



# **Desenvolvimento de laminados de celulose/zeína para embalagem alimentar**

**Miguel Ângelo Lima Pinto**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Biotecnologia**  
(2.º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Maria Matos Ramos  
Co-orientadores: Prof.<sup>a</sup> Doutora Fernanda da Conceição Domingues  
Doutor Ângelo Filipe Santos Luís

**setembro de 2020**



# Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à Professora Doutora Ana Ramos, minha orientadora, pela total disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência e pelo valioso contributo na elaboração desta dissertação. Agradeço, também, a oportunidade que me deu de integrar o seu grupo de investigação.

À co-orientadora e Diretora do 2º Ciclo do Curso de Biotecnologia Professora Doutora Fernanda Domingues, por tornar possível o desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio prestado.

Ao co-orientador Doutor Ângelo Luís, agradeço por toda a sua disponibilidade e incentivo, e pelo apoio e orientação prestada na elaboração deste trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas dos Centros de Investigação Fiber Materials and Environment Technologies (FibEnTech) e Ciências da Saúde (CICS).

À Doutora Paula Gomes, do Centro de Ótica da Universidade da Beira Interior, pelo tempo disponibilizado para a realização dos ensaios de SEM, DSC.

Gostaria também de agradecer ao Instituto de Investigação da Floresta e Papel (Eixo, Aveiro, Portugal) RAIZ, em particular ao Doutor Miguel Coelho, pelas medições da permeabilidade ao oxigénio.

A todas as pessoas fantásticas que tive o prazer de conhecer na Covilhã, especialmente a Maria Inês e Mafalda que sempre me apoiaram e aturaram em todos os momentos.

Aos meus amigos, Nuno, Mariana, Margarida, Garcia, Margarido, Tomás, Zezé, André, Samuel, Inês, António, pela amizade, paciência e apoio.

À minha namorada, Patricia, por todo o incentivo, companheirismo, carinho, durante esta etapa da minha vida. Quero agradecer-te por sempre acreditares nas minhas capacidades e por todo o amor e dedicação.

Não poderia deixar de agradecer à minha família por todo o apoio e força, mas gostaria de agradecer em especial à minha mãe que sempre me encorajou a lutar e nunca desistir, fazendo todos os esforços possíveis e impossíveis para me permitir seguir os meus sonhos.



## Resumo

Com o aumento da consciencialização da população em geral relativamente aos problemas ambientais causados pelo uso exagerado dos derivados do petróleo, como é o caso dos plásticos nas embalagens alimentares, nos últimos anos têm-se procurado materiais naturais como uma alternativa ecológica e que garanta a segurança alimentar. A utilização de biopolímeros na produção de embalagens alimentares tem sido amplamente estudada, por estes materiais serem de origem natural e apresentarem uma elevada biodegradabilidade. Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de laminados de celulose/zeína para embalagem alimentar. Numa fase inicial estudou-se a composição e propriedades antioxidantes e antibacterianas do óleo essencial de cipreste (OC) com a finalidade de o incorporar em filmes à base de zeína. Foram produzidos dois tipos de filmes zeína, o filme controlo (FC) contendo zeína, glicerol (GLY) e ácido oleico (AO), e o filme com óleo essencial de cipreste (FOC), com a restante composição idêntica ao FC. Posteriormente foram produzidos os laminados, usando papel e os filmes preparados anteriormente e recorrendo a uma técnica de moldagem por compressão em condições pré-definidas. Os filmes, papel e laminados, foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas, óticas, térmicas, barreira e atividades antioxidante e antibacteriana. Quanto às propriedades antibacterianas, os filmes e laminados com OC, FOC e LFOC, respetivamente, apresentaram os melhores resultados, inibindo o crescimento de todas as bactérias utilizadas (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Escherichia coli* ATCC 25922). Quanto as propriedades antioxidantes, mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e oxigénio, os LFOC apresentaram os melhores resultados comparativamente ao controlo. A incorporação do OC aumentou a resistência térmica dos filmes e laminados e melhorou a sua microestrutura, proporcionando homogeneidade comparativamente aos respetivos controlos. Na globalidade, os LFOC apresentaram melhores propriedades como material de embalagem.

## Palavras-chave

Celulose; Embalagens alimentares; Filmes; Laminados; Óleo essencial de cipreste; Zeína.



