelulose tendem a apresentar uma aparência translúcida, geralmente sem defeitos e sem redução de tamanho significativo, ainda que, este seja um critério dependente do tamanho das fibrilas, da sua distribuição e do método de produção do filme (Tammelin & Vartiainen, 2014). Apresentam estruturas compactas, superfícies lisas, geralmente impermeáveis a compostos lipídicos e boas propriedades mecânicas com valores a atingir os 10 GPa referente ao módulo de Young (Bajpai, 2017). A avaliação da capacidade dos filmes na proteção dos alimentos contra danos mecânicos é feita medindo as propriedades mecânicas como a resistência à tração, ao alongamento, à rutura e o módulo de Young ou módulo de elasticidade. Outras propriedades que permitem validar as propriedades de resistência e caracterizar o material são as propriedades estruturais, como a gramagem e a espessura, usadas para calcular a densidade apresentam filmes com base em nanocelulose com 3-100 μm de espessuras (Taniguchi & Okamura, 1998). Todas estas propriedades são determinadas de acordo com as normas ISO e referidas no capítulo 2 deste trabalho.

Propriedades como a permeabilidade ao oxigénio, permeabilidade ao dióxido de carbono (para casos específicos), transferência de vapor de água, impedir ou retardar a migração de compostos e incorporar aditivos dos mais variados tipos, sejam aromas, corantes, antioxidantes ou agentes antimicrobianos são outros dos requisitos para os filmes a aplicar em embalagem (Tharanathan, 2003; Lavoine *et al.*, 2012). Estes desafios estão resumidamente representados na seguinte figura 1.8.

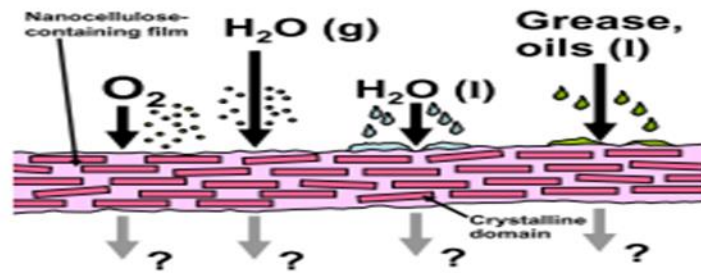


Figura 1.8: Imagem representativa das propriedades barreira dos filmes de CNF (reproduzida de Hubbe *et al.*, 2017).

A caracterização referente à modificação química de materiais celulósicos é feita por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), esta constitui uma técnica fundamental para estabelecer a presença de grupos e ligações na superfície das nanopartículas e é portanto, comumente usado para validar a eficácia do *grafting*, e do *grafting* a partir de reações químicas visando uma funcionalidade (Lavoine *et al.*, 2012).

Esta técnica é utilizada na grande maioria dos casos como um estudo qualitativo e/ou comparativo, a amostra é irradiada com luz infravermelha (Lavoine *et al.*, 2012). O dispositivo mede a quantidade de luz absorvida, transmitida e / ou refletida após a luz ter interagido com a amostra e reporta a absorvância como uma função do número de onda. Fornece informações sobre vibrações moleculares, que pode ser usado para identificar as propriedades químicas e físicas dos grupos funcionais dentro da amostra (Lavoine *et al.*, 2012).

1.6. Filmes de nanoceluloses com incorporação de agentes antimicrobianos

A deterioração dos alimentos por microorganismos, bem como, a oxidação dos lípidos são uma das principais causas de perda dos alimentos. Para que os alimentos mantenham a qualidade, com aumento de vida de prateleira do produto, e de rentabilidade para a indústria, é preciso controlar a oxidação lipídica e o crescimento microbiano. Este último, se aparecer nos alimentos é preocupante devido ao fato de diversos microorganismos serem patogênicos (Moraes *et al.*, 2007).

1.7. Agentes antimicrobianos vs atividade antimicrobiana - óleo essencial de cravinho e o eugenol

A utilização de óleos essenciais tem sido uma constante ao longo da história da humanidade, devido às suas mais variadas aplicações que vão desde a medicina, a perfumaria, culinária entre outras aplicações (hoje em dia conhecem-se pelo menos mais de 3000 óleos essenciais) (Vergis *et al.*, 2015). Os óleos essenciais também designados por essências, são produtos do metabolismo secundário, consistindo numa mistura complexa de inúmeros compostos voláteis, extraídos de diferentes partes das plantas (flores, botões, sementes, cascas, frutos, raízes) (Proença da Cunha *et al.*, 2012). A literatura refere que, estes óleos podem apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas, além de características antimicrobianas (Svoboda *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011). Na área de embalagens alimentares, o recente desenvolvimento de conservantes alimentares naturais levou a um crescente interesse na aplicação de óleos essenciais antimicrobianos, além do uso destes em produtos em contato com os alimentos (Seow *et al.*, 2014). No entanto, o *design* e a produção de embalagens alimentares ativas utilizando óleos essenciais exigem estudos extensos sobre, por exemplo, a taxa de libertação de óleos essenciais da matriz de embalagem, tempo de morte microbiana, identificação de componentes ativos de óleo, entendimento de bacteriostáticos e/ou mecanismos bactericidas dos componentes e as concentrações necessárias com várias matrizes alimentares, limitando assim a literatura disponível sobre este assunto (Seow *et al.*, 2014; Atarés & Chiralt, 2016).

Proença da Cunha *et al.* (2012) apresentam uma composição bastante detalhada do óleo essencial de cravinho afirmando conter 80 a 85% de eugenol e 10 a 15% de acetato de eugenilo, entre outros compostos (Proença da Cunha *et al.*, 2012).

O óleo de cravinho ou cravo-da-índia é responsável pela ação antibacteriana, antifúngica, antiviral e estimulante de secreções gástricas (Cruz-Vega *et al.*, 2009). Na literatura são referidas as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de cravinho, e os resultados mostraram atividade inibitória para *Listeria monocytogenes*(+), *Campylobacter jejuni*(-), *Salmonella enteritidis*(-), *Bacillus cereus*(+), *Escherichia coli*(-) e *Staphylococcus aureus*(+) (Cruz-Vega *et al.*, 2009).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) mostra capacidade para inibir microrganismos, como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* bactérias Gram-positivas e *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* bactérias Gram-negativas (Devi *et al.*, 2010; Seow *et al.*, 2014;).

1.7.1. Os microorganismos ensaiados

Escherichia coli uma bactéria Gram negativa, na forma de bastonete e anaeróbia facultativa. Capaz de realizar fermentação ácida mista convertendo o ácido fórmico a H₂ e CO₂, fermenta a lactose e não requer citrato. Geralmente está presente em infecções alimentares apresentando como período de incubação de 3 a 5 dias com sintomas a variarem de vômitos moderados a diarreias frequentes, geralmente é contraída pela ingestão de alimentos mal cozinhados como carne e produtos não pasteurizados como sumos de fruta (Willey, Joanne M; Sherwood, 2006).

Salmonella Typhimurium uma bactéria Gram negativa na forma de bastonete. Capaz de realizar fermentação ácida mista com produção de lactato, acetato, succinato e etanol. É responsável por salmoneloses por ingestão de alimentos como carnes, carne de aves e ovos. Geralmente os sintomas são de origem aguda com estes a surgirem ao fim de 8 horas (Willey, Joanne M; Sherwood, 2006).

Staphylococcus aureus uma bactéria Gram positiva pertencente à família Staphylococcaceae apresenta uma morfologia em esferas formando agregados irregulares sem motilidade. Anaeróbios facultativos, geralmente apresentam catalase, oxidase negativa e fermentam glucose. É responsável por enterites relacionada com a síntese de toxinas, proteínas que são resistentes ao calor pelo que a eliminação por calor não torna os produtos seguros. Apresenta períodos curtos de incubação, cerca de 2 a 6 horas causando infecções agudas (Willey, Joanne M; Sherwood, 2006).

Listeria monocytogenes uma bactéria Gram positiva da família Listeriaceae, com morfologia de bastonete e presença de flagelo para motilidade. Aeróbia ou anaeróbia facultativa e apresenta catalase positiva. É um motivo de preocupação por exemplo nas patologias de origem alimentar (podendo ser encontrada em leite contaminado, queijos, vegetais e carnes) a listeriose, que pode provocar meningites, septicemias e em caso de gravidez a morte do feto (Willey, Joanne M; Sherwood, 2006).

1.7.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos filmes - Método da difusão em agar

O teste da difusão em agar é simples e de fácil aplicação, por isso, é usado como o primeiro passo de *screening* para avaliar as propriedades antimicrobianas dos filmes. Este método consiste na aplicação de um disco do filme, com incorporação do agente antimicrobiano, sobre uma placa de agar inoculada com o microrganismo a testar. Ao longo do tempo de incubação, o agente antibacteriano difunde-se do filme para o meio de cultura, inibindo ou eliminando o crescimento bacteriano. Forma-se um halo de inibição, área sem crescimento, cujo diâmetro é medido (Jorgensen & Ferraro, 2009).

1.8. Ensaios de Libertação

A libertação de aditivos por embalagens ativas aumenta a segurança do consumidor, já que esses compostos, ao invés de diretamente adicionados ao alimento, são libertados controladamente (Cozzolino *et al.*, 2013). Compreender o comportamento das moléculas com atividade antimicrobiana ou antioxidante no fenómeno de libertação das mesmas da matriz polimérica para o meio de libertação. Assim o objetivo de alcançar libertações controladas passa por conseguir incorporar agentes ativos na matriz polimérica, e a sua libertação para o meio externo, de modo a garantir as características do produto por períodos de tempo maiores (Buonocore *et al.*, 1998). Uma vez que a maioria da proliferação de microrganismos ocorre à superfície, a matriz tem de ser capaz de promover uma libertação ativa das moléculas migratórias quer por contacto direto ou por libertação de compostos voláteis (Guarda *et al.*, 2011). Contudo as interações promovidas entre a matriz e o composto presente nesta podem ditar o comportamento de libertação (Cozzolino *et al.*, 2013).

Existem essencialmente dois mecanismos que explicam o fenómeno de transferência de massa envolvidos no controlo da libertação de moléculas. Primeiramente e de fácil compreensão é o mecanismo de difusão que descreve a transferência de interna no polímero para o exterior. O mecanismo de difusão tende a predominar como mecanismo de transporte de massa ativo. Em condições ideais o mecanismo por difusão sobrepõe-se quando a solução se encontra em estados de homogeneização e agitação ideais, tornando secundário o efeito da resistência à transferência de massa. Este comportamento pode ser explicado pela segunda lei de Fick, uma vez que esta lei considera o coeficiente de difusão presente ou a difusividade, logo explicando o comportamento de migração das moléculas ao longo do material (Lavoine *et al.*, 2016). Existem várias estratégias para incorporação de compostos em matrizes, estratégias como as descritas por (Lavoine *et al.*, 2014) que descreve a possibilidade de incorporar as moléculas de interesse, quer por recurso a impregnação da matriz alvo em soluções de interesse (no caso referido por (Lavoine *et al.*, 2014), a cafeína), recorrendo a um balanço de massa para compreender quanto ficou adsorvido. Outra estratégia descrita por (Lavoine *et al.*, 2014) interessante é a possibilidade de promover uma dispersão homogénea entre a matriz do polímero e a molécula de interesse a capturar na mesma, promovendo essa dispersão com recurso a agitação constante, recorrendo a um balanço de massa para compreender quanto realmente se incorporou e quanto foi possível libertar (Lavoine *et al.*, 2014). Outra estratégia viável para realizar estudos de libertação é a possibilidade de encapsular as moléculas alvo e recorrer ao uso da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa para quantificar a eficiência no processo de encapsulação da molécula alvo. Conhecida a concentração existente é depois possível realizar ensaios de libertação e estudos cinéticos como os descritos por (Chen *et al.*, 2014) que promove uma libertação *in vitro* de eugenol em meio tampão fosfato como simulante de meio de libertação através de um sistema de diálise, com recolha de amostras ao longo do tempo, filtrando a solução e

posteriormente quantificando por recurso novamente a HPLC a massa acumulada de eugenol libertada ao longo do tempo.

No trabalho realizado por (Lavoine *et al.*, 2014) duas estratégias de libertação e quantificação de compostos incorporados em matrizes são descritas, ambas baseadas na análise com recurso a um espectrofotómetro de UV/visível. A primeira envolve ensaios de difusão contínua, agitação, colocando os filmes na superfície do meio de libertação, recolhendo ao longo de intervalos de tempo conhecidos as amostras, lidas posteriormente no espectrofotómetro. A segunda é similar a anterior, mas com libertação em descontínuo, recorrendo a uma renovação do meio ao fim de um determinado tempo (Lavoine *et al.*, 2014).

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1. Produção das nanoceluloses

Neste trabalho foram usadas duas pastas comerciais, uma pasta kraft (processo de cozimento alcalino) de *Eucalyptus globulus* branqueada e uma outra da mesma espécie, branqueada, mas obtida pelo processo ao sulfito (processo de cozimento ácido). Para ambas foi determinado o teor de matéria seca (TMS) de acordo com a norma ISO 638-1978. As pastas comerciais usadas como fonte de fibras de celulose, foram caracterizadas inicialmente em termos de viscosidade intrínseca e teor em grupos carboxílicos.

2.1.1. Processo de oxidação das pastas mediada por TEMPO

O tratamento químico das pastas foi realizado tendo em conta uma adaptação ao procedimento referido por (Saito *et al.*, 2007). Tratando-se de pastas “secas” foi necessário colocá-las em suspensão, usando o procedimento referido na norma de desintegração de pastas, ISO 5263. Esta operação quebra as ligações interfibras (de pasta ou papel), em meio líquido, usando energia mecânica. A razão sólido/líquido pretendida neste método é de 1:100, pelo que, a suspensão de fibras de celulose provenientes do desintegrador (30 g de pasta em dois litros de água), foi colocada num vaso reacional (5L), corrigindo-se a proporção. A cada uma das amostras de suspensão foi adicionado o reagente TEMPO (0,5 g, 0,1 mmol) e brometo de sódio (3 g, 1 mmol), deixando-se durante uns minutos em agitação (500 rpm). A solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 13% foi ajustada para pH 10 pela adição de ácido clorídrico a 0,1 M. A oxidação mediada por TEMPO iniciou-se adicionando a quantidade da solução de NaClO (1,3 -5,0 mmol NaClO por grama de celulose), sempre com agitação e à temperatura ambiente. Durante todo o processo de adições sucessivas, o pH foi controlado com a adição de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5 M para manter o pH 10, usando um medidor de pH, até não se observar consumo de NaOH. A celulose oxidada foi lavada várias vezes por filtração, através de um funil de placa porosa nº2, até pH neutro. Na figura 2.1 apresenta-se a celulose oxidada depois das lavagens.

As pastas ao sulfito e ao sulfato foram oxidadas numa escala temporal distinta, em particular as duas pastas kraft, cujos tratamentos de oxidação/ adição de hipoclorito de sódio foram efetuados com este reagente logo que foi aberto e depois de alguns dias de abertura.



Figura 2.1: Celulose oxidada depois das várias lavagens até pH neutro.

As amostras foram guardadas em refrigeração (4°C) não antes de se determinar para cada uma o TMS, para posteriores ensaios de caracterização desta celulose oxidada, como o teor em grupos carboxílicos e a viscosidade intrínseca.

2.1.1.1. Caracterização do material celulósico obtido antes e depois da oxidação por TEMPO

Na caracterização das pastas comerciais e nas pastas oxidadas por TEMPO foram usados os métodos descritos nos itens que se seguem.

2.1.1.1.1. Teor em grupos carboxílicos

O teor em grupos carboxílicos é determinado por titulação condutimétrica seguindo a norma SCAN-CM 65:02. Para a realização deste ensaio usou-se um titulador automático Dosimat 665 da Metrohm. Para ocorrer a protonação da amostra, isto é, converter os grupos carboxilatos de sódio (-COONa) a grupos carboxílicos livres (-COOH), as suspensões fibrosas com uma consistência de 0,1% foram tratadas com HCl a 0,1mol/L, durante duas horas, com agitação constante de 100 rpm, e temperatura ambiente. Após protonação da pasta, filtrou-se a suspensão através de um funil de Büchner, promovendo várias lavagens do filtrado com água destilada até se obter uma condutividade medida no filtrado abaixo de 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Estando a pasta protonada, pode proceder-se para a titulação condutimétrica. Foi necessário ainda, validar a concentração exata de NaOH (C1) através da adição de 485 mL de água destilada, 10 mL de NaCl a 0,05 mol/L e 5 mL de HCl a 0,010 mol/L. Procedeu-se à titulação com hidróxido de sódio a 0,05 mol/L, fez-se a representação gráfica em forma de V e retirou-se o valor de C1. O ensaio foi feito em duplicado.

Para a titulação da amostra de pasta pesou-se 1g de pasta seca e adicionou-se 490 mL de H₂O destilada e 10 mL de NaCl a 0,05 mol/L, para obter uma concentração de 1mM de NaCl

durante a titulação. Com o auxílio de um titulador automático representado na figura 2.2 fizeram-se adições *step-by-step* de 0,1 mL de NaOH a 0,05 mol/L, registrando a condutividade da pasta até se atingir um valor de pH de 10,5 altura onde termina a titulação. Após titulada a pasta, é necessário proceder a uma filtração da pasta em funil de Büchner lavando a pasta com 100 mL de H₂O destilada, transferiu-se o conteúdo para uma caixa de petri e pesou-se o conteúdo antes de seco. Deixou-se na estufa durante 24h a 105°C, após este período transferiu-se a caixa com a pasta seca para um exsicador durante algum tempo para estabilizar a temperatura, pesou-se e procedeu-se ao cálculo do teor em grupos carboxílicos (X em µmol/g), através da seguinte equação:

$$X = (C_1 \cdot V_2) / m \quad (1)$$

Onde: C₁ é a concentração de NaOH, em µmol/L; V₂ o volume de NaOH consumido na titulação, em litros (L), até atingir o segundo ponto de inflexão na titulação; m, a massa obtida após secagem.



Figura 2.2: Montagem dos vários acessórios para a titulação condutimétrica, o titulador automático, o condutivímetro e o sensor de pH.

2.1.1.1.2. Viscosidade intrínseca e grau de polimerização

A determinação da viscosidade da pasta foi realizada de acordo com a norma ISO 5351:2010, como ligeira alteração, usou-se 50 mg de pasta absolutamente seca. Assim resumidamente, procedeu-se a uma preparação da amostra de pasta, foi calculada a massa necessária tendo em conta o TMS da pasta. Colocou-se essa massa no frasco de reação, perfez-se o volume até 25 mL (pasta + H₂O destilada), colocou-se pedaços de cobre e reguladores de ebulição no frasco e levou-se a agitar durante 15 minutos em placa de agitação para promover uma melhor homogeneização e dispersão da pasta. De seguida adicionou-se 25 mL de cuproetilenodiamina (CED) a cada frasco. Foi ainda preparado um frasco controlo com apenas 25 mL de H₂O e 25 mL de CED com pedaços de cobre e reguladores de ebulição. Cada frasco

foi preparado em triplicado. Deixou-se reagir com a CED, em agitação durante uma hora. Preparou-se um banho com água destilada a 25°C para manter a temperatura constante dentro do viscosímetro de 2 mL de acordo com a figura 2.3. Após a reação, fez-se passar o frasco com a solução de controlo para verificar e calibrar o viscosímetro. Após calibração foi realizado o ensaio para cada amostra, retirando-se os tempos de escoamento e calculou-se a viscosidade da pasta, $\eta_{\text{rácio}}$.

$$\eta_{\text{rácio}} = \eta / \eta_0 \quad (2)$$

onde: η é o tempo de escoamento da amostra em segundos (s); η_0 o tempo de escoamento do ensaio em branco (s).

Conhecido o valor de η , com recurso a tabelas que relacionam η com $\eta_{\text{rácio}}$ (η/η_0) obtém-se $[\eta].\rho$ que é um valor tabelado em anexo na tabela da norma da viscosidade ISO 5351:2010. Por fim, obtém-se a viscosidade intrínseca $[\eta]$ em (ml/g) através da seguinte equação 3:

$$[\eta] = [\eta].\rho / [\text{amostra}] \quad (3)$$



Figura 2.3: Ilustração da toma da amostra de CED para medir a viscosidade, com o viscosímetro.

O grau de polimerização (GP), foi calculado segundo a equação (4) descrita por Smith *et al.*, (1963).

$$[\eta] = 0,57 \times GP \quad (4)$$

2.1.2. Tratamento mecânico

As amostras de pastas oxidadas passaram num homogeneizador de alta pressão GEA Panther NS 3006L como representado na figura 2.4.



Figura 2.4: Homogeneizador de alta pressão GEA Panther NS 3006L.

O tratamento mecânico foi realizado nas seguintes condições operacionais para cada pasta. A pasta ao sulfito oxidada por TEMPO sofreu duas passagens no homogeneizador de alta pressão com uma primeira passagem a 500 bar e uma segunda passagem a 900 bar, adiante designada por NF. As pastas ao sulfato oxidadas, com teor em grupos carboxílicos diferentes, sofreram três passagens no homogeneizador, com a primeira passagem a ocorrer a 500 bar, a segunda e terceira passagens a 1000 bar, adiante designadas por AK1 e AK2. As passagens no homogeneizador foram realizadas à temperatura ambiente com uma consistência da amostra de 1,5%. Durante este tratamento, é normal que, após várias passagens, a temperatura do fluido aumente para 60-70°C. Quando isso acontece, o funcionamento do homogeneizador é interrompido para evitar a cavitação da bomba e o processo continuou após o arrefecimento do fluido e do equipamento à temperatura ambiente. As nanoceluloses resultantes foram caracterizadas para algumas propriedades, como o rendimento em celulose nanofibrilada, potencial zeta, viscosidade intrínseca e propriedades reológicas das suspensões (propriedades descritas em 2.3)

2.2. Caracterização suspensões de nanoceluloses

2.2.1. Rendimento em celulose nanofibrilada

Seguindo o protocolo de (Khiari, 2017) que foi realizado da seguinte forma: uma suspensão diluída de 0,2 % de teor de sólidos (Sc) foi centrifugada a 4000 rpm durante 30 min para separar o material nanofibrilado (na fração sobrenadante) do material não fibrilado ou parcialmente fibrilados que se sedimentam. Removeu-se o sobrenadante, e a fração sedimentada foi seca a 105°C, até um peso constante. O rendimento (Y%) foi calculado pela equação:

$$Y \% = (1 - \text{massa seca do sedimento} / \text{massa amostra diluída} \times \%Sc) \times 100 \quad (5)$$

Os resultados representaram os valores médios de três repetições.

2.2.2. Potencial zeta

Para a determinação do potencial zeta prepararam-se suspensões de nanocelulose a 0,1% de teor de sólidos e deixou-se em agitação mecânica durante alguns minutos para promover uma boa dispersão. As suspensões foram lidas no equipamento Mütek PCD 02, capaz de medir a carga de superfície das partículas em suspensão de nanocelulose.



Figura 2.5: Equipamento de medição do potencial zeta das suspensões de nanocelulose

2.2.3. Ensaios de reologia

Para a realização dos ensaios de reologia, partiu-se de uma adaptação de (Moberg *et al.*, 2017). Um reômetro rotacional (Rheostress Rs 150 da Hakke) foi usado para analisar as propriedades de escoamento de uma suspensão de 0,1% nanocelulose/água depois de contínua agitação. Da dispersão retirou-se 3 mililitros para um prato com uma geometria rugosa Gr 240 μm , um sensor de placa C35, com um ângulo de cone de 2° e um diâmetro de 65 mm. As leituras foram realizadas a 23°C durante 3 minutos. A viscosidade foi medida entre as gamas de velocidade de corte de 0,0301 a 1000 s^{-1} , recolhendo 30 pontos experimentais. Para os ensaios oscilatórios partiu-se de com uma tensão de cisalhamento 0,0713 Pa, com incrementos constantes até atingir 10000 Pa, recolhendo também 30 pontos experimentais. A tensão de varrimento ocorreu a 1 Hz. O módulo de armazenamento G' e o módulo de perda G'' foram medidos como função da amplitude da tensão de cisalhamento. Para cada amostra os ensaios foram repetidos três vezes.



Figura 2.6: Reômetro Rheostress Rs 150 da Hakke com prato rugoso.

2.3. Produção de filmes de nanocelulose

Os filmes foram produzidos pelo método de secagem por evaporação de solvente, com uma gramagem teórica de 40 g/m² capaz de dar uma boa consistência ao filme. Para tal, calculou-se a área das caixas de petri e conhecendo a gramagem teórica foi possível calcular a massa de nanocelulose seca necessária para fazer um filme. Para cada filme foi incorporando 37% (m/m) de glicerol, agente plastificante e 10% do óleo essencial de cravinho (CLO) e a mesma percentagem de eugenol (EU). Todas as amostras foram sujeitas a uma agitação constante de 750 rpm, durante 3 horas. No final deste tempo, para remover e melhorar a dispersão as amostras foram submetidas a ultrassons (*Vibracell* da *Sonics Materials*) fazendo dois ciclos de 20 segundos cada. As amostras foram transferidas para caixas de Petri devidamente identificadas, colocadas numa estufa com ventilação forçada a 30 °C, para um período de secagem que pode variar entre 24 h a 36 h. Antes da realização dos ensaios de caracterização foram colocados em ambiente condicionado de 21°C e 51% de humidade relativa, durante 24 horas.

2.3.1 Análise FTIR dos filmes produzidos

Para confirmação da presença dos compostos supracitados nos filmes foram realizados espectros de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) (Piletti *et al.*, 2017). As amostras dos filmes com e sem óleos essenciais foram colocados no espectrofotómetro *Thermo Scientific Nicolet iS10 Fourier Spectrometer*. A análise espectral foi realizada com resolução de 4 cm⁻¹, numa região compreendida entre 600-4000 cm⁻¹, tendo sido feitos 128 scans.

2.3.2. Análise morfológica dos filmes produzidos por SEM

A análise microestrutural dos filmes de nanocelulose com e sem compostos bioativos, foi estudada usando o microscópio eletrónico de varrimento VP Hitachi S-3400N. Os filmes foram cortados em pedaços e crio-fraturados com nitrogénio líquido. De seguida foi realizado um corte com auxílio de um movimento brusco do filme contra a superfície transversal da bancada para provocar uma rutura pelo ponto mais fragilizado. O lado por onde ocorreu a rutura (secção transversal) foi colocado em cola de carbono, coberto com ouro e foram posteriormente adquiridas as imagens da estrutura interna dos filmes com e sem agentes antimicrobianos.

2.4. Avaliação das propriedades físicas dos filmes produzidos

Os filmes foram caracterizados em termos das suas propriedades estruturais, mecânicas e de barreira (velocidade de transmissão de vapor de água).

2.4.1. Determinação das propriedades estruturais

A gramagem dos filmes foi determinada de acordo com a norma ISO 536:1995, pesando os filmes numa balança de precisão. Esta é calculada com base na massa dos filmes e a área dos mesmos. A espessura foi medida com base na norma ISO 534:2011, no micrómetro de precisão Mi20 da *Adamel Lhomargy* representado na figura 2.7, onde para cada filme, realizaram-se 5 medições de espessura em pontos diferentes do filme com o intuito de conseguir uma espessura média capaz de traduzir a dispersão e consistência global do filme. A densidade ou massa volúmica dos filmes foi calculada com base na gramagem média e na espessura média de cada filme.



Figura 2.7: Micrómetro para medir a espessura dos filmes.

2.4.2. Determinação das propriedades mecânicas

A resistência à tração, alongamento e módulo de Young dos filmes foram determinadas segundo a norma ISO 1924/1:1992, usando o equipamento Thwing-Albert Instruments Co., modelo EJA, representado na figura 2.8. Algumas alterações foram necessárias, nomeadamente, a distância inicial entre as garras de 4 cm e uma velocidade de 5 mm/min. Os filmes foram cortados com dimensões de 7 cm x 1,5 cm. Cada valor representa a média de 4 medições para cada filme. Os ensaios foram feitos em ambiente condicionado.



Figura 2.8: Ilustração de um ensaio de mecânico com uma tira de filme de nanocelulose a ser testada.

2.4.3. Determinação da propriedade barreira

A velocidade de transmissão de vapor de água (WVTR) foi medida com base na norma ASTM E96-1995. Nas caixas foi colocado o meio absorvente, o cloreto de cálcio anidro (CaCl_2) (0% de umidade relativa no interior das caixas). De seguida foi colocado o filme sobre a caixa e esta foi selada aparafusando a parte superior destas caixas, de acordo com a figura 2.9. As condições de ensaio foram umidade relativa (HR) de 51% e temperatura controlada de 21 °C. Montado o sistema, as caixas foram inicialmente pesadas e a sua massa registada, uma vez que o CaCl_2 absorve água devido às suas propriedades higroscópicas permite criar um gradiente de absorção de água através do filme. As caixas foram pesadas em base horária durante 9 h. O WVTR foi calculado a partir do declive da zona linear do gráfico do aumento da massa em relação ao tempo, dividido pela área exposta do filme. Os ensaios foram realizados em triplicado para cada amostra.



Figura 2.9: Caixas para medir a transferência de vapor de água (WVTR) nos filmes de nanocelulose.

2.5. Atividade sequestradora do radical DPPH

A atividade sequestradora do radical DPPH (2-2-difenil-1-picrihidrazila) foi determinada de acordo com o método de Byun *et al.* (2010). Assim, pesou-se 0,1 g de cada filme de nanocelulose com e sem os compostos bioativos, colocou-se em tubos de ensaio e adicionou-se 2 mL metanol. A mistura foi levada ao agitador vortex e agitada vigorosamente durante 3 minutos para cada tubo, de seguida, deixou-se repousar durante 3 horas. Levou-se novamente ao vortex durante 3 minutos cada tubo, seguida de centrifugação a 2300 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante obtido foi analisado em termos da sua capacidade sequestradora do radical DPPH. Uma alíquota do extrato em metanol (500 µL) foi misturada com 2 mL de solução de DPPH a 0,06 mM em metanol, para tubos de ensaio. Levou-se ao vórtex novamente durante 1 minuto e deixou-se a repousar durante 30 minutos no escuro. As absorvâncias foram medidas a 517 nm usando o espectrofotómetro (Thermo scientific, modelo Helios Omega UV-Vis). Uma mistura de metanol com DPPH a 0,12 mM foi usado como controlo. A atividade sequestradora do radical DPPH foi calculada como se segue:

$$\text{Atividade sequestradora do radical (\%)} = (1 - A_{\text{amostra}} / A_{\text{controlo}}) \times 100 \quad (6)$$

Onde: A_{amostra} é a absorvância da amostra e A_{controlo} é a absorvância do controlo. Os valores apresentados são a média de três ensaios.

2.6. Ensaios de libertação em meio aquoso e em meio de etanol

Procedeu-se á elaboração de duas curvas de calibração partindo de uma solução padrão de concentração inicial 0,4 mg/mL e dilui-se para 5 concentrações numa gama de 0,01 mg/mL até 0,05 mg/mL tanto para o óleo essencial de cravinho, como para o eugenol, no comprimento de onda de absorção dos compostos a 279 nm quando o meio de libertação é água e a 282 nm para o caso do etanol.

Os agentes antimicrobianos foram incorporados na matriz nanocelulose/glicerol nas proporções referidas no ponto 2.4. Procedeu-se ao ensaio de libertação adaptando o protocolo de Lavoine *et al.* (2014) resumidamente: colocaram-se os filmes num vaso reacional com 500 mL em água ou em etanol, com agitação mecânica de 100 rpm. Foram recolhidas alíquotas de 4 mL e medida a absorvância no tempo inicial e a cada 60 min, até um total de 10h. Não foi executada reposição de volume nestes ensaios. A concentração no instante de cada composto libertada foi quantificada no espectrofotómetro para o comprimento de onda adequado em função do meio libertação. De seguida apresentam-se na tabela 2.1 as equações das curvas de calibração para os diferentes compostos.

Tabela 2.1: Equações obtidas das curvas de calibração e respectivos R-quadrado em diferentes solventes para CLO e EU.

Meio/Composto	CLO	R ²	EU	R ²
Meio aquoso (282 nm)	$y = 20,254x$	0,9986	$y = 14,117x$	0,9906
Meio etanol (279 nm)	$y = 15,88x$	0,9995	$y = 17,425x$	0,9933

A concentração do composto ao longo do tempo foi quantificada tendo em conta o volume inicial e a concentração obtida pela curva de calibração para a correspondente absorvância.

2.7. Avaliação da atividade antibacteriana

2.7.1. Microorganismos

Neste estudo foram usadas quatro estirpes de microrganismos conservadas a -80°C em meio Brain Heart Infusion (BHI) com 20% (v/v) glicerol. As estirpes de microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Listeria monocytogenes* LMG 13305. Foi inicialmente feita uma repicagem destas estirpes para o meio BHI com 20 g/L de agar, para que estas se pudessem adaptar devido ao seu estado de criopreservação. Foram levadas a incubar em estufa a 37°C para posterior utilização e realização do ensaio. Adaptadas as culturas de microrganismos o estudo foi feito de acordo com a norma M2-A8 descritas pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003).

2.7.2. Teste da difusão em agar

Este método foi usado quer para validar a ação antibacteriana dos agentes antimicrobianos *per se*, quer para os filmes preparados com os estes agentes e para filmes com estes agentes antimicrobianos com a introdução de Tween 80, um surfactante, que poderá desempenhar a função de abertura da matriz nanocelulósica.

2.7.3. Agentes antimicrobianos

A avaliação da atividade antibacteriana dos agentes antimicrobianos (AG), i.e., o óleo essencial de cravinho, uma mistura complexa de compostos, o eugenol e o ácido p-cumárico, foi realizada de acordo com a norma M2-A8 descritas pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2003). Os discos de celulose, com diâmetro de 60 mm, foram impregnados com 15 μL de cada um dos AG tal e qual, com exceção do ácido p-cumárico que teve de ser preparado com uma concentração de 130 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Preparou-se o inóculo fazendo uma suspensão direta, em solução salina estéril (NaCl 0,85% m/v), de colónias isoladas selecionadas numa placa de agar. Esta suspensão foi ajustada para uma

turbidez de 0,5 McFarland que corresponde a cerca de $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC). Para a inoculação das placas de teste, mergulhou-se uma zaragatoa estéril na suspensão microbiana. As superfícies placas de Petri contendo o meio Müller-Hinton Agar (MHA) foi inoculada esfregando a zaragatoa em toda a superfície, girando a placa cerca de 60° promovendo um espalhamento triplo de 60° em 60° de cada vez que se aplica o inóculo e passagem pela parede da caixa de Petri na extremidade. Os discos impregnados com os AG foram colocados na superfície das placas de agar inoculadas e distribuídos de forma uniforme. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa a 37°C , durante 18 horas. Após este tempo, considera-se como inibição a área sem crescimento. Os halos foram medidos em milímetros utilizando um paquímetro e os ensaios foram realizados em triplicados independentes.

2.7.4. Filmes incorporados com os AG e com Tween 80.

A avaliação da atividade antibacteriana dos filmes (incorporados com 10 % de massa de compostos CLO e EU) foi efetuada de forma similar ao referido anteriormente. Os filmes foram cortados com uma dimensão de 10 mm de diâmetro com a peça de corte em T, em condições de assepsia. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Em função dos resultados obtidos nos filmes incorporados com AG, foram realizados os mesmos procedimentos, mas variando a concentração dos AG nos filmes com ainda a adição de Tween 80, um agente surfactante. Os filmes foram preparados com duas concentrações diferentes, 5 e 10 vezes superiores às utilizadas originalmente.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

Antes de analisarmos as características da nanocelulose e o processo de obtenção foi importante caracterizarmos as amostras de pasta comercial e as amostras de pasta depois de tratadas com o reagente TEMPO.

3.1. Processo de oxidação das pastas por TEMPO

Analisando os resultados apresentados na tabela 3.1 pode observar-se que a pasta comercial branqueada proveniente de um processo de cozimento ácido e de um cozimento alcalino apresenta propriedades distintas. A presença de grupos carboxílicos na pasta de celulose tem sido relatada como um parâmetro de grande importância para avaliar a qualidade da celulose e assume especial relevância no processo de separação das nanofibrilas. Por outro lado, a viscosidade intrínseca de uma pasta está relacionada com a degradação dos polissacáridos e de forma direta com o seu grau de polimerização. Assim, a pasta ao sulfito comercial (NF) é uma pasta que apresenta valores muito mais baixos face à pasta ao sulfato comercial (AK). Ambas as pastas foram sujeitas ao tratamento químico mediado por TEMPO, contudo, as pastas ao sulfato foram oxidadas usando hipoclorito de sódio logo depois de aberto o frasco e depois de algumas semanas. Assim, o facto de se ter esperado em termos de tratamento de oxidação, achamos que parte do ião hipoclorito possa ter perdido alguma da sua capacidade oxidativa, daí neste trabalho termos dois tipos de pastas kraft oxidadas, denominadas AK1 e AK2.