# Abstract

With the increasing awareness of the general human population concerning the environmental problems caused for the exaggerated use of oil derivatives, such as the plastics used in food packaging, the last years have been about searching for natural materials that can be an ecological alternative without compromising food safety. The use of biopolymers in the manufacturing of food packages has been widely studied because these materials have a natural origin and present an elevated biodegradability. The main goal of this work was the development of cellulose laminates/zein for food packaging. In a preliminary phase, the composition and the antioxidant and antibacterial properties of cypress essential oil (OC) were studied for the purpose of incorporating the essential oil in zein based films. Then were produced two types of zein films, the control film (FC) containing zein, glycerol (GLY) and oleic acid (AO), and the film with the cypress essential oil (FOC) which has the remaining composition identical to FC. Posteriorly, the laminates were produced, using paper and the films previously prepared and using a compression molding technique in pre-established conditions. The films, paper, and laminates were characterized for their mechanical, optic, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. As for the antibacterial properties, the films and the laminates with OC, FOC and LFOC, respectively, show the best results, inhibiting the growth of every bacteria used in this study (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Escherichia coli* ATCC 25922). As for the antioxidant and mechanical properties, water vapor and oxygen permeability, the LFOC presented the best results comparing with the control. The incorporation of OC increased the thermal resistance of films and laminates and improved their microstructure, providing homogeneity comparatively to control. Globally, the LFOC presented the best properties as packaging material.

## Keywords

Cellulose; Food packaging; Films; Laminates; cypress essential oil; Zein.



# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo.....	v
Abstract .....	vii
Índice.....	ix
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas .....	xv
Lista de Acrónimos .....	xvii
Capítulo 1 - Introdução geral .....	1
Capítulo 2 - Propriedades das embalagens alimentares .....	4
2.1 Embalagens alimentares .....	4
2.2 Propriedades barreira e a transferência de massa na embalagem .....	4
2.2.1 Permeabilidade .....	5
2.2.2 Difusão .....	7
2.2.3 Solubilidade .....	8
2.3 Propriedades mecânicas.....	9
2.3.1 Resistência à tração.....	9
2.3.2 Alongamento.....	9
2.3.3 Módulo de Young.....	10
2.4 Propriedades óticas e de superfície .....	10
2.4.1 Transparência.....	10
2.4.2 Cor .....	10
2.4.3 Energia de superfície .....	11
2.5 Propriedades antimicrobianas e antioxidantes .....	12
Capítulo 3 – Materiais biodegradáveis para embalagens alimentares .....	15
3.1 Biopolímeros naturais .....	15
3.1.1 Proteínas .....	15
3.1.2 Polissacáridos.....	16
3.1.3 Lípidos .....	17
3.2 Filmes de zeína .....	17
3.2.1 Descrição química da zeína .....	17
3.2.2 Solventes para a zeína .....	18
3.2.3 Plastificantes para a zeína .....	19

3.2.4 Aplicações da zeína .....	20
3.3 Laminados de biopolímeros.....	20
Capítulo 4 – Óleos essenciais .....	22
4.1. Óleo essencial de cipreste .....	22
Capítulo 5 - Materiais e Métodos.....	24
5.1 Reagentes.....	24
5.2. Óleo essencial de cipreste: obtenção e análise da composição química .....	24
5.2.1. Avaliação da atividade antioxidante .....	24
5.2.1.1. Ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH .....	24
5.2.1.2. Teste de branqueamento do $\beta$ -caroteno .....	25
5.2.3. Avaliação das propriedades antibacterianas .....	26
5.2.3.1. Ensaio de difusão em agar .....	26
5.2.3.2. Determinação dos valores da concentração mínima inibitória: método da resazurina .....	26
5.3. Preparação dos filmes de zeína e laminados.....	27
5.3.1. Filmes de zeína .....	27
5.3.2. Preparação dos laminados .....	27
5.4. Caracterização dos filmes e laminados.....	28
5.4.1. Espessura e gramagem .....	28
5.4.2. Propriedades mecânicas.....	28
5.4.3. Hidrofobicidade .....	29
5.4.4. Propriedades óticas .....	29
5.4.5. Permeabilidade ao vapor de água .....	29
5.4.6. Permeabilidade ao oxigênio .....	30
5.4.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	30
5.4.8. Microestrutura dos filmes e laminados.....	30
5.4.9. Calorimetria diferencial de varrimento.....	31
5.4.10. Atividade antioxidante .....	31
5.4.11. Propriedades antimicrobianas.....	31
Capítulo 6 – Resultados e Discussão .....	32
6.1 Caracterização do óleo essencial de cipreste .....	32
6.1.1 Análise química do óleo essencial de cipreste .....	32
6.1.2 Análise das propriedades antioxidantes do óleo essencial de cipreste .....	34
6.1.3 Análise das propriedades antimicrobianas do óleo essencial de cipreste.....	35
6.2 Caracterização do papel, filmes e laminados .....	36