Tabela 3.1: Resultados da caracterização das pastas antes e depois da oxidação com o reagente TEMPO

Tipos	Pasta comercial		Pasta oxidada por TEMPO	
	Teor em grupos carboxílicos ($\mu\text{mol/g}$)	Viscosidade intrínseca (cm^3/g)	Teor em grupos carboxílicos ($\mu\text{mol/g}$)	Viscosidade intrínseca (cm^3/g)
NF	41	559	1757	85
AK1	131	820	1621	162
AK2			1282	257

Após o pré-tratamento químico usando o sistema TEMPO/NaBr/NaClO obtiveram-se pastas bastante oxidadas, no caso da pasta sulfito um valor de 1757 $\mu\text{mol/g}$ de grupos carboxílicos. Já as pastas sulfato, AK1 e AK2 obtiveram respetivamente 1621 $\mu\text{mol/g}$ e 1282 $\mu\text{mol/g}$ de grupos carboxílicos. Isogai *et al.* (2011) no seu trabalho apresenta valores para a CNF em grupos carboxílicos até 1700 $\mu\text{mol/g}$. Relativamente à viscosidade intrínseca destas pastas verifica-se que este parâmetro diminuiu numa gama que vai desde 69 % para a AK2 a 85 % para a NF. Estas tendências corroboram com o grau de polimerização obtido, ou seja, o grau de polimerização calculado demonstra que existe uma clara diminuição deste, particularmente observado entre a pasta inicial e após o tratamento químico aplicado, diminuindo o GP de 981 para 149 para o caso das pastas sulfito. Para o caso das pastas

sulfato, partiu-se de um GP de 1439 para 258 para a pasta oxidada AK1 e para 451 para a pasta oxidada AK2. Após o tratamento mecânico ocorre ainda uma redução deste parâmetro diminuindo para um GP de 122 para a nanocelulose NF, e para 175 e 213 para AK1 e AK2 (ver Tabela 3.2). González *et al.* (2017) demonstram que existe uma redução do GP de 1000 em pastas iniciais para 170 depois de sujeitas ao tratamento químico, podendo este valor ser ainda ligeiramente afetado pelo tratamento mecânico. Estes autores descrevem ainda os efeitos indiretos do GP no resultado dos filmes, descrevendo que quanto mais baixos os GP, resultam em filmes mais frágeis e por consequência com piores propriedades mecânicas (González *et al.*, 2017).

3.2. Propriedades das suspensões de CNF

Para ilustrar o tipo de géis de nanocelulose que foram produzidos mostra-se a figura 3.1 que contém as três amostras.

3.2.1. Efeito do tratamento mecânico - obtenção de géis de nanocelulose

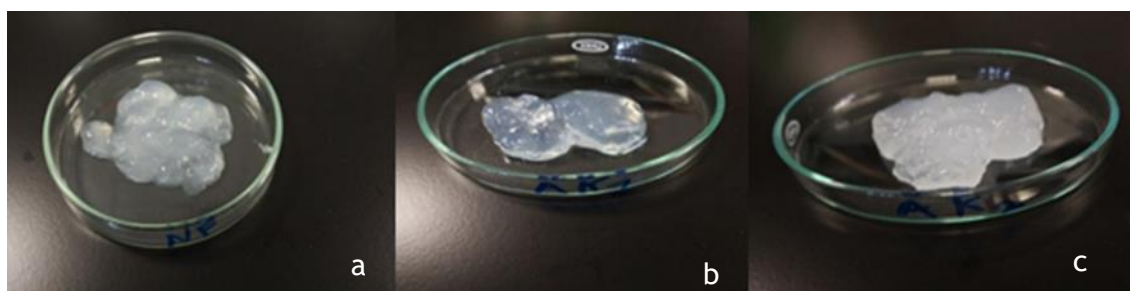


Figura 3.1: Géis de nanocelulose: a) pasta sulfito (NF); b) e c) pasta ao sulfato AK1 e AK2, respetivamente.

Após os tratamentos acima citados, que englobam a produção de nanocelulose, é fundamental realizar a sua caracterização, mediram-se algumas propriedades, tais como, o rendimento em fibrilação, a viscosidade intrínseca, o potencial zeta, que se apresentam na Tabela 3.2 e as propriedades reológicas das suspensões de CNF.

Tabela 3.2: Resultados obtidos para o rendimento de fibrilação, viscosidade intrínseca e potencial zeta (pH= 6) das suspensões.

Suspensões	Rendimento de fibrilação (%) Média ± desvio padrão	Viscosidade intrínseca (cm ³ /g) Média ± desvio padrão	Potencial zeta (mV)
NF	88 ± 0,76	70 ± 5,79	-1721
AK1	96 ± 1,80	100 ± 8,36	-1638
AK2	90 ± 1,87	122 ± 11,25	-1271

Analisando a tabela 3.2 pode ver-se que a pasta com maior percentagem de fibrilação é a AK1 com 96%, seguida da AK2 com 90% e a NF com 88%. Ainda que os valores pareçam similares, na verdade os filmes resultantes destas nanoceluloses exibem características diferentes, como se mostrará mais adiante. Estes valores de percentagem de fibrilação podem estar relacionados com a concentração de NaClO, tal como descrito por Bettaieb *et al.* (2015), quanto maior a concentração usada de NaClO maior a fibrilação obtida. Estes autores referem também o efeito da oxidação por TEMPO e o conseqüente impacto nos grupos carboxílicos presentes, promove uma formação de ligações mais compactas entre as fibrilas e um aumento na área de superfície através de ligações entre fibrilas, resultado observado indiretamente quanto maior o grau de fibrilação obtido (Bettaieb *et al.*, 2015). A viscosidade apresentada nesta tabela reflete o tratamento mecânico que levou à produção de géis de nanocelulose com inferiores viscosidades e respetivos graus de polimerização. Devido ao tratamento químico e mecânico, os géis de nanocelulose apresentam uma viscosidade de 70 cm³/g para NF, 100 cm³/g para AK1 e 122 cm³/g para AK2, resultando na diminuição da viscosidade das nanoceluloses, visto o tratamento mecânico promover ainda que em menor percentagem, uma destruição das microfibrilas presentes tornando-as ainda mais pequenas.

Os valores do potencial zeta das amostras são todos negativos devido à presença de iões carboxilatos (COO-) na superfície das nanofibrilas geradas durante o tratamento químico TEMPO/NaBr/NaClO (Gamelas *et al.*, 2015). Os valores do potencial zeta representados demonstram um estado de oxidação elevado das pastas de nanocelulose. Para ser possível comparar os resultados, o pH de cada uma das suspensões foi acertado com HCl a 0,1M até atingir um pH de 6. Comparando com outros resultados na literatura, torna-se difícil encontrar outras referências, contudo algumas noções podem ser retiradas de Beheshti-Tabar *et al.* (2017) que consegue relacionar a carga presente nos grupos carboxílicos e o efeito do pH na influência do valor do potencial zeta, estudando a variação dos grupos carboxílicos em função da variação de pH. Estes autores demonstram a sua relação e descrevem potenciais zeta para nanocelulose cristalina de -65 mV com grupos carboxílicos de 687 µmol/g. Ainda que as diferenças sejam significativas com potenciais mais positivos, as condições de produção da nanocelulose por este autor foram conduzidas a um pH = 3, influenciando significativamente o potencial zeta medido, tornando-o muito mais positivo do que o medido nos ensaios aqui apresentados (Beheshti-Tabar *et al.*, 2017). Assim o potencial zeta pode ser uma ferramenta capaz de prever e descrever o comportamento coloidal das suspensões de nanocelulose, levando a inferir no impacto final no comportamento reológico.

3.2.2. Reologia das suspensões de nanocelulose

Os resultados obtidos na análise reológica das nanoceluloses encontram-se representados nas figuras 3.2 até 3.3 para ensaios contínuos e nas figuras 3.4 até 3.6 para ensaios oscilatórios.

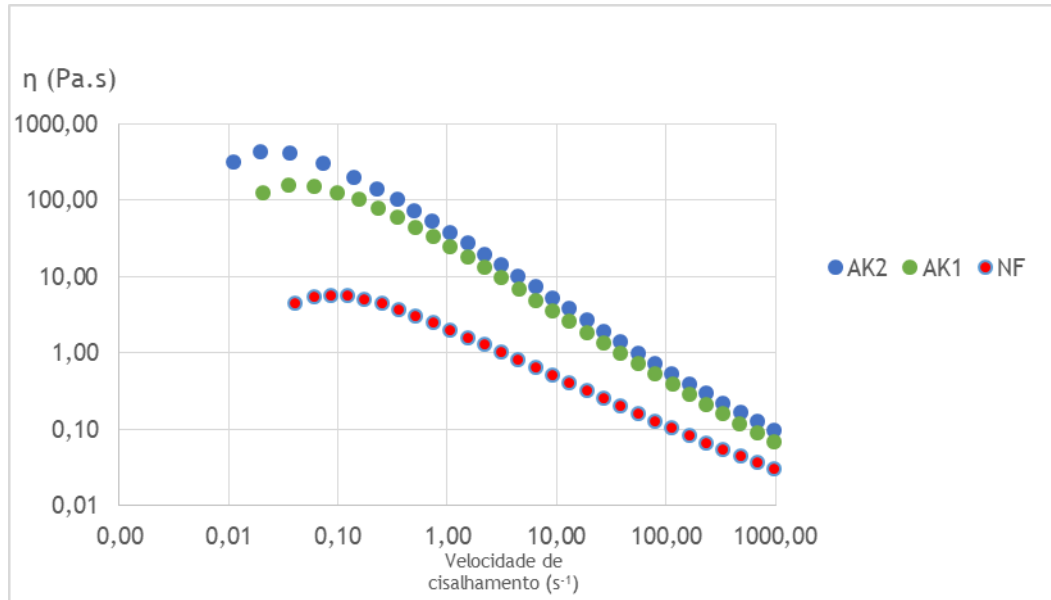


Figura 3.2: Viscosidade dinâmica em função da velocidade de cisalhamento para todas as amostras de nanocelulose.

A figura 3.2 mostra que a AK2 apresenta um maior valor de viscosidade dinâmica, que reflete o mesmo comportamento quando dos valores para a viscosidade intrínseca. Estes resultados são referentes à viscosidade dinâmica, estão de acordo com os apresentados na literatura. Moberg *et al.*, (2017) para uma suspensão de nanocelulose a 1%, apresenta resultados semelhantes, ou seja, valores a variar entre 103 a 104 MPa.s para nanoceluloses produzidas com recurso a oxidação mediada por TEMPO.

Nechyporchuk *et al.*, (2016) descrevem um comportamento tixotrópico das nanoceluloses, ou seja, uma clara diminuição da viscosidade em função do incremento da velocidade de corte (*shear rate*). Encontra-se também descrito na literatura por Sun *et al.*, (2018) a influência da viscosidade no processo de formação dos filmes, com a presença de suspensões muito viscosas, existe uma maior dificuldade na remoção de bolhas de ar das suspensões que levam a inconsistências na qualidade do filme e perda de propriedades mecânicas e óticas.

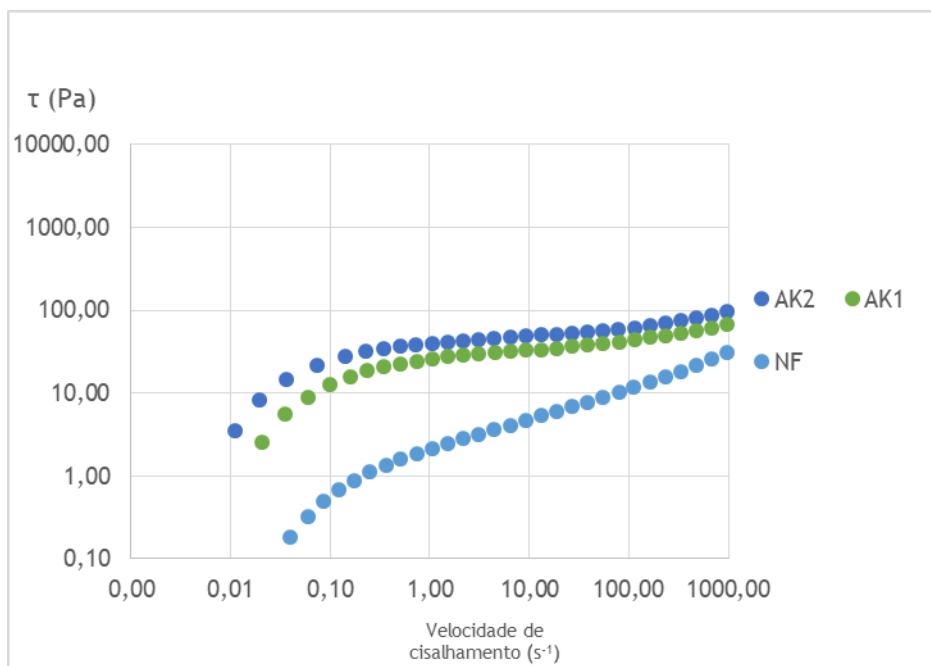


Figura 3.3: Tensão de corte em função da velocidade de cisalhamento para as amostras de nanocelulose.

Na figura 3.3 pode observar-se o comportamento como fluido das CNF, quando sujeitas a incrementos das velocidades de corte, podendo observar-se um comportamento não Newtoniano para as nanocelulose. As duas nanoceluloses AK1 e AK2 mostram um comportamento muito idêntico refletindo o fato de ambas terem origem semelhante. Já a NF apresentam um comportamento diferente das restantes nanoceluloses, requerendo maiores velocidades de corte para atingir tensões de corte superiores. Este comportamento pode ser atribuído a uma estrutura e enovelamento entre fibras superior, com maiores áreas de contacto, resultados que aparentam ir ao encontro dos demonstrados pelos grupos carboxílicos elevados que se traduzem em maiores áreas de contacto.

3.2.3. Resultados dos ensaios oscilatórios

Os comportamentos dinâmicos nas suspensões de nanocelulose são estudados nos pontos que se seguem. De modo geral não se observam diferenças significativas entre as nanoceluloses, contudo existem diferenças entre o módulo de perda, G'' que representa o módulo elástico também chamado de rigidez dinâmica, representado a reversibilidade energética armazenada pelo sistema. O outro parâmetro dinâmico importante é o módulo de armazenamento, G' da viscosidade que representa a perda de energia irreversível (Sun *et al.*, 2018). Uma análise mais detalhada em cada nanocelulose é apresentada da figura 3.4 à figura 3.6.

3.2.3.1. Resultados dos ensaios oscilatório das suspensões de NF

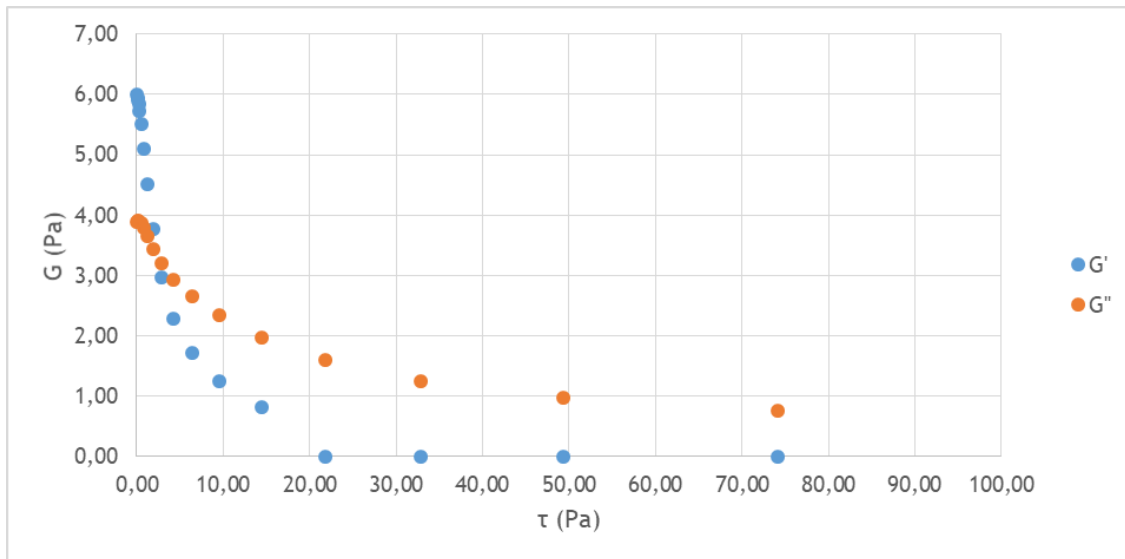


Figura 3.4: Módulo de perda G' e módulo de armazenamento G'' para NF em ensaios oscilatórios.

A figura anterior representa o comportamento da nanocelulose sulfito (NF) em função do seu comportamento oscilatório. De notar que se observar um módulo G' superior a G'' numa fase inicial indica claramente um comportamento do tipo gel, ainda que inicialmente, tal pode ser explicado pelo facto de se encontrar diluída numa suspensão aquosa o gel de NF. Contudo a um determinado ponto existiu uma clara rotura da estrutura interconectada entre as fibras formada pela sua estrutura elástica de acordo com Moberg *et al.*, (2017). Também é a única CNF que apresenta um valor mais baixo em função de G' por G'' , podendo inferir que é a que mais depressa exhibe um comportamento aquoso quando sujeita a *stress* induzido.

3.2.3.2. Resultados dos ensaios oscilatório das suspensões de AK1

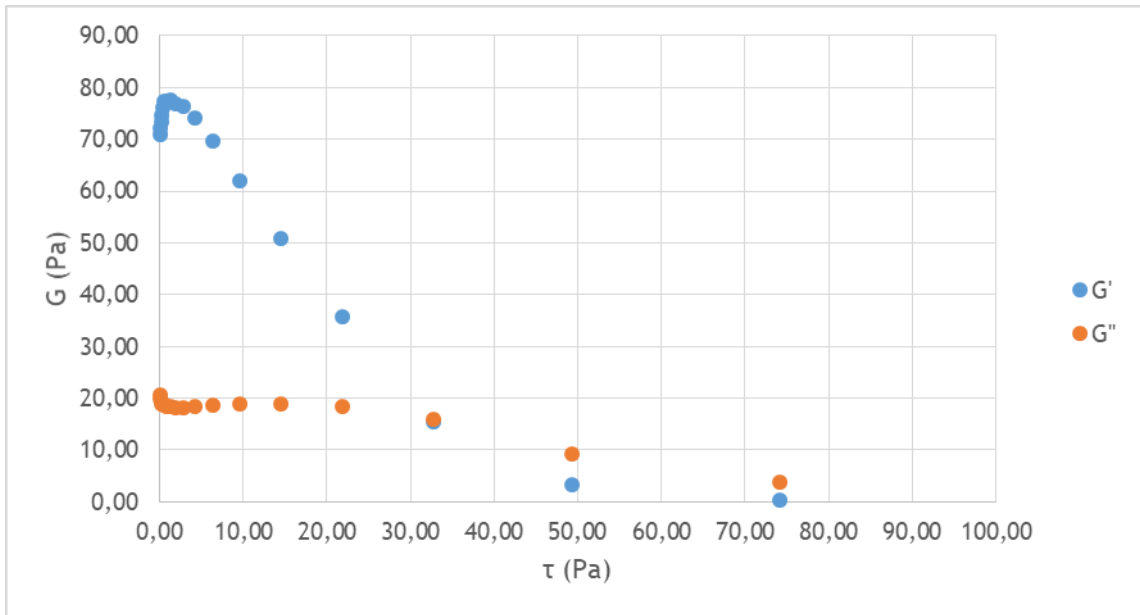


Figura 3.5: Módulo de perda G' e módulo de armazenamento G'' para AK1 em ensaios oscilatórios.

Na figura anterior pode observar-se uma clara distinção entre o módulo G' e G'' , resultado claramente diferente quando comparado com os resultados oscilatórios das suspensões NF anteriores, onde estes tendem a ser mais próximos e semelhantes. Pode retirar-se como conclusões que existiu uma maior resistência na estrutura formada, ainda assim a cerca de 30 τ (Pa) ocorreu o ponto crítico exibindo uma linearidade responsável pela quebra da estrutura e o comportamento da suspensão se altera para um comportamento aquoso de acordo com Benhamou, *et al.*, (2014) e Moberg *et al.*, (2017). É notável a viscosidade exibida fruto da estrutura e comportamento CNF com claro impacto na posterior formação de filmes.

3.2.3.3. Resultados dos ensaios oscilatório das suspensões de AK2

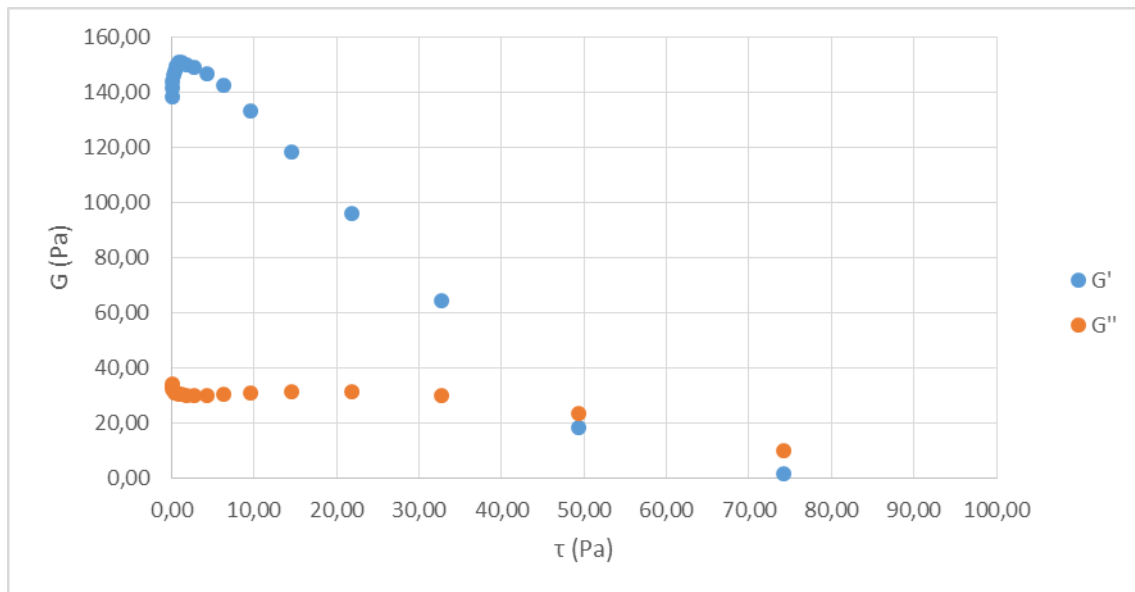


Figura 3.6: Módulo de perda G' e módulo de armazenamento G'' para AK2 em ensaios oscilatórios.

A CNF apresenta um comportamento semelhante em função dos módulos G' e G'' . Devido à semelhança com a anterior, o módulo G' apresenta valores muito superiores, porém no ponto crítico de rotura da estrutura, existe uma clara resistência apresentada pela AK2 ocorrendo a rotura a cerca de 50 τ (Pa) ao invés dos 30 τ (Pa) apresentados pela AK1, contudo também o comportamento geral das suspensões é semelhante ao descrito por Benhamou *et al.*, (2014) e Moberg *et al.*, (2017). Tal comportamento de facto está representado nos filmes produzidos, uma vez que filmes formados a partir de AK2 apresentam propriedades distintas dos anteriores e em particular dos outros filmes formados a partir de pastas Kraft em concreto comparando com os filmes de AK1. A compreensão dos comportamentos reológicos das suspensões de nanocelulose ainda carece de metodologias capazes de descrever e prever os comportamentos das suspensões uma vez que existe uma influência clara neste tipo de análise em função da geometria usada, a rugosidade da superfície de análise no cone do reómetro entre outras de acordo com (Nechyporchuk *et al.*, 2016).

3.3. Produção de filmes

As amostras de nanoceluloses são bio-nano-materiais bastantes promissoras para produzir filmes para possível aplicação em embalagens ativas. Assim, usando a técnica de evaporação de solvente, e as amostras de nanocelulose tentou-se produzir filmes unicamente de nanocelulose, contudo estes eram bastante quebradiços e portanto, optou-se por adicionar o glicerol como agente plastificante. Este constitui para alguns ensaios a nossa referência, e para a obtenção de uma embalagem com propriedades antimicrobiana, adicionaram-se dois

componentes, o óleo essencial de cravinho, uma mistura complexa de compostos e o principal componente deste óleo, o eugenol.

3.4. Caracterização dos filmes de CNF

3.4.1. Análise dos espectros FTIR dos filmes produzidos sem AG

Estão representados os espectros obtidos para cada tipo de filme de nanocelulose sem adição de qualquer tipo de composto nos pontos seguintes e identificados grupos característicos da nanocelulose.

3.4.1.1. Filmes sulfito (NF)

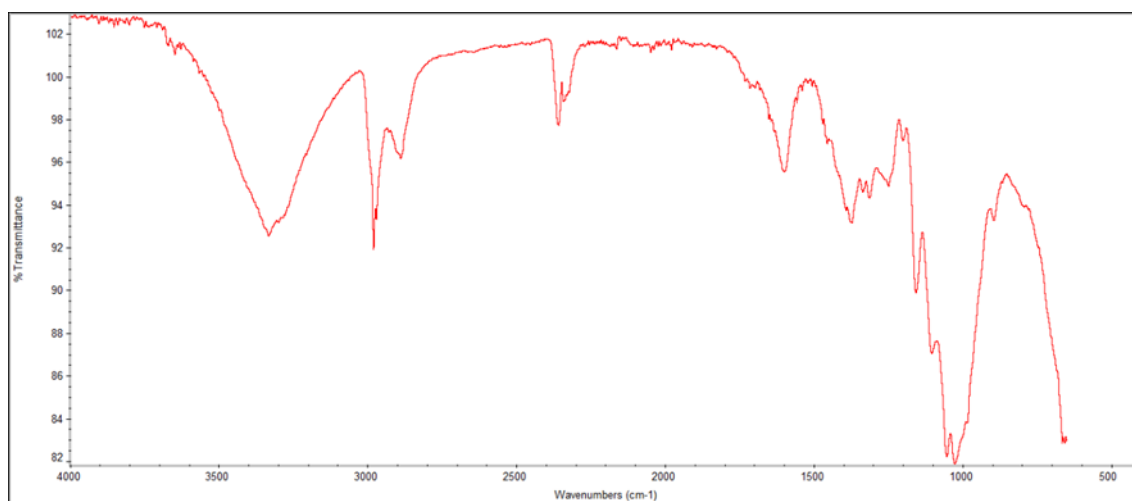


Figura 3.7: Espectro FTIR de filmes de NF.

Tabela 3.3: Grupos identificados nos filmes NF.

Grupos	O-H	C=O	C-H	C=C	Ligação β -glicosídica
Comprimento de onda (cm^{-1})	3333,80	1601,27	2889,73	1054,30	-

A análise para os espectros FTIR dos filmes NF revelam a presença de grupos O-H (Abraham *et al.*, 2011; Spoljaric *et al.*, 2015; Luo & Wang, 2017) a $3333,80 \text{ cm}^{-1}$ aparenta confirmar a presença de grupos carboxílicos quando acompanhada pelo grupo carbonilo C=O aqui presente a $1601,27 \text{ cm}^{-1}$. Também a ligação C=C característica do anel aromático está presente a $1054,30 \text{ cm}^{-1}$. A ligação C-H ligeiramente deslocada a aparecer a $2889,73 \text{ cm}^{-1}$ estes resultados aparentam ir ao encontro do descrito por (Beheshti-Tabar *et al.*, 2017).

3.4.1.2. Filmes kraft (AK1)

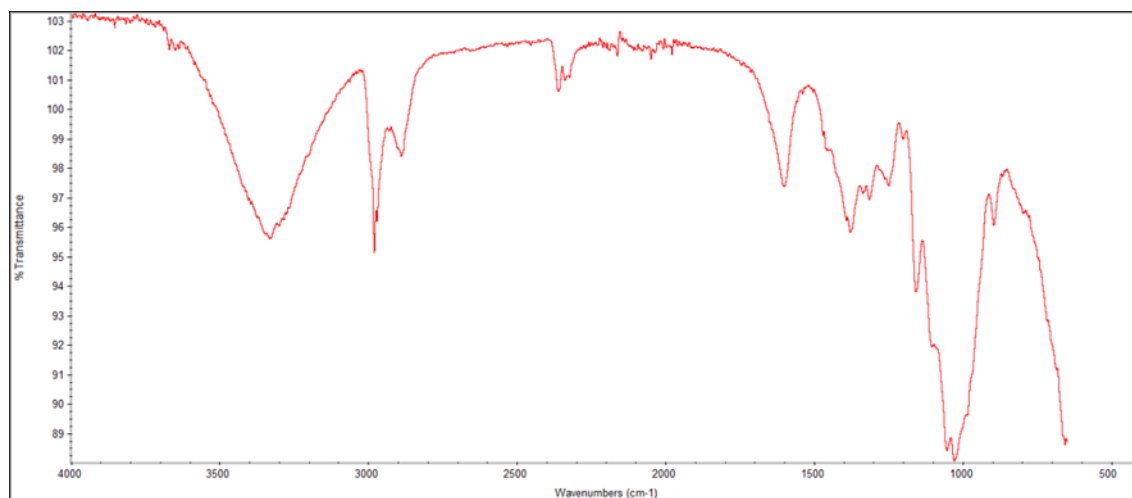


Figura 3.8: Espectro FTIR de filmes de AK1.

Tabela 3.4: Grupos identificados nos filmes AK1.

Grupos	O-H	C=O	C-H	C=C	Ligação B-glicosídica
Comprimento de onda (cm ⁻¹)	3331,30	1602,25	2889,87	1030,76	897,26

A análise para os espectros FTIR dos filmes AK1 também sugerem seguir a mesma tendência, revelando a presença de grupos O-H (Abraham *et al.*, 2011; Spoljaric *et al.*, 2015; Luo & Wang, 2017) a 3331,30 cm⁻¹ aparenta também confirmar a presença de grupos carboxílicos quando acompanhada pelo grupo carbonilo C=O aqui presente a 1602,25 cm⁻¹. Também a ligação C=C característica do anel aromático está presente a 1030,76 cm⁻¹. A ligação C-H ligeiramente deslocada a aparecer a 2889,87 cm⁻¹ estes resultados parecem estar de acordo com os apresentados no ponto anterior e apontam para o descrito por Beheshti-Tabar *et al.*, (2017). De notar que na análise deste filme aparece claramente distinta a ligação B-glicosídica a 897,26 cm⁻¹ estando de acordo com o descrito por Beheshti-Tabar *et al.*, (2017) e Luo & Wang, (2017).

3.4.1.3. Filmes kraft (AK2)

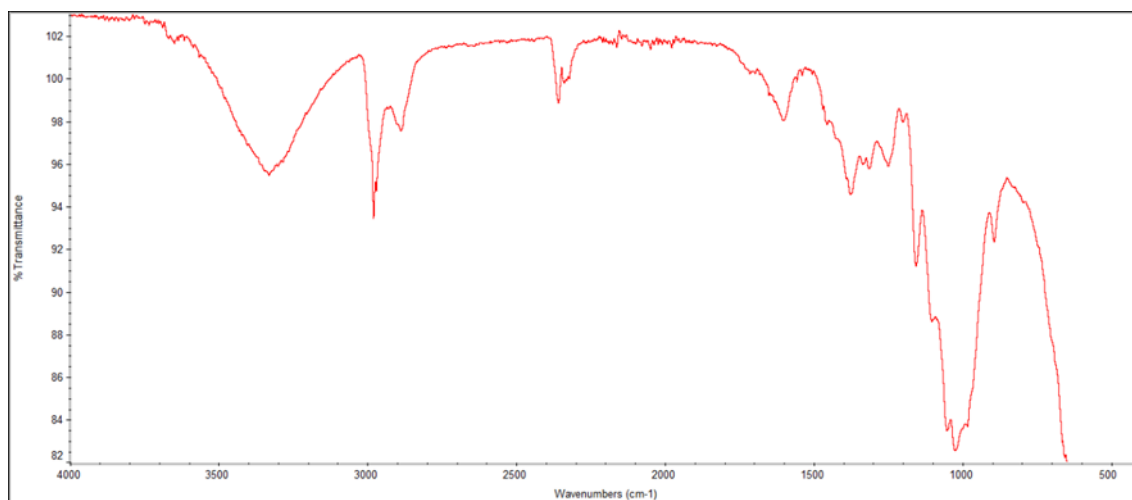


Figura 3.9: Espectro FTIR de filmes de AK2.

Tabela 3.5: Grupos identificados nos filmes AK2.

Grupos	O-H	C=O	C-H	C=C	Ligação B-glicosídica
Comprimento de onda (cm ⁻¹)	3332,10	1603,28	2889,05	1027,72	895,79

A análise para os espectros FTIR dos filmes AK2 aparenta ser muito semelhante ao representado nos filmes AK1, também aqui as semelhanças apontam para resultados semelhantes e com poucas variações, com a presença de grupos O-H (Abraham *et al.*, 2011; Spoljaric *et al.*, 2015; Luo & Wang, 2017) a 3332,10 cm⁻¹ aparenta também confirmar a presença de grupos carboxílicos quando acompanhada pelo grupo carbonilo C=O aqui presente a 1603,28 cm⁻¹. A ligação C=C característica do anel aromático está presente a 1027,72 cm⁻¹. A ligação C-H ligeiramente deslocada a aparecer a 2889,05 cm⁻¹ estes resultados também parecem estar de acordo com os apresentados no ponto anterior e seguem ao descrito por Beheshti-Tabar *et al.*, (2017). A análise deste filme aparece claramente a ligação B-glicosídica a 897,26 cm⁻¹ estando de acordo com o descrito por Beheshti-Tabar *et al.*, (2017) e Luo & Wang, (2017).

3.4.2. Análise dos espectros FTIR dos filmes com CLO e EU

3.4.2.1. Análise dos espectros FTIR para NF, AK1 e AK2 com CLO

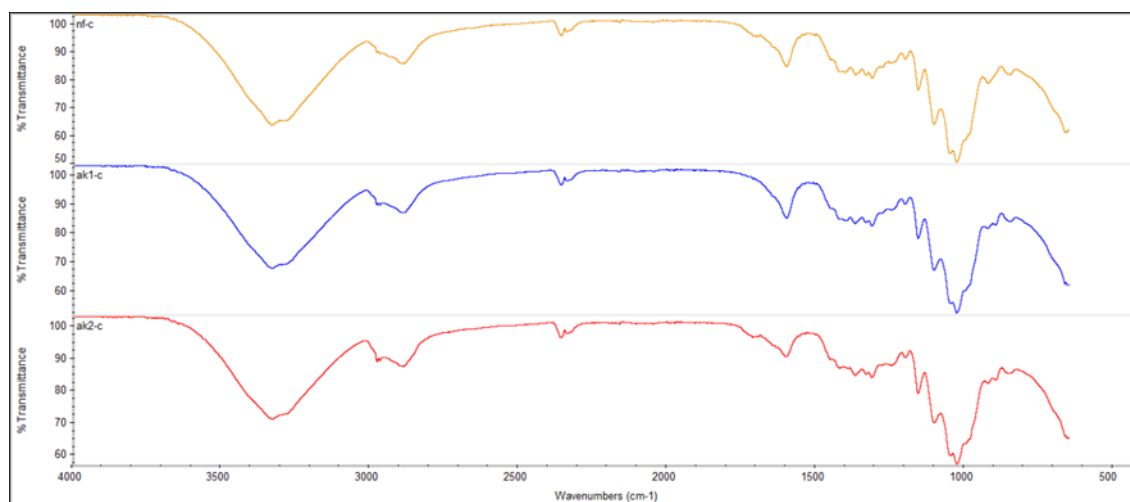


Figura 3.10: Espectro FTIR dos filmes NF, AK1 e AK2, incorporados com CLO (com o EU como componente principal).

Tabela 3.6: Grupos caraterísticos da molécula de EU identificados nos filmes.

Grupos	O-H do Eugenol	C-C	C-C	C-O	C-OH (complexos entre EU e o filme)
Comprimento de onda (cm ⁻¹)	3200 até 3400	1603,28	1372	1203	1040 -1060

A análise com recurso ao FTIR aos filmes incorporados com CLO representados na figura 3.10 revelam o que aparenta ser uma incorporação de composto ativo nos filmes. Para tal, procurou-se identificar os grupos caraterísticos da molécula de eugenol, identificando-se os grupos O-H (Mulla *et al.*, 2017; Piletti *et al.*, 2017), marcados pela inflexão presente no espectro entre 3200 e 3400 cm⁻¹ que apenas é identificável na presença da molécula de EU. É ainda possível identificar outros grupos indicativos da presença do EU com a ligação a 1603 cm⁻¹ e 1372 cm⁻¹ que aparenta ser representativa das ligações C-C do anel de fenil e a ligação C-O a 1203 cm⁻¹ presente na molécula do EU de acordo com (Mulla *et al.*, 2017). Aparenta ainda encontrar-se ligações entre o EU e o filme de nanocelulose através da formação de ligações C-OH entre 1040 cm⁻¹ a 1060 cm⁻¹ (Libretexst, 2013).

3.4.2.2. Análise dos espectros FTIR para NF, AK1 e AK2 com EU

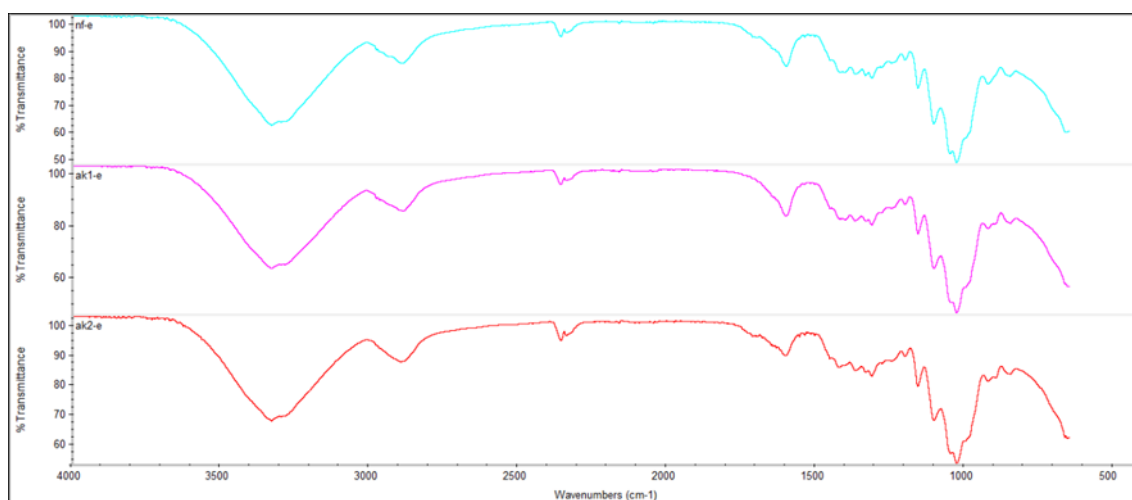


Figura 3.11: Espectro FTIR dos filmes NF, AK1 e AK2, incorporados com EU.