6.2.1 Análise da microestrutura .....	36
6.2.2 Propriedades térmicas.....	38
6.2.3 Análise FTIR .....	40
6.2.4 Propriedades estruturais e mecânicas.....	42
6.2.5 Propriedades de barreira.....	44
6.2.5.1 Permeabilidade ao vapor de água .....	44
6.2.5.2 Permeabilidade ao oxigênio .....	45
6.2.6 Propriedade óticas .....	46
6.2.7 Propriedades de superfície .....	47
6.2.8. Propriedades antioxidantes .....	49
6.2.9. Propriedades antimicrobianas.....	50
Capítulo 7 – Conclusões e Perspetivas Futuras .....	53
Capítulo 8 -Referências bibliográficas.....	56



# Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração da 1. <sup>a</sup> lei de Fick (adaptado de [42]).	7
Figura 2: Exemplo de gráfico de uma curva tensão-deformação (adaptado de [52]).	9
Figura 3: Exemplo de um material sob tensão, (a) antes da aplicação da força, (b) após aplicação da força, (c) rutura devido à força aplicada (adaptado de [52]).	10
Figura 4: Valores de ângulo de contacto versus tipos de superfície ( figura adaptada de [60]).	11
Figura 5: Biopolímeros (adaptado de [7]).	15
Figura 6: Diagrama de fase ternária para a solubilidade da zeína em etanol e água (adaptada de [78]).	19
Figura 7: Imagens SEM da secção transversal dos filmes, laminados e papel.	37
Figura 8: Curvas DSC da zeína, OC, AO, GLY.	38
Figura 9 Curvas DSC dos filmes, laminados e papel	39
Figura 10: Análise FTIR dos filmes, laminados e papel.	41
Figura 11: Gráfico das cores no sistema CIELAB do papel, filmes e laminados.	46
Figura 12: Aparência dos filmes, laminados e papel.	47
Figura 13: Atividade antioxidante do papel, filmes e laminados medida pelo ensaio de sequestração de DPPH.	49
Figura 14: Atividade antioxidante do papel, filmes e laminados medida pelo ensaio do branqueamento do $\beta$ -caroteno.	50
Figura 15: Testes de difusão em meio sólido para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes e laminados (1-papel; 2-FC; 3-FOC; 4-LFC; 5-LFOC) (S. aureus (S.A.); L. monocytogenes (L.M.); E. faecalis (E.F.); B. cereus (B.C.); E. coli (E.C); S. Typhimurium (S.T.); P. aeruginosa (P.A.)).	52



# Lista de Tabelas

Tabela 1 Distribuição das frações proteicas do milho (% base seca) (adaptado de [78]).	18
Tabela 2 Análise química do óleo essencial de cipreste	33
Tabela 3 Propriedades antioxidantes do óleo essencial de cipreste (média ± desvio-padrão).	35
Tabela 4 Análise antimicrobiana do óleo essencial de cipreste pela medição dos halos de inibição (média ± desvio-padrão).	35
Tabela 5 Análise antimicrobiana do óleo essencial de cipreste (método da resazurina)	36
Tabela 6 - Gramagem, espessura e propriedades mecânicas das amostras (média ± desvio-padrão).	42
Tabela 7 Propriedades barreira dos filmes e laminados (média ± desvio-padrão).	44
Tabela 8 Transparência dos filmes, laminados e papel (média ± desvio-padrão).	46
Tabela 9 Propriedades de superfície (FS- face superior, FI- face inferior) (média ± desvio-padrão).	48
Tabela 10 Resultados do teste de difusão em meio sólido para detectar a atividade antimicrobiana dos filmes e laminados através dos halos de inibição (média ± desvio-padrão).	51



# Lista de Acrónimos

$\Delta P_{O_2}$	Pressão parcial do oxigénio
AO	Ácido oleico
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
$A_t$	Área da secção transversal do provete
BHA	butil-hidroxianisol
BHT	butil-hidroxitolueno
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
CMI	Concentração Mínima Inibitória ( <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> )
DIM	Diiodometano
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
E	Módulo de elasticidade ou Módulo de Young
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EG	Etilenoglicol
F	Força máxima
FC	Filme controlo
FI	Face inferior
FID	Detetor de ionização de chama
FOC	Filme c/óleo essencial de cipreste
FS	Face superior
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
G	Gramagem
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa
GLY	Glicerol
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i> ou Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos
IAA	Índice de Atividade Antioxidante
IT	Índice de tração
LFC	Laminado com filme controlo
LFOC	Laminado com filme c/óleo essencial de cipreste
MHA	<i>Müller-Hinton agar</i>
MHB	<i>Müller-Hinton broth</i>
MSD	Detetor espectrométrico de massas
NaCl	Cloreto de sódio
OC	Óleo essencial de cipreste
OE	Óleos essenciais