Tabela 3.7: Grupos característicos da molécula de EU identificados nos filmes.

Grupos	O-H do Eugenol	C-C	C-C	C-O	C-OH (complexos entre EU e o filme)
Comprimento de onda (cm ⁻¹)	3200 até 3400	1603	1315	1200	1030 -1106

A análise com recurso ao FTIR aos filmes incorporados com EU representados na figura anterior revelam um cenário semelhante ao encontrado nos filmes CLO o que é natural, uma vez que o composto maioritário nos filmes de CLO e nos filmes representados neste ponto é a molécula de EU que também foi capaz de ser incorporada nos filmes. Mais uma vez, procurou-se identificar os grupos característicos da molécula de eugenol, identificando-se os grupos O-H (Mulla *et al.*, 2017; Piletti *et al.*, 2017), que também revelam possuir a mesma inflexão presente no espectro de CLO representada entre 3200 e 3400 cm⁻¹ característico na presença da molécula de EU. É ainda possível identificar outros grupos com ligeiros desvios do ponto anterior contudo mais exatos uma vez que se trata da molécula de EU pura com a ligação a 1603 cm⁻¹ e 1315 cm⁻¹ representativa das ligações C-C do anel de fenil e a ligação C-O a 1203 cm⁻¹ presente na molécula do EU de acordo com (Mulla *et al.*, 2017). Também se consegue identificar as ligações entre o EU e o filme de nanocelulose através da formação de ligações C-OH entre 1030 cm⁻¹ a 1106 cm⁻¹ (Libretextst, 2013)

3.5. Morfologia dos filmes de NF, AK1 e AK2, com e sem AG

Foi possível observar por microscopia eletrónica a estrutura à superfície e também adquirir imagens das secções transversais dos filmes, tal foi conseguido com recurso à crio-fratura com nitrogénio líquido.

3.5.1. Imagens SEM dos filmes de CNF sem AG

3.5.1.1. Filmes NF

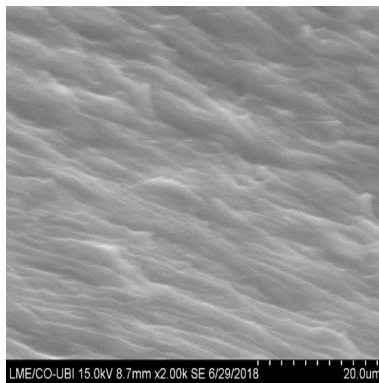


Figura 3.12: Imagem da superfície de um filme NF

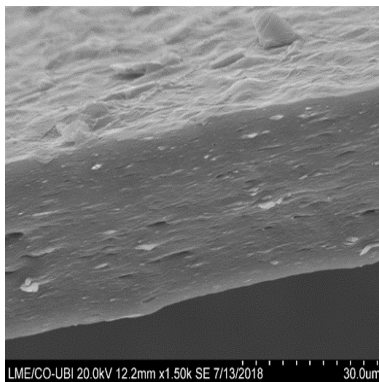


Figura 3.13: Imagem de secção transversal de um filme de NF.

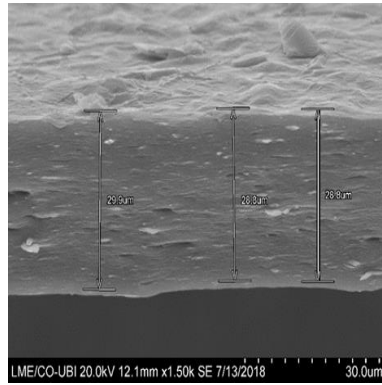


Figura 3.14: Imagem de secção transversal de um filme de NF com medição da espessura.

3.5.1.2. Filmes AK1

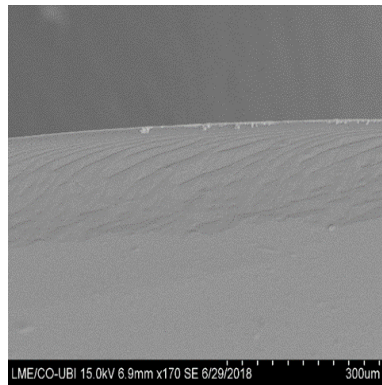


Figura 3.15: Imagem de superfície de um filme de AK1.

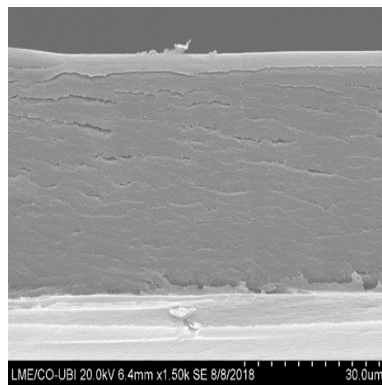


Figura 3.16: Imagem de corte transversal de um filme de AK1.

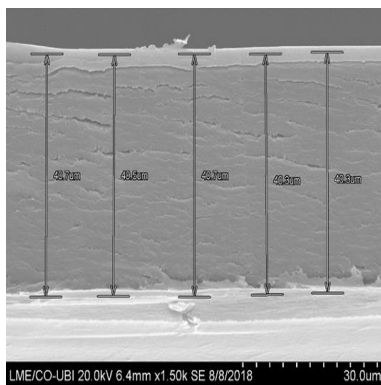


Figura 3.17: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com medição da espessura.

3.5.1.3. Filmes AK2

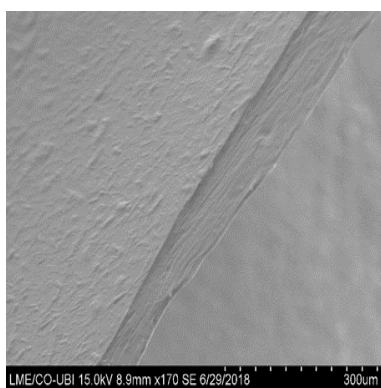


Figura 3.18: Imagem de superfície de um filme de AK2.

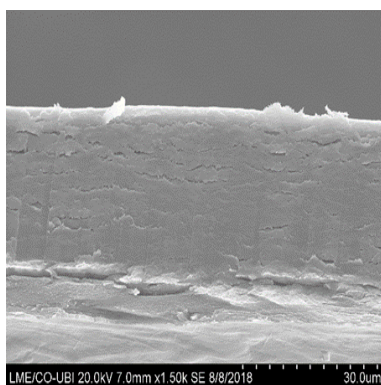


Figura 3.19: Imagem de corte transversal de um filme de AK2.

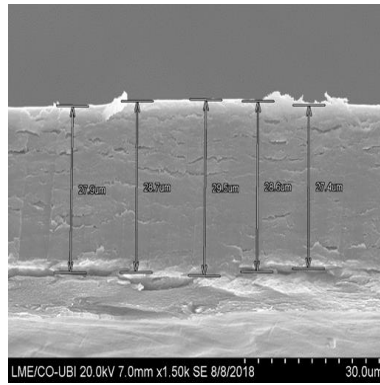


Figura 3.20: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com medição da espessura.

Observando as imagens anteriores, pode constatar-se a estrutura compacta apresentada pelos filmes. Observando as das superfícies dos filmes NF, AK1 e AK2 filmes que apenas contêm nanocelulose e se observa uma estrutura lisa ou rugosa com a presença nalguns casos de algumas fibrilas, com baixa porosidade ou mesmo inexistente, revelando uma estrutura fechada fruto do processo de enovelamento das fibras aquando do processo de secagem. Tal falta de porosidade pode ser constatada nas imagens dos cortes transversais, que revelam uma estrutura também ela densa e compacta, com o que aparenta ser uma deposição de “folhas” em camada, conferindo as propriedades mecânicas dos filmes, também é de sugerir que é entre esses espaços que muito possivelmente as moléculas de CLO, EU e glicerol, possivelmente ficam alojadas, tal parece ficar implícito nas imagens seguintes, estas já contendo tanto EU como CLO e ainda o agente plastificante glicerol. Também a espessura dos filmes é uma constante variável, podendo esta acontecer por vários fatores, desde o mais ligeiro desequilíbrio na estufa de secagem, ao próprio alojamento das moléculas entre os espaços anteriormente referidos, aparentam justificar esta tendência. De notar que estas diferenças de espessura levam a alteração nas capacidades mecânicas dos filmes, podendo influenciar de facto o seu comportamento, fragilizando-os quando existem zonas mais resistentes que outras, ou tornando-os mais moldáveis quando reforçados de por exemplo com glicerol que funciona como plastificante.

3.5.2. Imagens SEM dos filmes de CNF com CLO e EU

3.5.2.1. Filmes NF

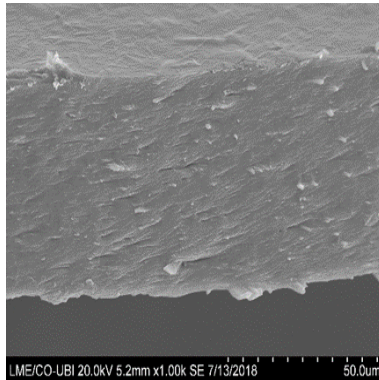


Figura 3.21: Imagem de corte transversal de um filme de NF com CLO.

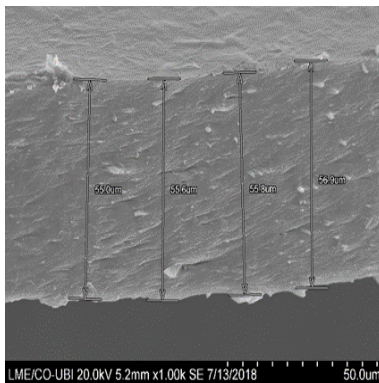


Figura 3.22: Imagem de corte transversal de um filme de NF com CLO com medição da espessura.

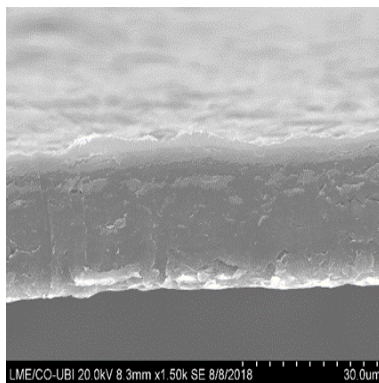


Figura 3.23: Imagem de corte transversal de um filme de NF com EU.

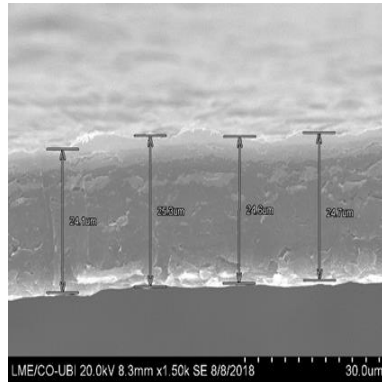


Figura 3.24: Imagem de corte transversal de um filme de NF com EU com medição da espessura.

3.5.2.2. Filmes AK1

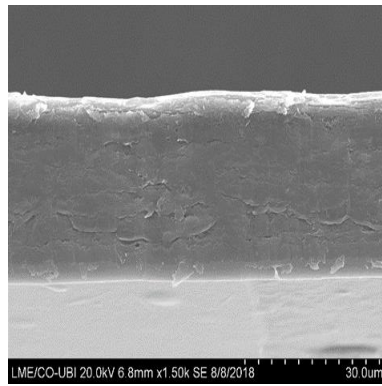


Figura 3.25: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com CLO.

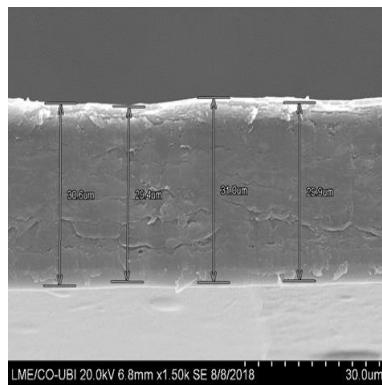


Figura 3.26: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com CLO com medição da espessura.

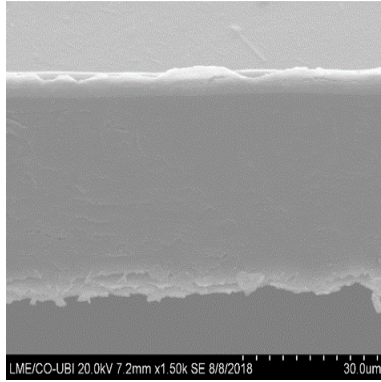


Figura 3.27: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com EU.

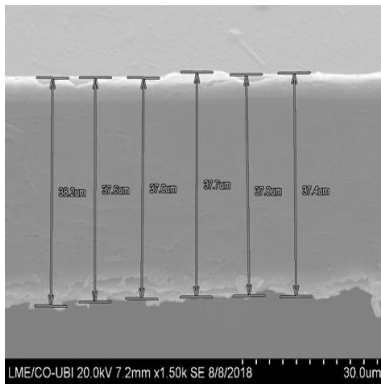


Figura 3.28: Imagem de corte transversal de um filme de AK1 com EU com medição da espessura.

3.5.2.3. Filmes AK2

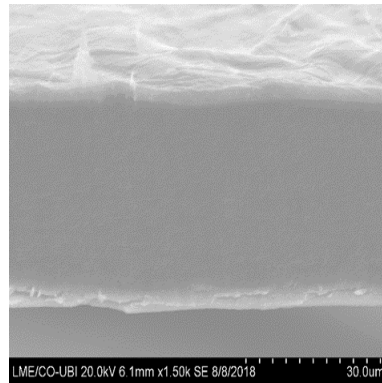


Figura 3.29: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com CLO.

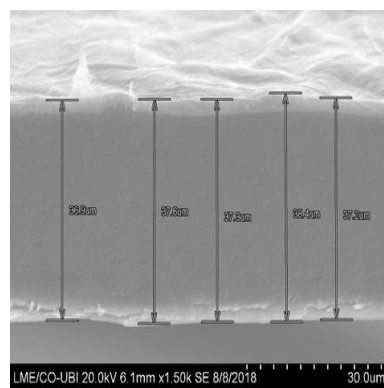


Figura 3.30: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com CLO com medição da espessura.

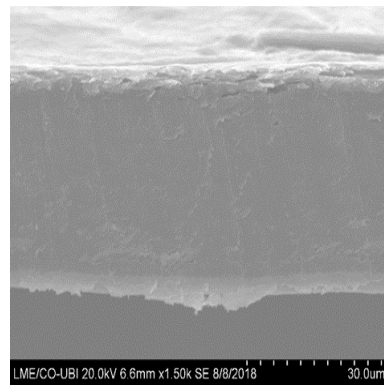


Figura 3.31: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com EU.

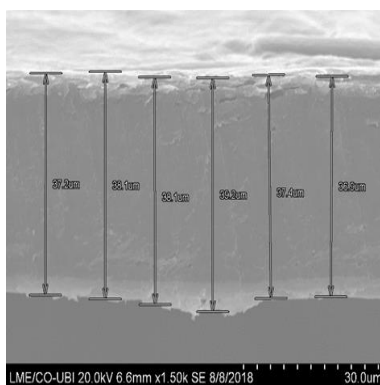


Figura 3.32: Imagem de corte transversal de um filme de AK2 com EU com medição da espessura.

Os filmes de nanocelulose atrás representados apresentam todos como denominador comum, ou seja, a elevada compatibilidade e espessura na estrutura que ainda que nem sempre se encontra de acordo com as espessuras determinadas atrás, de um modo geral são representativas e indicativas da organização interna dos filmes. Com a adição de plastificantes como o glicerol e ainda as moléculas como o CLO e EU que acabam por preencher qualquer tipo de espaço ainda liberto na estrutura como observado nas imagens dos filmes no ponto 3.5.1 e 3.5.2 onde os poucos espaços entre as “fatias” de nanocelulose depositadas capazes de alojar moléculas, aqui se encontram totalmente preenchidos. Pode supor-se no glicerol como o grande agente ligante na matriz dos filmes e muito possivelmente com moléculas de CLO e EU espalhadas e encapsuladas no interior, algo que também não é possível confirmar visualmente, mas que aparenta ser o caso quando se realizam os ensaios de libertação que provam existir libertação de moléculas da matriz dos filmes para o solvente em questão.

3.5.3. Propriedades estruturais, mecânicas e de barreira dos filmes

Os filmes foram caracterizados ao nível das suas propriedades estruturais, ou seja, gramagem, espessura e a massa volúmica. A gramagem representa a massa por unidade de área do filme, a espessura corresponde a distância perpendicular entre as duas superfícies, e a massa volúmica é obtida pela razão entre a gramagem e a espessura.

Tabela 3.8: Tabela resumo das propriedades estruturais dos filmes com CLO e EU para cada uma das nanoceluloses em relação à espessura, gramagem e densidade.

	NF			AK1			AK2		
	Controlo	CLO	EU	Controlo	CLO	EU	Controlo	CLO	EU
Espessura (µm) Média ± desvio padrão	53,5 ± 0,01	60,1 ± 2,52	55,5 ± 4,80	47,9 ± 0,003	49,9 ± 3,38	42,5 ± 1,51	47,6 ± 0,003	46,5 ± 3,00	43,4 ± 2,08
Gramagem (g/m²) Média ± desvio padrão	55,8 ± 2,89	46,7 ± 0,93	44,6 ± 1,54	60,5 ± 1,35	50,5 ± 0,68	51,3 ± 1,13	63,6 ± 0,95	48,2 ± 2,75	52,6 ± 0,87
Densidade aparente (g/cm³)	1,04	0,78	0,80	1,26	1,01	1,21	1,34	1,04	1,21

Segundo os resultados obtidos na tabela 3.8 o valor mais elevado de gramagem é registado para os filmes de AK2, contudo, as gramagens para ambas as AK encontram-se muito semelhantes com valores aproximados de 50 g/m², gramagem superior ao calculado teoricamente mas que pode ser justificada pelas pequenas variações de massa pesadas/perdidas no processo de produção dos filmes.