OP	Permeabilidade ao oxigénio
OTR	Taxa de transmissão de oxigénio
PCL	Policaprolactona
PE	Polietileno
PET	Polietileno tereftalato
PHA	Polihidroxialcanoatos
PLA	Ácido poliláctico
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Policloreto de vinilo
RAIZ	Instituto de investigação da Floresta e do Papel
RH	Humidade Relativa
S	Resistência à tração
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
TBHQ	<i>tert</i> -butil-hidroquinona
Tg	Temperatura de transição vítrea da zeína
TIC	<i>Total ion chromatogram</i>
UFC	Unidades formadoras de colónias
WVP	Permeabilidade ao vapor de água
WVTR	Taxa de transmissão do vapor de água
$\Sigma$	Tensão de rutura
$\varepsilon$	Deformação
$\theta$	Ângulo de contacto



# Capítulo 1 - Introdução geral

A embalagem alimentar faz parte da história da humanidade e tem sofrido grandes desenvolvimentos ao longo do tempo, sendo fundamental na proteção e no acondicionamento dos produtos embalados, devendo garantir a qualidade e segurança dos mesmos [1,2].

Uma embalagem alimentar pode ser produzida a partir de diferentes tipos de materiais, nomeadamente, vidro, metal, papel ou cartão, madeira, têxteis, plástico e mais recentemente biopolímeros [2].

As excelentes propriedades do plástico, nomeadamente, a facilidade de processamento, flexibilidade, transparência e desempenho de barreira, fazem deste material um dos materiais mais populares na área da embalagem alimentar [3]. A indústria de embalagens é, efetivamente, um grande consumidor da produção global de plástico, onde a embalagem de alimentos é uma área de aplicação particularmente importante [4]. Contudo, fenómenos de migração de compostos químicos para os alimentos embalados podem provocar alterações organoléticas e produzir efeitos nocivos para o ser humano [2,5]. Acresce a este problema a questão ambiental associada ao plástico. Estas embalagens de base petrolífera causam grande poluição ambiental devido à sua baixa biodegradabilidade [6]. No final do séc. XX, início do séc. XXI, surgiram alertas para o perigo do plástico no ambiente, em particular nos oceanos, tornando-se imperativa a necessidade de aumentar a sua reciclagem e, simultaneamente, encontrar materiais alternativos, de forma a minimizar o impacto negativo destes resíduos de embalagens no meio ambiente [3,4,7].

A utilização de polímeros de origem natural, renováveis e recicláveis para aplicação em embalagens de alimentos tem surgido como um importante fator no novo paradigma de desenvolvimento ambiental [8,9].

A utilização de biopolímeros a partir de recursos naturais renováveis para substituir polímeros derivados do petróleo tem sido objeto de investigação pela comunidade científica e inúmeras soluções têm sido apresentadas como alternativa ecológica aos polímeros convencionais para aplicações em embalagens alimentares [7,10–15]. Qualquer que seja o material da embalagem, este deve evitar a degradação do alimento embalado, a qual pode comprometer a sua qualidade ou torná-lo inadequado para consumo.

Durante o período de comercialização, os alimentos podem sofrer deterioração biológica, química e física causada pelas condições ambientais. A presença de oxigénio, humidade ou luz podem desencadear certas reações responsáveis pela deterioração do produto embalado, assim, é fundamental que o material usado na produção da embalagem alimentar possua uma função protetora [1,16].

Os alimentos, mesmo protegidos dentro da embalagem, podem continuar a sofrer alterações provocadas por reações fotoquímicas, microrganismos, desnaturação de proteínas, reações de oxidação e hidrólise de gorduras, entre outras. Para combater uma necessidade do mercado por embalagens que prolonguem o tempo de prateleira dos alimentos, surgiram as embalagens ativas que além de protegerem, interagem com o produto. As embalagens ativas podem ter incorporados agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes, enzimas, captadores de oxigênio, emissores ou eliminadores de dióxido de carbono, controladores de humidade, odor e sabor, entre outros, para aumentar o tempo de prateleira dos produtos, evitando deteriorações químicas, inibindo o crescimento de microrganismos patogénicos, garantindo assim, a segurança dos alimentos [17].