Relativamente aos valores das espessuras dos filmes com os agentes microbianos estes variam entre 42,5 ± 1,51 µm e 60,1 ± 2,52 µm; e para as espessuras dos filmes sem a presença destes compostos os valores de espessura são ligeiramente inferiores (os resultados não são aqui mostrados). A densidade aparente (parâmetro muito usado na caracterização do papel) é assim denominada por incluir os espaços do papel preenchidos por ar, é considerada uma das mais importantes propriedades do papel, influenciando as propriedades físicas e óticas. Para os filmes de nanocelulose obtêm-se valores de densidade aparente entre 0,78 g/cm³ para NF com CLO e 1,34 g/cm³ para o controlo da AK2. Aulin *et al.*, (2009) refere valores de densidade de filmes de celulose microfibrilada, preparada em condições similares entre 1,48 e 1,63 g/cm³, indicando uma porosidade baixa. A porosidade pode ser calculada e estimada a partir da medição de densidade usando a equação 6:

$$\text{Porosidade (\%)} = (1 - \eta_{\text{filme}} / \eta_{\text{celulose}}) \times 100 \quad (6)$$

Onde: η_{filme} corresponde à densidade do filme e η_{celulose} corresponde à densidade da celulose, que se assume ser 1,5 g.cm⁻³ (Henriksson, *et al.*, 2008).

Atendendo às densidades apresentadas na Tabela 3.3, as porosidades calculadas variam entre 19 % para os filmes de AK1 e AK2 com o eugenol e 48% para os filmes de NF com CLO mostrando estruturas com baixa e moderada porosidade teórica. Os valores obtidos para AK1 e AK2 corroboram com as tendências encontradas nos ensaios de libertação, contudo, no caso de NF seria de esperar outro tipo de comportamento, atendendo aos valores de porosidade teórica obtidos.

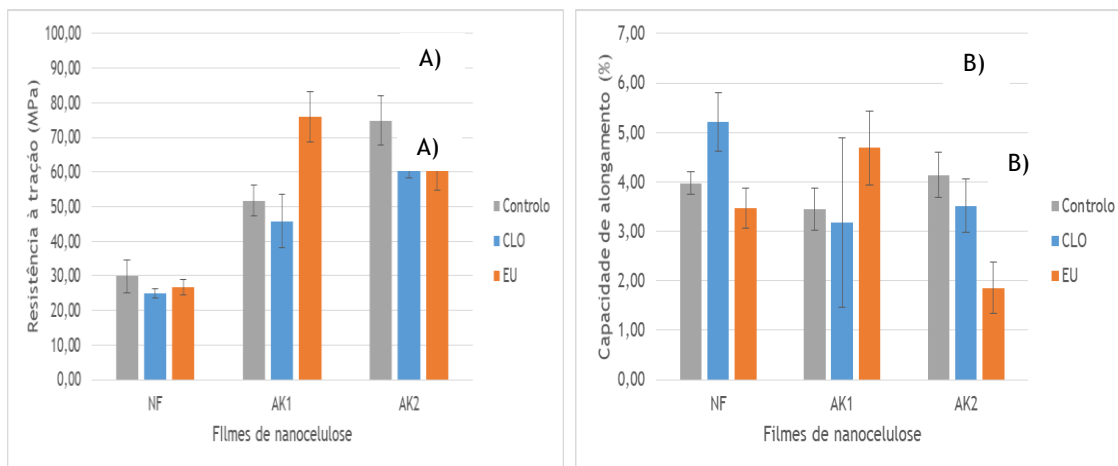


Figura 3.33: A) Resistência à tração para os filmes controlo e com CLO e EU.
 B) Alongamento para filmes controlo e com CLO e EU.

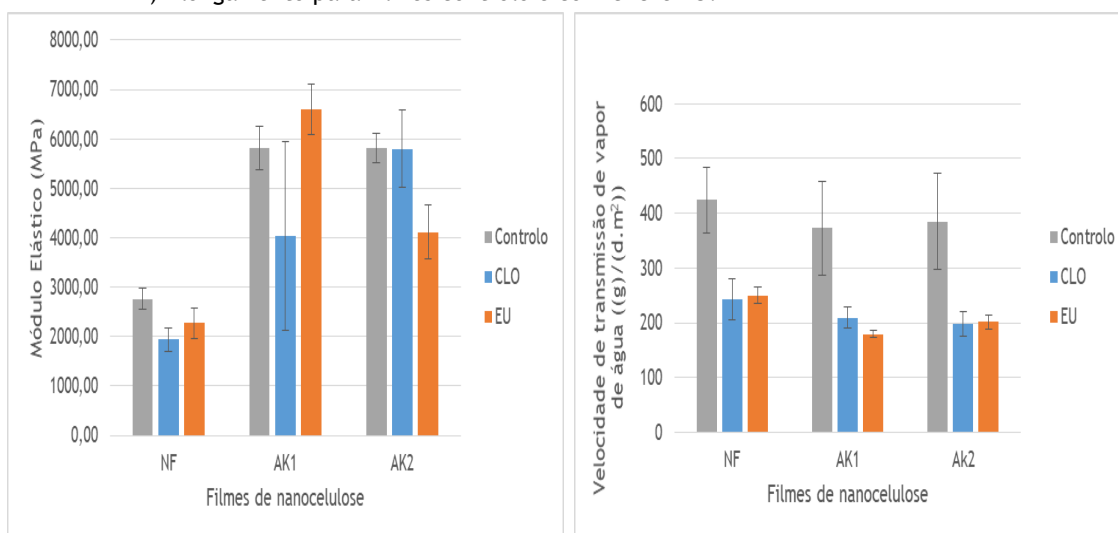


Figura 3.34: A) Módulo da elasticidade para filmes controlo e com CLO e EU.
 B) Velocidade de transmissão de vapor de água em filmes controlo e com CLO e EU.

Os resultados para o módulo de elasticidade revelam existir um pequeno incremento para os filmes com EU quando comparados com os filmes de CLO. Mais uma vez os filmes de NF aparentam possuir módulos elásticos inferiores obtendo cerca de 1900 MPa para CLO e cerca de 2300 MPa para EU. Os filmes de AK1 uma enorme diferença entre os filmes AK1 com CLO e EU, com cerca de 4000 MPa e 6600 MPa respetivamente. Os filmes de AK2 ao contrário dos anteriores demonstram um módulo elástico maior quando incorporados com CLO com cerca de 5800 MPa e aproximadamente 4100 MPa para os filmes com EU. Valores no módulo de Young obtidos nos filmes de nanocelulose aqui produzidos aparentam estar de acordo com Faradilla *et al.*, (2017) que descreve módulos de Yong para os seus filmes de nanocelulose de 3,5 GPa o que equivale a 3500 MPa, valor superior quando comparado com os filmes NF e AK1 mas claramente inferior quando comparado com os filmes AK2. Barbash *et al.*, (2016) reporta valores entre 2100 MPa a 7300 MPa, valores claramente dentro dos encontrados para o

módulo de Young em filmes de nanocelulose, valores aqui também presentes concretamente em filmes de AK1 incorporados com EU como limite máximo e os filmes NF com valores muito semelhantes ao limite mínimo por este autor descrito, o mesmo autor realça ainda o claro efeito do tratamento químico e mecânico no impacto das propriedades, referindo o maior empacotamento da macromoléculas de celulose que leva a estes valores elevados de módulos de Young e inclusive à transparência dos filmes, caso observado nos filmes de AK1 aqui produzidos. Kumar *et al.*, (2014) apresenta valores superiores para o módulo de Young em todos os seus filmes de nanocelulose, com módulos superiores a 10000 MPa, valores claramente superiores aos atingidos aqui, já o mesmo autor apresenta valores para filmes de celulose microfibrilada de cerca de 5000 MPa, valores semelhantes aos aqui encontrados, o que pode em parte indicar existir uma percentagem de fibrilas à escala micro capazes de influenciar este tipo de comportamento. Azeredo *et al.*, (2010) descreve valores para os filmes de nanocelulose para o módulo de Young distintos, ainda que para este caso, os valores aparentam ser inferiores com módulos de cerca de 1300 MPa, ainda que neste caso, o autor tenha produzido filmes de nanocelulose com quitosano, os valores por ele descrito, são claramente inferiores aos aqui encontrados.

Os filmes de nanocelulose com incorporação de CLO apresentam percentagem de alongamento entre 5,21 % a 3,52%, e para o EU valores ligeiramente inferiores. Analisando esta propriedade tendo em conta o tipo de nanoceluloses, os filmes de NF conseguem alongamentos na ordem dos 5% para CLO e 3% para EU. Já os filmes AK1 e AK2 revelam uma tendência contrária com os filmes de AK1 a conseguirem alongamentos de 3% e os de AK2 com 4% ambos para CLO, acontecendo exatamente o contrário no que respeito diz quando incorporados com EU, os filmes AK1 conseguem alongamentos de quase 5% e os filmes com AK2 de apenas 2%.

Para a velocidade de transmissão de vapor de água (WVTR), filmes de NF aparentam possuir pior capacidade na resistência à migração de moléculas de vapor água, alcançando valores diários na ordem das 240 g.d⁻¹.m⁻² para filmes com CLO e 250 g.d⁻¹.m⁻² para filmes com EU. Já os resultados para os filmes de AK1 demonstram uma redução na migração de moléculas de vapor de água, existindo uma ligeira diferença entre filmes incorporados com CLO que aparentam ser menos capazes de impedir a migração de moléculas com valores a rondar as 210 g.d⁻¹.m⁻² e comparando com os seus congéneres filmes com EU que apenas permitem a migração de cerca de 180 g.d⁻¹.m⁻². Os filmes de AK2 aparentam situar-se numa posição intermédia entre os filmes de NF e AK1, com migrações de cerca de 200 g.d⁻¹.m⁻² para filmes com CLO e EU, não existindo qualquer tipo de diferença entre ambos. Os filmes com CLO tem uma capacidade ligeira superior dos de EU no impedimento da passagem das moléculas de vapor de água, excetuando no caso os filmes de AK2. É de supor que estes resultados estão afetos à estrutura interna dos filmes, desde a sua estrutura compacta, tortuosidade e baixa ou mesmo inexistente porosidade, que aliado ao carácter hidrofóbico do CLO e do EU

resultam em filmes com estas características. Ferrer *et al.*, (2017) descrevem para filmes de CNF um valor de $234 \text{ g.d}^{-1}.\text{m}^{-2}$, valor superior aos aqui apresentados, podendo indicar que compostos com natureza hidrofóbica possam contribuir na ação de permeabilidade às moléculas de vapor de água. Kumar *et al.*, (2014) descrevem valores semelhantes aos aqui encontrados, que variam entre $162 \text{ g.d}^{-1}.\text{m}^{-2}$ a $218 \text{ g.d}^{-1}.\text{m}^{-2}$ para filmes de nanocelulose. Por fim, é necessário salientar o impacto que a adição de glicerol poderá ter nos comportamentos dos filmes, mostrado por Cerqueira, *et al.*, (2012) que aponta este agente plastificante como potenciador no processo de absorção de moléculas de vapor de água. Ora para os filmes aqui produzidos que contêm 37% (m/m) deste plastificante pode haver uma clara influencia no seu impacto sobre a absorção que possivelmente estará camuflado nos resultados aqui apresentados.

3.6. Atividade sequestradora do radical DPPH

Os resultados referentes atividade sequestradora do radical DPPH dos filmes de nanocelulose com EU e CLO aparecem resumidos na seguinte figura.

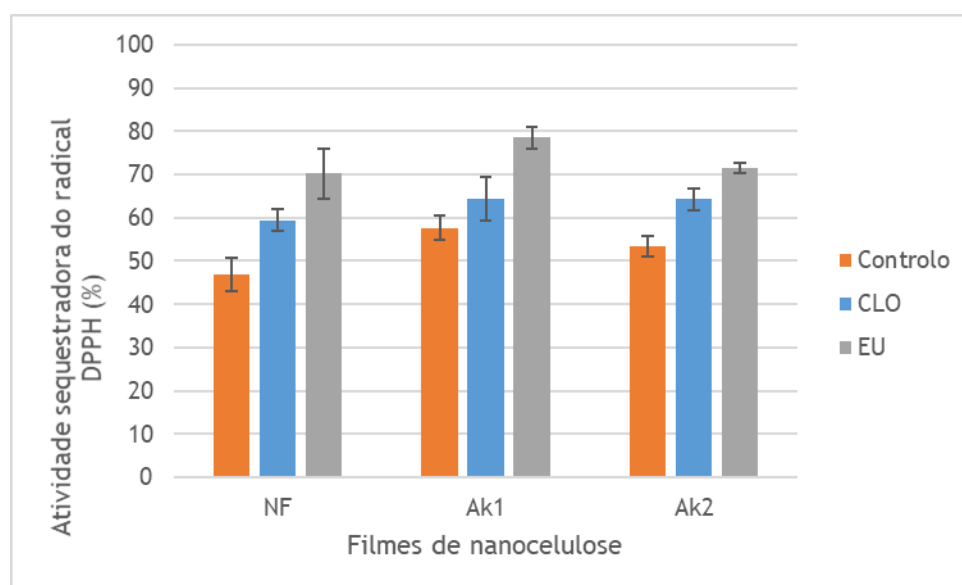


Figura 3.35: Atividade sequestradora do radical DPPH em filmes controlo e com EU e CLO.

Os filmes de nanocelulose onde o eugenol foi incorporado revelam para ambos os tipos de nanocelulose os melhores valores de atividade antioxidante. Comparativamente ao controlo, o EU apresenta incrementos que variam desde 25% para AK2 a 33% para filmes de NF. Uma tendência ligeiramente inferior é mostrada para os filmes com incorporação CLO, onde apresenta incrementos de 10% para AK2 e 18% para NF e AK1. Assim, podemos concluir que a AK2 é a CNF que apresente a mais baixa atividade antioxidante a nível percentual.

3.7. Resultados dos ensaios de libertação em meio aquoso e em etanol

3.7.1. Libertação de CLO e EU em filmes de NF, em meio aquoso e em etanol.

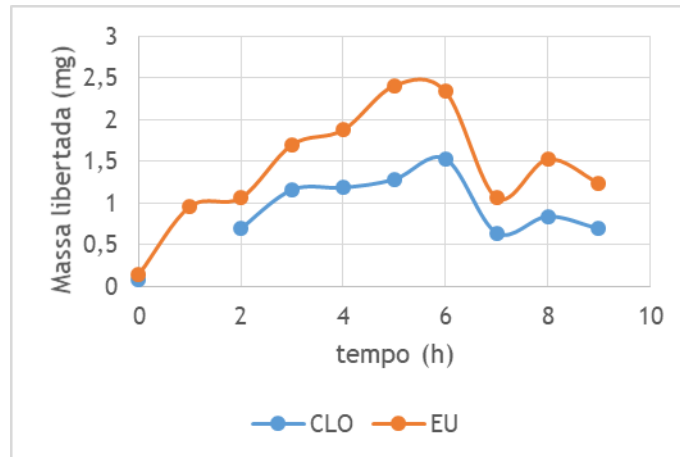


Figura 3.36: Representação da libertação de CLO e EU em filmes NF em meio aquoso.

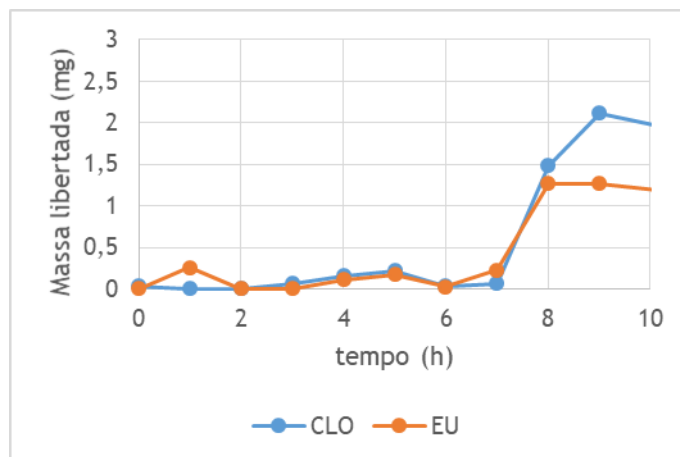


Figura 3.37: Representação da libertação de CLO e EU em filmes NF em etanol.

3.7.2. Liberação de CLO e EU em filmes de AK1, em meio aquoso e em etanol

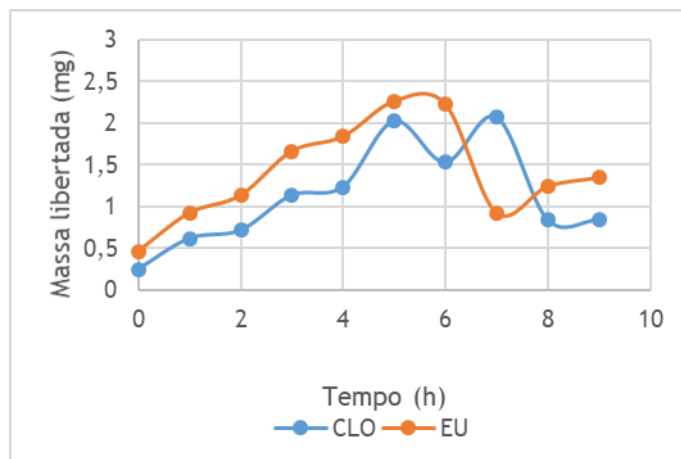


Figura 3.38: Representação da liberação de CLO e EU em filmes AK1 em meio aquoso.

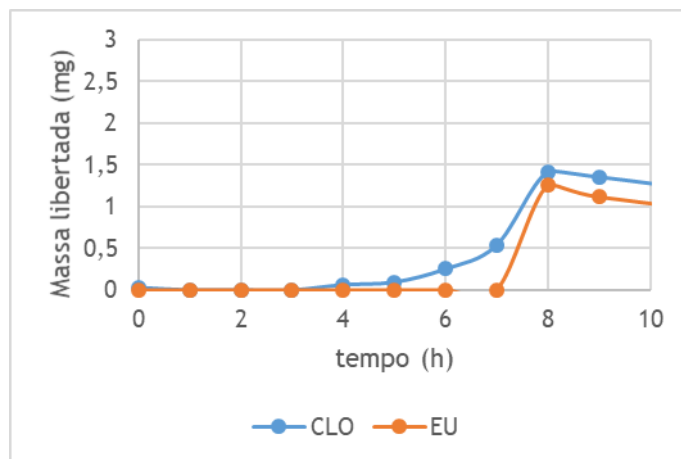


Figura 3.39: Representação da liberação de CLO e EU em filmes AK1 em etanol.

3.7.3. Liberação de CLO e EU em filmes de AK2, em meio aquoso e em etanol.

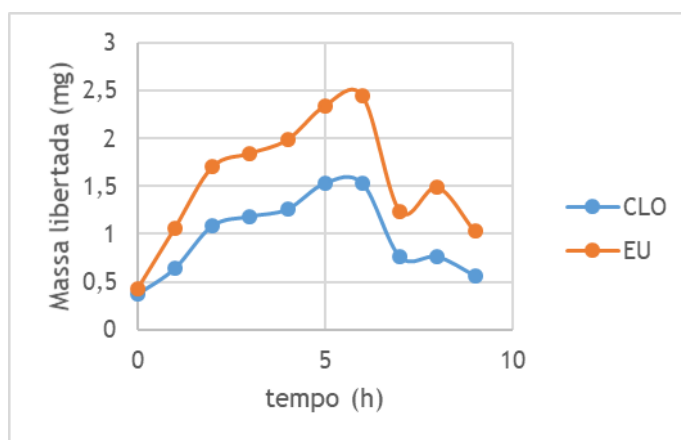


Figura 3.40: Representação da liberação de CLO e EU em filmes AK2 em meio aquoso.