Os filmes de biopolímeros podem ser formados como revestimentos de alimentos ou embalagens. Estes filmes têm potencial para serem usados como embalagens alimentares por apresentarem boas propriedades barreira à perda de humidade, protegerem os alimentos da contaminação externa e exibirem boas propriedades mecánicas, as quais garantem a integridade dos produtos durante o transporte, manuseamento e armazenamento. O bom desempenho destes materiais vai depender da composição do filme, da sua estrutura e das propriedades dos seus componentes [18,19]. Têm sido realizados muitos trabalhos de investigação com o objetivo de melhorar as propriedades mecánicas e as propriedades barreira dos filmes de biopolímeros. Métodos de reticulação química, enzimática, modificação física e laminação são algumas das propostas apresentadas [1,9,18,19].

Nenhum material biodegradável satisfaz todos os requisitos exigidos à maioria das embalagens alimentares, pelo que, a utilização de vários materiais biológicos em multicamada parece ser uma solução interessante para colmatar esta limitação [18,20,21]. A preparação de filmes em bicamada tem sido proposta como uma opção promissora para melhorar as propriedades dos mesmos [1,18].

É objetivo principal deste trabalho de investigação a obtenção de um material bilaminado, constituído por um filme de zeína e papel, ambos materiais biodegradáveis, para aplicação em embalagem alimentar. Para alcançar este objetivo foi levada a cabo uma componente experimental que abrangeu as seguintes etapas: produção e caracterização de filmes de zeína com e sem óleo essencial de cipreste (OC) e posterior desenvolvimento dos laminados através da junção de uma camada de filme e uma de papel.

Esta dissertação está estruturada em sete capítulos. No capítulo 1 é apresentada uma introdução geral, onde se inclui uma breve abordagem à questão das embalagens alimentares, abrangendo as suas funções e materiais usados, destacando-se a necessidade de substituição dos polímeros sintéticos por biopolímeros. Na parte final da introdução é também apresentado um plano geral da dissertação. No capítulo 2 são abordadas as características mais importantes das embalagens alimentares. Os materiais de embalagem, em particular os biodegradáveis, incluindo os usados neste trabalho fazem parte do capítulo 3. No capítulo 4 encontra-se uma breve descrição dos óleos essenciais e em particular do OC, utilizado neste trabalho. O capítulo 5 inclui a parte experimental da dissertação. Nesta parte pode encontrar-se um resumo dos materiais, procedimentos e equipamentos usados. O capítulo 6 abrange a exposição dos resultados, bem como a sua discussão e

comparação com outros resultados científicos publicados. Finalmente, no capítulo 7 é apresentada a conclusão com destaque dos principais outputs do trabalho de investigação desenvolvido.

# **Capítulo 2 - Propriedades das embalagens alimentares**

## **2.1 Embalagens alimentares**

A embalagem alimentar é projetada para garantir diferentes funcionalidades, entre elas o transporte, armazenamento, distribuição, venda e consumo final do produto. Deste modo, a embalagem alimentar acompanha o produto durante o seu período de vida, desde o momento em que é embalado até ser descartada, terminando, assim, as suas funções de proteção, conservação e informação, as quais asseguram a qualidade dos produtos embalados [2,22,23].

A embalagem alimentar tem como função proteger os alimentos contra danos provocados pelo transporte, armazenamento e distribuição, resultantes de vibrações, choques, impactos e compressões que podem ocorrer durante estas operações. As propriedades mecânicas garantem os requisitos de resistência exigidos à embalagem em todas estas etapas e como tal o seu controlo é fundamental [2,24].

Os danos na estrutura da embalagem podem ter diferentes origens, nomeadamente, acidentais, defeitos de produção e fraca resistência, mas também podem ocorrer danos por tentativas de abertura das embalagens. Assim, pode dizer-se que, para além do papel de proteção, a embalagem garante a segurança do produto embalado [1,2,25].

A conservação é um fator importante nas embalagens alimentares, estas devem prolongar o tempo de prateleira dos alimentos, mantendo as suas características químicas, microbiológicas, físicas e organolépticas, reduzindo, assim, possíveis perdas. As propriedades de conservação proporcionadas pela embalagem podem ser combinadas com as tecnologias de processamento dos alimentos embalados, dependendo das suas condições, se são alimentos frescos ou congelados, se passaram por um processo térmico, de desidratação ou secagem, ou se necessitam de uma atmosfera modificada. As embalagens devem responder às diferentes necessidades de cada alimento consoante as suas propriedades e o seu futuro meio de conservação. Consequentemente, deve existir uma barreira de proteção dos alimentos contra os fatores externos e internos, como a humidade, temperatura, luz e gases, como o dióxido de carbono e o oxigénio. A conjugação destes fatores pode levar um aumento do tempo de prateleira dos alimentos. Além disso, as embalagens podem também impedir a entrada de agentes patogénicos, poeiras e odores, apresentando-se com uma verdadeira barreira às trocas entre o ambiente interno e externo da embalagem [1,2,25].

## **2.2 Propriedades barreira e a transferência de massa na embalagem**

Os filmes produzidos para embalagem a partir de biopolímeros devem ter propriedades de transferência de massa adequadas à sua finalidade, descritas por três coeficientes comuns, sendo eles

a permeabilidade, difusão e solubilidade [7,26,27]. É muito importante existir um controlo da transferência de massa nas embalagens alimentares, para que a qualidade dos alimentos se mantenha [1]. Um exemplo da difusão ocorrida em embalagens é a libertação de substâncias entre os materiais que se encontram em contacto com os alimentos, a qual pode não ser observável, e em muitos casos nem mesmo com recurso a métodos analíticos. Assim, a sua identificação pode ser uma tarefa difícil [27]. A permeabilidade diz respeito a perdas significativas na qualidade dos alimentos causadas pela transferência de gases e humidade entre o interior da embalagem e o ambiente circundante [28]. Por exemplo, as batatas fritas de pacote e os frutos secos perdem a sua crocância quando expostas a um ambiente húmido [10]. As perdas de humidade em frutas e vegetais durante os processos de armazenamento podem resultar, a longo prazo, em perdas do peso e alteração do tamanho. A solubilidade pode pôr em causa todas as funções da embalagem, se ocorrer degradação da sua estrutura, fica comprometida toda a proteção do produto embalado [26,29].

Pequenas variações nas condições do ambiente das embalagens alimentares podem causar perda do conteúdo nutricional, sabor, cor, aroma e deterioração da textura do alimento embalado, o que normalmente leva a uma redução acentuada do prazo de validade do mesmo [28].

As propriedades barreira são parâmetros importantes que incluem a permeabilidade ao vapor de água (WVP) e permeabilidade aos gases, as quais são fortemente influenciadas por diversos fatores, como a natureza e composição do filme e as condições ambientais [30]. Filmes de polímeros muito polares, como é o caso do amido e proteínas, demonstram geralmente alta permeabilidade ao vapor de água, mas baixa permeabilidade aos gases [10]. Enquanto que os polímeros não polares, como os lípidos, normalmente tendem a exibir efeitos opostos [10]. A temperatura e a humidade do ambiente também podem afetar as propriedades barreira dos filmes. A permeabilidade ao vapor de água e ao oxigénio pode ser influenciada por variações de humidade relativa e da temperatura. Assim, devido a estes fatores, é necessário otimizar as propriedades barreira dos materiais biopoliméricos utilizados na produção de embalagens alimentares, tendo em consideração as características e condições de armazenamento dos produtos embalados [10].

### **2.2.1 Permeabilidade**

A permeabilidade, é uma propriedade que permite quantificar com que facilidade uma substância, gás ou vapor, consegue atravessar um material, esta é influenciada pela porosidade, espessura, temperatura, área de transferência, diferenças de pressão ou gradientes de concentração [31,32].

A permeabilidade está associada à avaliação quantitativa das propriedades barreira dos materiais. O principal mecanismo da taxa de transferência de vapor de água ou gás através de um filme é a difusão ativa [32]. A difusão depende do tamanho, forma e polaridade da substância que irá penetrar a superfície do filme, da cristalinidade do polímero, a qual confere maior resistência e densidade devido à organização das macromoléculas, grau de reticulação no filme, fenómeno conhecido por ligação cruzadas ou *crosslinking*, o qual depende do número de ligações covalentes [29,31,32].

Os gases não conseguem permear através de polímeros cristalinos, como as ligações estão mais organizadas têm menos orifícios através dos quais os gases podem passar. Nos polímeros semicristalinos, os únicos locais onde os gases conseguem permear são as regiões amorfas, por não apresentarem uma organização definida [32–34].

Para determinar a permeabilidade de um material podem ser usados os coeficientes comuns de difusão e solubilidade [26,29,31,32,35], seguindo a equação (1):

$$P = D \times S \quad (1)$$

Onde:

P- Coeficiente de permeabilidade

D- Coeficiente de difusão

S- Coeficiente de solubilidade

A permeabilidade ao vapor de água e a permeabilidade ao oxigênio fazem parte das propriedades barreira, as quais são de extrema importância, pois dão indicação da eficácia do material de embalagem na proteção dos alimentos, garantindo a qualidade e alargamento do tempo de prateleira [30,31,35,36].

Define-se permeabilidade ao vapor de água como a quantidade de água que passa através de uma unidade de área da amostra por unidade de tempo, no estado estacionário sob as condições do ensaio [30,37].