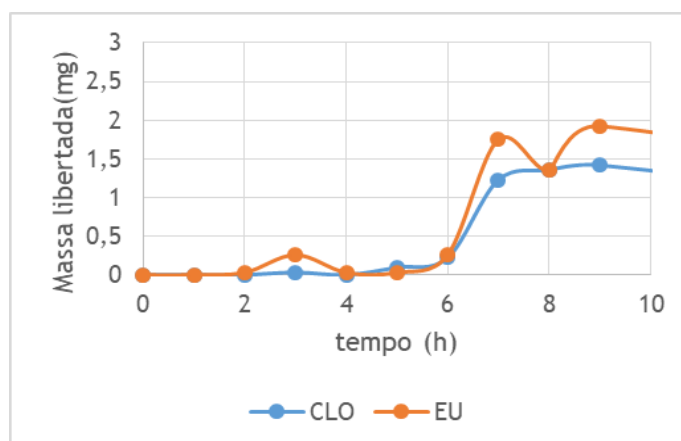


Figura 3.41: Representação da liberação de CLO e EU em filmes AK2 em etanol.

Os ensaios preliminares da liberação dos compostos CLO e EU demonstram claras diferenças entre os meios de liberação, o aquoso, e em etanol. É possível verificar que existe uma liberação inicial mais lenta em etanol quando comparado com o meio aquoso. Importa referir que estes são ensaios preliminares, com os quais identificamos alguns fatores que podem ter contribuído para os resultados alcançados não serem os expectáveis.

Inicialmente os ensaios realizados em meio aquoso, careceram de agitação mecânica capaz de promover uma dispersão homogênea. Outra limitação, menos aparente aqui, mas com a tendência a surgir com uma análise detalhada das figuras anteriores é o claro decréscimo na massa medida, esta é fruto das variações de concentração calculadas nos instantes de cada medição, o que nos leva à seguinte limitação, o sistema aparenta sofrer influência da

temperatura, levando a crer que possa estar a ocorrer um efeito de adsorção/desadsorção dependente da temperatura. Esta suspeita é fundamente no facto de entre o intervalo noite/dia a concentração medida diminuía no início de cada manhã, aumento progressivamente ao longo do dia, levando a suspeitar do efeito da temperatura e do ciclo de calor/frio. Esta suspeita pode em parte estar correta uma vez que Dhoot *et al.*, (2009) e Hill *et al.*, (2013) demonstram existir uma variação clara no coeficiente de difusão do EU a diferentes temperaturas. Outra limitação deveu-se ao facto destes ensaios iniciais terem sido conduzidos com variação de volume, ou seja, não ocorreu reposição de solvente retirado em cada medição. Por fim, a limitação presente na capacidade de difusão das moléculas entre a matriz dos filmes e a fase aquosa/orgânica em função do solvente;

Analisando as figuras anteriormente apresentadas, observa-se que existe uma maior facilidade de libertação até as 10h em meio aquoso em todos os filmes, conseguindo-se massas até 2,4 mg libertadas nos filmes de AK2 com EU. Em etanol a maior quantidade libertada foi de 2,1 mg em filmes de NF com CLO. Em ambas as situações, representa-se cerca de 10% de massa libertada em função da massa adicionada aos filmes. Esta baixa libertação deve-se a uma estrutura fechada das nanoceluloses, que contrastam com o descrito por Lavoine *et al.*, (2014) que descrevem a dificuldade em promover a libertação das moléculas de cafeína incorporadas em filmes de celulose microfibrilada, uma matriz muito mais aberta.

3.8. Resultados dos ensaios antimicrobianos

A atividade antimicrobiana dos filmes foi testada de forma qualitativa contra as estirpes usando o teste da difusão em disco. O tamanho do halo de inibição foi medido para testar a capacidade de inibição nas estirpes de microrganismos contra os compostos CLO e EU, resultados apresentados na seguinte tabela 3.10.

Tabela 3.9: Diâmetros dos halos de inibição (mm) dos compostos antimicrobianos relativamente aos microrganismos estudados.

<i>Diâmetro halo inibição (mm)</i>	<i>CLO</i>	<i>EU</i>
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 13305		
Média ± desvio padrão	20,72 ± 1,27	20,21 ± 1,94
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		
Média ± desvio padrão	22,21 ± 4,2	21,04 ± 0,75
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
Média ± desvio padrão	21,08 ± 1,87	20,95 ± 1,7
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311		
Média ± desvio padrão	16,74 ± 0,16	17,595 ± 0,84

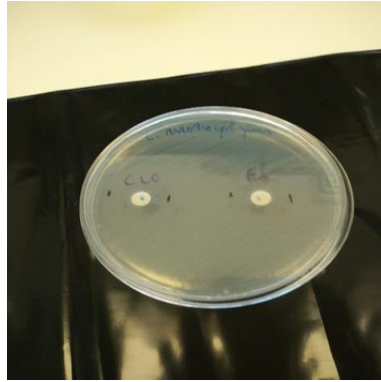


Figura 3.42: Resultado em placa de agar na inibição de *Listeria monocytogenes* LMG 13305 para CLO e EU.



Figura 3.43: Resultado em placa de agar na inibição de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para CLO e EU.

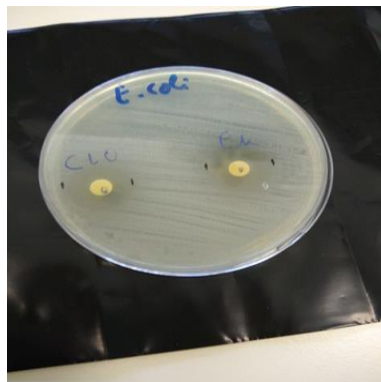


Figura 3.44: Resultado em placa de agar na inibição de *Escherichia coli* ATCC 25922 para CLO e EU.

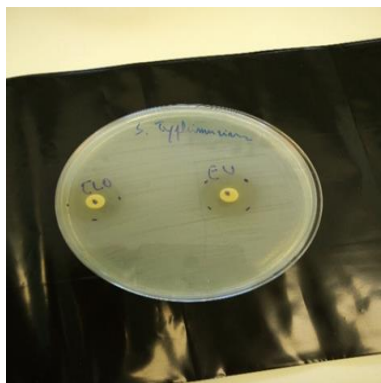


Figura 3.45: Resultado em placa de agar na inibição de *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 para CLO e EU.

Os ensaios preliminares serviram para testar a capacidade de inibição dos nossos compostos. Observando os halos de inibição na tabela 3.10 observamos que os compostos de facto possuem capacidade de inibir estas estirpes. Os resultados revelam que o CLO e EU apresentam a mesma eficácia de inibição para todas as estirpes usadas neste trabalho. Resultado concordante visto o CLO ser constituído maioritariamente por EU, que é um composto hidrofóbico capaz de penetrar nas paredes da membrana celular em estirpes de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* (Mulla *et al.*, 2017). Resultados semelhantes nos diâmetros de inibição para *L. monocytogenes* e *E.coli* com 15 mm de inibição respetivamente para ambas as estirpes foram obtidos por Gul *et al.*, (2018), os resultados aqui alcançados demonstram diâmetros ligeiramente superiores. Analisando a inibição destes microrganismos dos filmes de CNF com incorporação CLO ou EU para concentração de 10% de cada composto, verificou-se que não ocorreu qualquer tipo de inibição. Este tipo de comportamento pode ser resultado de uma estrutura extremamente fechada e/ou de uma baixa concentração destes compostos. Assim, numa segunda etapa procurou-se aumentar a concentração para 50% e 100% em relação à concentração inicialmente usada. Este comportamento é observável da figura 3.48 à 3.51.



Figura 3.46: Resultado em placa de agar na inibição de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para CLO e EU em filmes NF, AK1 e AK2.



Figura 3.47: Resultado em placa de agar na inibição de *Escherichia coli* ATCC 25922 para CLO e EU em filmes NF, AK1 e AK2.



Figura 3.48: Resultado em placa de agar na inibição de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 para CLO e EU em filmes NF, AK1 e AK2.



Figura 3.49: Resultado em placa de agar na inibição de *Listeria monocytogenes* LMG 13305 para CLO e EU em filmes NF, AK1 e AK2.

Após verificação da capacidade de inibição, optou-se por um incremento na concentração utilizada para a formação dos filmes de 10% para 50% e 100% mas apenas para os filmes de AK2 para compreender se existia um efeito positivo no aumento da mesma capaz de promover a liberação dos compostos no meio.

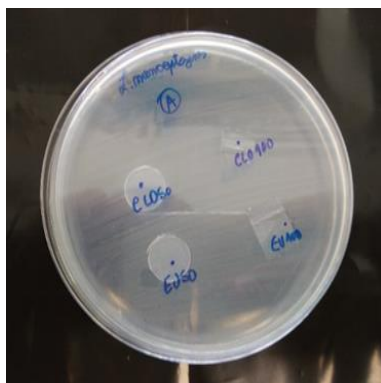


Figura 3.50: Resultado em placa de agar na inibição de *Listeria monocytogenes* LMG 13305 para CLO e EU a 50% e 100% respectivamente em filmes de AK2.

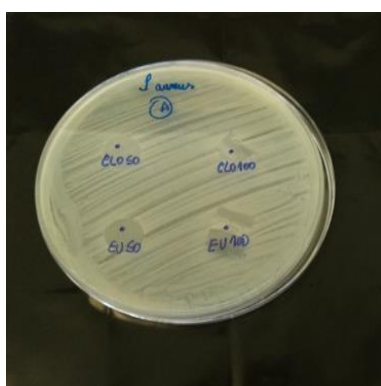


Figura 3.51: Resultado em placa de agar na inibição de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para CLO e EU a 50% e 100% respectivamente em filmes de AK2.



Figura 3.52: Resultado em placa de agar na inibição de *Escherichia coli* ATCC 25922 para CLO e EU a 50% e 100% respectivamente em filmes de AK2.

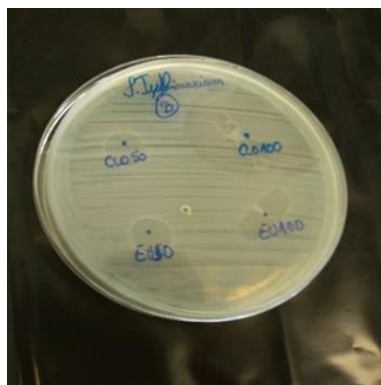


Figura 3.53: Resultado em placa de agar na inibição de *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 para CLO e EU a 50% e 100% respetivamente em filmes de AK2.

Os resultados obtidos aquando do aumento da concentração de CLO e EU demonstram que ainda que a concentração aumente, não existe capacidade de libertação dos compostos para o meio quando se passa de 10% para 50% ou 100% da concentração usada inicialmente testada em filmes AK2, será de prever ainda que mesmo não testado, o resultado seria semelhante para os outros filmes de nanocelulose, NF e AK1. Assim, pode descartar-se a possibilidade de uma baixa concentração inicial ser responsável por não existir inibição. Surgindo novamente a possibilidade alternativa de os compostos que ao estarem encapsulados no interior da matriz dos filmes, sejam incapazes de se difundir pela matriz para o meio exterior, fruto das características hidrofílicas da matriz, e do agar ser um meio sólido não facilitando a difusão por simples gradiente de concentração ou outra *driving-force* capaz de forçar a saída dos compostos para o meio exterior. Torna assim inviável por este método a formação de embalagens antimicrobianas para este tipo de nanocelulose com CLO ou EU encapsulados na matriz interna. Torna-se então necessário procurar outras alternativas, novos métodos capazes de vencer as limitações aqui encontradas. Limitações que vençam as restrições impostas pela estrutura interna dos filmes e as limitações de difusão. Para tal, outra estratégia passa pela capacidade de revestir e impregnar os filmes com os compostos ao invés de os encapsular na estrutura como o descrito por Lavoine *et al.*, (2014) que promove um revestimento de filmes de celulose microfibrilada com a molécula da cafeína no seu caso em particular, mas que pode provar ser um conceito funcional nos filmes aqui produzidos.

Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas futuras

O trabalho realizado ao longo deste ano de dissertação redundou em resultados que revelam as potencialidades na aplicabilidade da nanocelulose, mas refletem também todos os desafios ainda por responder. A produção de nanoceluloses teve como ponto de partida duas pastas de *Eucalyptus globulus* branqueadas, mas com processos de cozimento diferentes. Sendo a nanocelulose um bio-nano-material com um tremendo potencial de aplicações, o uso desta nossa matéria-prima poderá ser uma mais-valia para a indústria de pasta para papel, conjuntamente com a indústria alimentar. O tratamento químico das pastas mediado pelo radical TEMPO revelou um excelente resultado de oxidação, conseguindo-se muitos mais grupos carboxílicos revelando uma pasta altamente oxidada. A homogeneização de alta pressão da pasta oxidada resultou em géis de nanocelulose com propriedades de reologia interessantes do ponto de vista das suspensões de nanocelulose, e no seu impacto indireto no processo de formação dos filmes. Resultando em filmes consistentes, com propriedades mecânicas e de barreira nunca inferiores aos descritos por outros autores na literatura. Contudo, como aqui ficou demonstrado, resultaram em filmes com estruturas muito compactas, observado nas imagens de microscopia eletrónica, onde também o papel de secagem dos filmes é relevante para explicar as estruturas observadas. A velocidade de transmissão de vapor de água demonstra que os filmes têm boas capacidades de barreira, fruto da incorporação nos filmes de compostos antioxidantes e antimicrobianos, bem como do comportamento da matriz, muito densa e compacta. A estrutura dos filmes também é responsável diretamente pelas propriedades mecânicas exibidas pelos mesmos, revelando excelentes capacidades para aplicação em embalagens alimentares. Estes compostos bioativos demonstraram comportamentos distintos, ou seja, boa atividade antioxidante e razoável desenvolvimento nos ensaios de libertação, no entanto, os resultados de inibição de microrganismos ficaram aquém das expectativas. A nível de ensaios de libertação os filmes revelam um comportamento que aparenta ser promissor, ou seja, os filmes de facto apresentam libertação, quer em meio aquoso, quer em etanol. Contudo, fatores como a temperatura ao longo da recolha das amostras, o próprio método usado nos ensaios de libertação, quantificação por espectroscopia UV/visível, entre outras variáveis influenciaram este estudo. Por fim, os ensaios qualitativos do teste de difusão em agar para os filmes com incorporação quer do óleo essencial de cravinho-da-Índia, quer do eugenol, demonstram que não ocorreu inibição de qualquer tipo de microrganismos testados. Ainda que se tenham realizados ensaios de maneira a comprovar a eficiência dos compostos na inibição das estirpes de microrganismos aqui testadas, e que de facto comprovou a eficácia dos mesmos. Tentou-se explorar uma maior concentração de compostos usados, que tal como dito nos resultados não surtiram os efeitos desejados, muito em parte se pode explicar pela estrutura da nanocelulose ter um carácter muito fechado, que não possibilitou uma difusão dos compostos da matriz para o meio envolvente, que tal como dito anteriormente requer ser alvo de um maior estudo como referido a respeito nas conclusões de libertação.

Como perspectivas de trabalho futuro propõe-se realizar um tratamento diferente para obter nanoceluloses com características gerais diferentes, que permitam obter uma estrutura mais aberta aquando da formação dos filmes. Caracterizar as propriedades morfológicas das nanoceluloses, por *Dynamic light scattering* (DLS) e por *transmission electron microscopy* (TEM), bem como a permeabilidade ao oxigénio dos filmes. Estudar o efeito da impregnação destes compostos antioxidantes e antimicrobianos nestes filmes e em outros que venham a ser realizados somente com nanoceluloses ou misturando outras moléculas biodegradáveis e biocompatíveis. Otimizar os ensaios de libertação, de acordo com as variáveis que este trabalho permitiu perceber. Por último, testar estes filmes num modelo alimentar.

Comunicações

Comunicações em poster no âmbito da dissertação - Anexo A

Lopes, V., Sousa, S., Costa, A.P., Simões, R., Amaral, M.E:” Eugenol and Clove bud essential oil incorporated in nanocellulose to produce bioactive films: characterization, antioxidant activity and release studies.” Abstract book of XIII Annual CICS-UBI Symposium, Universidade da Beira Interior, 2018.

Comunicação oral no âmbito da dissertação - Anexo B

Lopes, V., Sousa, S., Costa, A.P., Simões, R., Amaral, M.E:” Production and characterization of nanocellulose-based bioactive films by incorporation of an essential oil and its main compound.” Abstract book of 3rd Symposium of FibEnTech-UBI: Fiber Materials and Environmental Technologies, Universidade da Beira Interior, 2018.