A taxa de transmissão de oxigênio (OTR) é o volume de oxigênio molecular, medido em condições normais de temperatura e pressão, que permeia através de um dado material, por unidade de área e unidade de tempo [37].

Um dos desafios na produção de filmes para embalagem alimentar está na escolha dos materiais, tais como, biopolímeros e plastificantes, que garantam as propriedades barreira adequadas ao alimento acondicionado [38,39].

Os alimentos com elevado teor de humidade tendem a perdê-la para a atmosfera, resultando na perda de peso, deterioração da textura e aparência. Pelo contrário, os alimentos com baixo teor de humidade tendem a captá-la, quando expostos a uma atmosfera rica em humidade, como acontece com a farinha e bolachas [38]. O teor de água num produto alimentar deve obedecer a certos limites, a fim de evitar a ação de microrganismos que poderão deteriorar o alimento [38]. Existem alimentos como os vegetais e frutas que necessitam de embalagens semipermeáveis devido às trocas de oxigênio e vapor de água mesmo após a colheita. Se a embalagem não permitir a troca de fluidos, pode ocorrer condensação dentro da embalagem, reduzindo o tempo de prateleira dos alimentos [30,38,39].

### 2.2.2 Difusão

A difusão consiste no processo pelo qual uma molécula é transportada de uma parte de um sistema para outra, como resultado de movimentos moleculares aleatórios [27,40,41]. A difusão química ocorre na presença de um gradiente de concentração ou, mais geralmente, na presença de um gradiente de potencial químico [27,41]. O coeficiente de difusão representa uma propriedade cinética do sistema de permeabilidade do polímero e mostra a facilidade com que uma substância se move num determinado material. O coeficiente de difusão pode ser determinado pela primeira lei de Fick (equação (2)), assente na hipótese de que a taxa de transferência da substância que se difunde através de uma área unitária de uma secção é proporcional à diferença de concentração [42,43], representado na Figura 1.

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (2)$$

Onde:

J – Taxa de transferência de massa que se difunde por unidade de área

D – Coeficiente de difusão

C – Concentração da substância

x – Distância percorrida

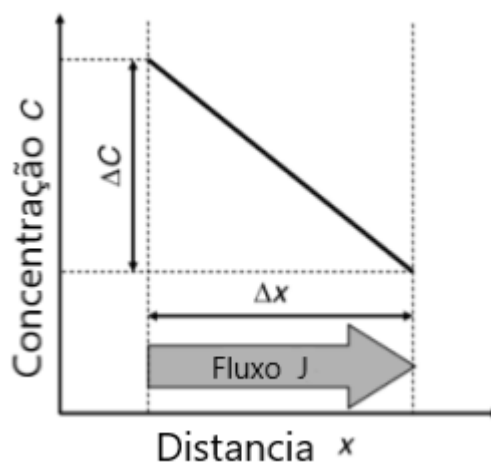


Figura 1: Ilustração da 1.<sup>a</sup> lei de Fick (adaptado de [42]).

A primeira lei de Fick só pode ser aplicada diretamente à difusão no estado estacionário, quando a concentração não varia com o tempo [43].

Os fatores que podem influenciar este processo de migração são a temperatura, as interações entre a embalagem e os alimentos, as quais dependem do tempo de contacto entre ambos e da natureza dos alimentos, como por exemplo, o elevado teor de gordura que alguns alimentos apresentam [27,41,44]. Atualmente, as substâncias utilizadas na produção de embalagens são controladas na União Europeia, e bem regulamentadas por regulamentos como UE 1935/2004/CE (CE, 2004), onde

se definem algumas regras para os materiais e objetos destinados a entrar em contacto com os alimentos [27,41]. Usando o perfil toxicológico de algumas substâncias, são impostos limites de migração com o objetivo de não colocar em risco a saúde dos consumidores [27,41,45].

O controlo da difusão de substâncias provenientes dos polímeros que compõem as embalagens alimentares é de grande importância, particularmente, quando existe a possibilidade dessas substâncias conferirem alterações nas propriedades organolépticas dos alimentos com que contactam, podendo provocar reações tóxicas aos consumidores, quando os seus valores se situam acima das concentrações permitidas [41,46].

### 2.2.3 Solubilidade

A solubilidade, em termos químicos, é frequentemente descrita pela quantidade máxima de soluto que pode ser dissolvida por quantidade de solvente a uma determinada temperatura e pressão [26,37,41].