Referências Bibliográficas

Abraham, E., Deepa, B., Pothan, L. A., Jacob, M., Thomas, S., Cvelbar, U., & Anandjiwala, R. (2011). Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: A novel approach. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1468-1475. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.034>

Araki, J., Wada, M., Kuga, S., & Okano, T. (1998). Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 142(1), 75-82. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00404-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00404-X)

Arvanitoyannis, I. S., & Bosnea, L. A. (2001). Recycling of polymeric materials used for food packaging: Current status and perspectives. *Food Reviews International*, 17(3), 291-346. <https://doi.org/10.1081/FRI-100104703>

Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>

Aulin, C., Ahok, S., Josefsson, P., Nishino, T., Hirose, Y., Österberg, M., & Wågberg, L. (2009). Nanoscale cellulose films with different crystallinities and mesostructures - Their surface properties and interaction with water. *Langmuir*, 25(13), 7675-7685. <https://doi.org/10.1021/la900323n>

Azeredo, H. M. C., Mattoso, L. H. C., Avena-Bustillos, R. J., Filho, G. C., Munford, M. L., Wood, D., & McHugh, T. H. (2010). Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *Journal of Food Science*, 75(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01386.x>

Azeredo, H. M. C., Rosa, M. F., & Mattoso, L. H. C. (2017). Nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Industrial Crops and Products*, 97, 664-671. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.013>

Bajpai, P. (2017). Preparation and Properties of Nanocellulose Films. *Pulp and Paper Industry*, 69-81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811101-7.00005-8>

Barbash, V. A., Yaschenko, O. V., Alushkin, S. V., Kondratyuk, A. S., Posudievsky, O. Y., & Koshechko, V. G. (2016). The Effect of Mechanochemical Treatment of the Cellulose on Characteristics of Nanocellulose Films. *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 16-23. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1632-1>

Beheshti-Tabar, I., Zhang, X., Youngblood, J. P., & Mosier, N. S. (2017). Production of cellulose nanofibers using phenolic enhanced surface oxidation. *Carbohydrate Polymers*, 174, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.058>

- Benhamou, K., Dufresne, A., Magnin, A., Mortha, G., & Kaddami, H. (2014). Control of size and viscoelastic properties of nanofibrillated cellulose from palm tree by varying the TEMPO-mediated oxidation time. *Carbohydrate Polymers*, 99, 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.032>
- Bettaieb, F., Nechyporchuk, O., Khiari, R., Mhenni, M. F., Dufresne, A., & Belgacem, M. N. (2015). Effect of the oxidation treatment on the production of cellulose nanofiber suspensions from *Posidonia oceanica*: The rheological aspect. *Carbohydrate Polymers*, 134, 664-672. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.091>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Boufi, S., & Chaker, A. (2016). Easy production of cellulose nanofibrils from corn stalk by a conventional high speed blender. *Industrial Crops and Products*, 93, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.030>
- Bras, J., Hassan, M. L., Bruzesse, C., Hassan, E. A., El-Wakil, N. A., & Dufresne, A. (2010). Mechanical, barrier, and biodegradability properties of bagasse cellulose whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.018>
- Byun, Y., Kim, Y. T., & Whiteside, S. (2010). Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.005>
- Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2012). Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 175-184. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.07.007>
- Chen, H., Zhang, Y., & Zhong, Q. (2014). Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food Engineering*, 144, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.07.021>
- Comissão Europeia. (2009). Regulamento (UE) N° 450/2009. *Jornal Oficial Da União Europeia*.
- Cozzolino, C. A., Nilsson, F., Iotti, M., Sacchi, B., Piga, A., & Farris, S. (2013). Exploiting the nano-sized features of microfibrillated cellulose (MFC) for the development of controlled-release packaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.046>

Cruz-Vega, D., Verde-Star, M. J., Salinas-Gonzalez, N. R., Rosales-Hernandez, B., Estrada-Garcia, I., Mendez-Aragon, P., ... Castro-Garza, J. (2009). Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza radix and its bioactive compounds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 22(April 2008), 557-559. <https://doi.org/10.1002/ptr>

Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025>

Dhoot, G., Auras, R., Rubino, M., Dolan, K., & Soto-Valdez, H. (2009). Determination of eugenol diffusion through LLDPE using FTIR-ATR flow cell and HPLC techniques. *Polymer*, 50(6), 1470-1482. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.01.026>

Dufresne, A. (2013). Nanocellulose: A new ageless bionanomaterial. *Materials Today*, 16(6), 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.004>

Eichhorn, S. J., Dufresne, A., Aranguren, M., Marcovich, N. E., Capadona, J. R., Rowan, S. J., ... Peijs, T. (2010). Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of Materials Science (Vol. 45)*. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3874-0>

Faradilla, R. H. F., Lee, G., Arns, J. Y., Roberts, J., Martens, P., Stenzel, M. H., & Arcot, J. (2017). Characteristics of a free-standing film from banana pseudostem nanocellulose generated from TEMPO-mediated oxidation. *Carbohydrate Polymers*, 174, 1156-1163. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.025>

Ferrer, A., Pal, L., & Hubbe, M. (2017). Nanocellulose in packaging: Advances in barrier layer technologies. *Industrial Crops and Products*, 95, 574-582. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.012>

Foster, E. J., Moon, R. J., Agarwal, U. P., Bortner, M. J., Bras, J., Camarero-Espinosa, S., ... Youngblood, J. (2018). Current characterization methods for cellulose nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 47(8), 2609-2679. <https://doi.org/10.1039/c6cs00895j>

G.G. Buonocore, M.A. Del Nobile, A. Panizza, S. Bove, G. Battaglia, L. N. (1998). Modeling the Lysozyme Release Kinetics from Antimicrobial Films. *Journal of Food Science*, 68(4), 1365-1370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09651.x>

Gamelas, J. A. F., Pedrosa, J., Lourenço, A. F., Mutjé, P., González, I., Chinga-Carrasco, G., ... Ferreira, P. J. T. (2015). On the morphology of cellulose nanofibrils obtained by TEMPO-

mediated oxidation and mechanical treatment. *Micron*, 72, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2015.02.003>

Geueke, B., Groh, K., & Muncke, J. (2018). Food packaging in the circular economy: Overview of chemical safety aspects for commonly used materials. *Journal of Cleaner Production*, 193, 491-505. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.005>

González, I., Oliver-Ortega, H., Tarrés, Q., Delgado-Aguilar, M., Mutjé, P., & Andreu, D. (2017). Immobilization of antimicrobial peptides onto cellulose nanopaper. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 741-748. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.094>

Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., & Galotto, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>

Gul, O., Saricaoglu, F. T., Besir, A., Atalar, I., & Yazici, F. (2018). Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41(August 2017), 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.011>

Habibi, Y. (2014). Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. *Chemical Society Reviews*, 43(5), 1519-1542. <https://doi.org/10.1039/c3cs60204d>

Henriksson, M., Berglund, L. A., Isaksson, P., Lindström, T., & Nishino, T. (2008). Cellulose nanopaper structures of high toughness. *Biomacromolecules*, 9(6), 1579-1585. <https://doi.org/10.1021/bm800038n>

Herrick, F., Casebier, R., Hamilton, J., & Sandberg, K. (1983). Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility.

Hill, L. E., Gomes, C., & Taylor, T. M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.011>

Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., & Isogai, A. (2010). Water dispersion of cellulose II nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of mercerized cellulose at pH 4.8. *Cellulose*, 17(2), 279-288. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9381-2>

Hubbe, M. A., Ferrer, A., Tyagi, P., Yin, Y., Salas, C., Pal, L., & Rojas, O. J. (2017). Nanocellulose in thin films, coatings, and plies for packaging applications: A review. *BioResources*, 12(1), 2143-2233. <https://doi.org/10.15376/biores.12.1.2143-2233>

Isogai, A. (2013). Wood nanocelluloses: Fundamentals and applications as new bio-based nanomaterials. *Journal of Wood Science*, 59(6), 449-459. <https://doi.org/10.1007/s10086-013-1365-z>

Isogai, A., Saito, T., & Fukuzumi, H. (2011). TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale*, 3(1), 71-85. <https://doi.org/10.1039/C0NR00583E>

Johansson, C., Bras, J., Mondragon, I., Nechita, P., Plackett, D., Šimon, P., ... Aucejo, S. (2012). Renewable fibers and bio-based materials for packaging applications - A review of recent developments. *BioResources*, 7(2), 2506-2552. <https://doi.org/10.15376/biores.7.2.2506-2552>

Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749-1755. <https://doi.org/10.1086/647952>

Khiari, R. (2017). Valorization of agricultural residues for cellulose nanofibrils production and their use in nanocomposite manufacturing. *International Journal of Polymer Science*, 2017(ii). <https://doi.org/10.1155/2017/6361245>

Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., & Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(24), 5438-5466. <https://doi.org/10.1002/anie.201001273>

Kolakovic, R., Peltonen, L., Laukkanen, A., Hellman, M., Laaksonen, P., Linder, M. B., ... Laaksonen, T. (2013). Evaluation of drug interactions with nanofibrillar cellulose. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3 PART B), 1238-1244. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.05.015>

Kumar, V., Bollström, R., Yang, A., Chen, Q., Chen, G., Salminen, P., ... Toivakka, M. (2014). Comparison of nano- and microfibrillated cellulose films. *Cellulose*, 21(5), 3443-3456. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0357-5>

Lavoine, N., Desloges, I., & Bras, J. (2014). Microfibrillated cellulose coatings as new release systems for active packaging. *Carbohydrate Polymers*, 103(1), 528-537. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.035>

- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., & Bras, J. (2012). Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 735-764. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026>
- Lavoine, N., Guillard, V., Desloges, I., Gontard, N., & Bras, J. (2016). Active bio-based food-packaging: Diffusion and release of active substances through and from cellulose nanofiber coating toward food-packaging design. *Carbohydrate Polymers*, 149, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.048>
- Lee, J. H., Jang, M., Seo, J., & Kim, G. H. (2011). Evaluation For Antibacterial Effects Of Volatile Flavors From Chrysanthemum Indicum Against Food-Borne Pathogens And Food Spoilage Bacteria. *Journal of Food Safety*, 31(1), 140-148. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2010.00277.x>
- Libretexst. (2013). Infrared spectroscopy absorption table. Sonoma State University Saves Students Hard Cash with the Libretexst, 1-7. Retrieved from https://chem.libretexst.org/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table
- Luo, X., & Wang, X. (2017). Preparation and characterization of nanocellulose fibers from NaOH/urea pretreatment of oil palm fibers. *BioResources*, 12(3), 5826-5837. <https://doi.org/10.15376/biores.12.3.5826-5837>
- Meng, Q., Fu, S., & Lucia, L. A. (2016). The role of heteropolysaccharides in developing oxidized cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*, 144, 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.058>
- Moberg, T., Sahlin, K., Yao, K., Geng, S., Westman, G., Zhou, Q., ... Rigdahl, M. (2017). Rheological properties of nanocellulose suspensions: effects of fibril/particle dimensions and surface characteristics. *Cellulose*, 24(6), 2499-2510. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1283-0>
- Moraes, A. R. F. e, Eduardo, L., Gouveia, R., Fátima, N. De, Soares, F., Maciel, M., ... Conceição, J. (2007). Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga Development and evaluation of antimicrobial film on butter conservation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27, 33-36. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000500006>
- Mulla, M., Ahmed, J., Al-Attar, H., Castro-Aguirre, E., Arfat, Y. A., & Auras, R. (2017). Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. *Food Control*, 73, 663-671. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.018>

Nechyporchuk, O., Belgacem, M. N., & Bras, J. (2015). Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products*, 93, 2-25. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.016>

Nechyporchuk, O., Belgacem, M. N., & Pignon, F. (2016). Current Progress in Rheology of Cellulose Nanofibril Suspensions. *Biomacromolecules*, 17(7), 2311-2320. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00668>

Pääkko, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykänen, A., Ahola, S., Österberg, M., ... Lindström, T. (2007). Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules*, 8(6), 1934-1941. <https://doi.org/10.1021/bm061215p>

Padberg, J., Gliese, T., & Bauer, W. (2016). The influence of fibrillation on the oxygen barrier properties of films from microfibrillated cellulose. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 31(4). <https://doi.org/10.3183/NPPRJ-2016-31-04-p548-560>

Piletti, R., Bugiereck, A. M., Pereira, A. T., Gussati, E., Dal Magro, J., Mello, J. M. M., ... Fiori, M. A. (2017). Microencapsulation of eugenol molecules by β -cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. *Materials Science and Engineering C*, 75, 259-271. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.075>

Proença da Cunha, A., Roque, O. R., & Nogueira, M. T. (2012). *Plantas aromáticas e óleos essenciais - composição e aplicações* (Fundação C). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Roman, M., & Winter, W. T. (2004). Effect of sulphate groups from sulphuric acid hydrolysis on the thermal degradation behaviour of bacterial cellulose. *Biomacromolecules*, (5), 1671-1677. <https://doi.org/10.1021/BM034519+>

Saito, T., Hirota, M., Tamura, N., Kimura, S., Fukuzumi, H., Heux, L., & Isogai, A. (2009). Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils achieved by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst, (Figure 1), 1992-1996.

Saito, T., & Isogai, A. (2006). Introduction of aldehyde groups on surfaces of native cellulose fibers by TEMPO-mediated oxidation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 289(1-3), 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.04.038>

Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y., & Isogai, A. (2007). Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, 8(8), 2485-2491. <https://doi.org/10.1021/bm0703970>

- Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H.-G. (2014). Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 625-644. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.599504>
- Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639-644. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.013>
- Siqueira, G., Bras, J., & Dufresne, A. (2009). Cellulose whiskers versus microfibrils: Influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites. *Biomacromolecules*, 10, 425-432. <https://doi.org/10.1021/bm801193d>
- Siqueira, G., Bras, J., & Dufresne, A. (2010). Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. *Polymers*, 2(4), 728-765. <https://doi.org/10.3390/polym2040728>
- Siqueira, G., Tapin-Lingua, S., Bras, J., da Silva Perez, D., & Dufresne, A. (2011). Mechanical properties of natural rubber nanocomposites reinforced with cellulosic nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers. *Cellulose*, 18(1), 57-65. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9463-1>
- Siró, I., & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review. *Cellulose*, 17(3), 459-494. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9405-y>
- Smith, D. K., Bampton, R. F., & Alexander, W. J. (1963). New solvents for evaluating chemical cellulose for the viscose process, 2(1), 57-62.
- Spence, K. L., Venditti, R. A., Rojas, O. J., Habibi, Y., & Pawlak, J. J. (2011). A comparative study of energy consumption and physical properties of microfibrillated cellulose produced by different processing methods. *Cellulose*, 18(4), 1097-1111. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9533-z>
- Spoljaric, S., Salminen, A., Luong, N. D., & Seppälä, J. (2015). Ductile nanocellulose-based films with high stretchability and tear resistance. *European Polymer Journal*, 69, 328-340. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.06.019>
- Sun, X., Wu, Q., Zhang, X., Ren, S., Lei, T., Li, W., ... Zhang, Q. (2018). Nanocellulose films with combined cellulose nanofibers and nanocrystals: tailored thermal, optical and mechanical properties. *Cellulose*, 25(2), 1103-1115. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1627-9>

Svoboda, K., Brooker, J. D., & Zrustova, J. (2006). Antibacterial and Antioxidant Properties of Essential Oils : Their Potential Applications in the Food Industries, 35-43.

Tammelin, T., & Vartiainen, J. (2014). Nanocellulose Films and Barriers. Handbook of Green Materials, 213-229. https://doi.org/10.1142/9789814566469_0044

Tang, X. Z., Kumar, P., Alavi, S., & Sandeep, K. P. (2012). Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 52(5), 426-442. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500508>

Taniguchi, T., & Okamura, K. (1998). New films produced from microfibrillated natural fibres. Polymer International, 47(3), 291-294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0126\(199811\)47:3<291::AID-PI11>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0126(199811)47:3<291::AID-PI11>3.0.CO;2-1)

Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. Trends in Food Science and Technology, 14(3), 71-78. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)

Turback, A., Snyder, F., & Sandberg, K. (1985). Micro-fibrillated cellulose and process for producing it, (N°: CH 648071 (A5)).

Valdés, A., Mellinas, A. C., Ramos, M., Garrigós, M. C., & Jiménez, A. (2014). Natural additives and agricultural wastes in biopolymer formulations for food packaging. Frontiers in Chemistry, 2(February), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00006>

Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R. K., & Kumar, A. (2015). Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55(10), 1320-1323. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.692127>

Willey, Joanne M; Sherwood, L. M. (2006). Prescott,Harley, and Klein's Microbiology Seventh Edition.

Zimmermann, T., Bordeanu, N., & Strub, E. (2010). Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. Carbohydrate Polymers, 79(4), 1086-1093. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.045>

Anexos

Anexos A - Apresentação de poster



5th and 6th July



XIII Annual CICS-UBI Symposium

Eugenol and Clove bud essential oil incorporated in nanocellulose to produce bioactive films: characterization, antioxidant activity and release studies.

Lopes, V.^{1 (*)}, Sousa, S.², Costa, A.P.^{1,2}, Simões, R.^{1,2}, Amaral, M.E.^{1,2},

¹ Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

² FibEnTech-Research Unit of Fiber Materials and Environmental Technologies, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

(*)Email: vasco.peraboa@gmail.com

ABSTRACT

The need to produce new products is increasing nowadays with consumers demand for clean and biodegradable materials, one of such is nanocellulose. These materials can be produced from a multitude of sustainable resources making it a choice for the scientific community due to its interesting properties. In the present study, nanocellulose incorporated with clove essential oil (CLO) or its main eugenol compound (EU) will be investigated, in order to evaluate its potential for bioactive packaging application. Nanocellulose was produced using a chemical treatment (NaClO/NaBr/TEMPO oxidation) with successive high-shear mechanical treatment, from different pulps. These ones are named as NF for a sulphite pulp and AK1 and AK2, for kraft pulp with different passes in homogenizer equipment. The effect of TEMPO oxidation in pulp quality was evaluated by pulp viscosity and carboxylic groups content. The percentage of fibrillation of nanocelluloses gels was measured and AK1 reveals the highest value. Blends of nanocellulose and CLO or EU were used to produced films and FTIR analysis, antioxidant activity and release profiles were studied. FTIR spectra showed the characteristic bands corresponding to these compounds. For antioxidant activity, the highest value was obtained for AK1 with EU compound proving its potential to produced bioactive films. Analysis on release studies were conducted to observe the samples behaviour over time; these essays were performed in ethanol and the best release profiles were obtained in AK1 sample for CLO.

Keywords: nanocellulose; essential oils; TEMPO-mediated oxidation; antioxidant activity; release profiles.

Preference for communication: poster

Anexos B - Comunicação oral

Production and characterization of nanocellulose-based bioactive films by incorporation of an essential oil and its main compound

Lopes, V.^{1 (*)}, Sousa, S.², Costa, A.P.^{1,2}, Simões, R.^{1,2}, Amaral, M.E.^{1,2}

¹ Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

² FibEnTech-Research Unit of Fiber Materials and Environmental Technologies, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

Abstract

In the present study, nanocellulose was produced to prepare nanocellulose films incorporating clove essential oil (CLO) or its main eugenol compound (EU), for potential application as bioactive packaging. Bleached eucalyptus pulps, one from an acid process (sulphite) and the other from an alkali process (Kraft), were used to obtain nanocellulose by using a chemical treatment (NaClO/NaBr/TEMPO oxidation) followed by and a high-shear mechanical treatment. The pulps were characterized in terms of pulp viscosity and carboxylic groups content, before and after TEMPO-oxidation treatment. These pulps were submitted to different conditions in the homogenizer equipment and the resulting samples, nanocelluloses gels, are named NF for the sulphite pulp, and AK1 and AK2 for the kraft pulp. Nanocelluloses characterization resulted in a yield of fibrillation of 96% as the highest value in AK1, 90% for Ak2 and 88% for NF. The zeta potential measurements were done showing that NF was the most oxidized pulp with a value of -1757 mV with Ak1 with -1271 mV and Ak2 with -1638 mV all at pH ≈ 6. Blends of nanocellulose and CLO or EU were used to produce films by using the casting method. FTIR spectra of the produced films showed the characteristic bands of the essential oils corroborating their presence on the samples. SEM analysis in surface and cross section of the films with and without CLO and EU compounds were done in order to study the nanostructured morphology. Some mechanical properties and water vapor transmission rate (WVTR) were also measured in the films. For tensile strength and elastic modulus AK1 with EU appears to be the best with 3231.31 ± 305.87 N/m and 6592.19 ± 510.10 MPa, respectively. For elongation at break, it was observed that NF with CLO achieves the highest value, i.e., 5.21 ± 0.59 %. The NF with EU exhibited the highest value of WVTR, while AK1 with EU shows the lowest value.

Keywords: nanocellulose; essential oils; TEMPO-mediated oxidation; nanocellulose characterization.

Preference for communication: Oral presentation