A solubilidade ou coeficiente de solubilidade de permeantes, em filmes de embalagem, refere-se ao comportamento de partição de uma substância capaz de atravessar a superfície do polímero e o espaço livre adjacente. É uma medida da massa de moléculas de permeante absorvidas, por uma unidade de massa de polímero, por unidade de pressão parcial [26,41]. O coeficiente de solubilidade pode ser definido por uma adaptação da função de distribuição Nernst, equação (3):

$$S = \frac{c}{P} \quad (3)$$

Onde:

S - Coeficiente de solubilidade

P - Pressão de vapor do solvente

c - Concentração do solvente

O coeficiente de solubilidade pode apresentar-se independente da concentração de solvente utilizado e da pressão de vapor (ou seja, o solvente está em concentrações muito baixas), tornando-se linear a relação entre a concentração e a pressão de vapor do solvente, neste caso, S é referenciado como o coeficiente de solubilidade da lei de Henry [26]. Quando isso acontece, é calculado o coeficiente de solubilidade das isotermas de sorção (absorção e adsorção), apresentando-se como um gráfico da concentração de solvente na superfície do polímero *versus* a concentração do solvente dentro do polímero [26,41].

Algumas regras gerais sobre a solubilidade de polímeros são [47]:

- A solubilidade é favorecida pela similaridade química e estrutural entre o solvente e o polímero;
- A solubilidade dos polímeros tende a diminuir com o aumento do peso molecular.

## 2.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas são de extrema importância no que diz respeito à resistência de uma embalagem. Esta deve resistir aos diversos fatores que comprometam a sua integridade, nomeadamente, choques, vibrações, impactos e compressões. As propriedades mecânicas mais frequentemente avaliadas pela indústria de materiais de embalagem são as propriedades de tração, tais como, resistência à tração, alongamento, módulo de elasticidade (módulo de Young) e tensão de rutura [48–52].

### 2.3.1 Resistência à tração

A resistência à tração é a força (tensão) máxima que um material pode suportar ao ser tracionado antes de quebrar. Esta propriedade pode não depender só do tamanho da amostra, mas também de outros fatores, como a temperatura a que se encontra o material e a existência de defeitos na sua estrutura [24]. As propriedades de tração dependem de fatores, como, espessura da amostra, velocidade do teste, modo como a amostra é preparada e tipo de garras utilizadas na máquina [24].

Embora o teste seja destrutivo, estes ensaios são muito utilizados por serem fáceis de realizar e pela rápida obtenção de resultados, [24]. A Figura 2 representa um exemplo do resultado de um teste de tração traduzido num gráfico que apresenta a curva tensão-deformação.

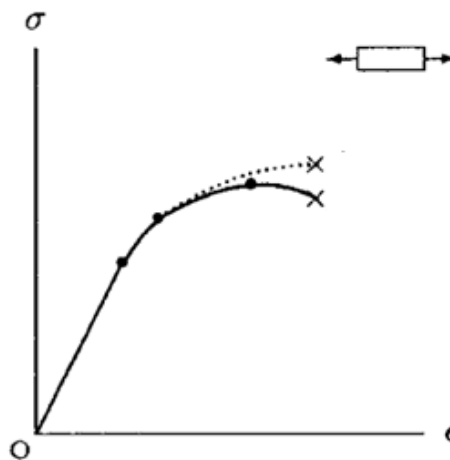


Figura 2: Exemplo de gráfico de uma curva tensão-deformação (adaptado de [52]).

### 2.3.2 Alongamento

O alongamento é o aumento do comprimento de um material quando sujeito a um ensaio de tração.

Como ilustrado na Figura 3, ao aplicar uma carga de tração a um material, este pode alongar-se na direção da carga aplicada. Quando os níveis de tensões de corte estão muito próximos do ponto de rutura, o alongamento pode ocorrer muito rapidamente e o material pode estreitar simultaneamente [52]. A área da secção transversal diminui e, embora a força necessária para continuar a deformar o material possa também diminuir, a força por unidade de área aumenta [52]. O alongamento é inversamente proporcional à resistência à tração, isto significa que quanto maior for a resistência à tração de um material menor será o seu alongamento [48,52].

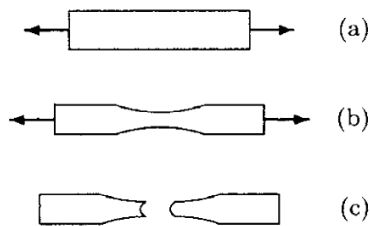


Figura 3: Exemplo de um material sob tensão, (a) antes da aplicação da força, (b) após aplicação da força, (c) rutura devido à força aplicada (adaptado de [52]).

O alongamento depende da ductilidade, um material dúctil exibe grande deformação plástica antes da rutura. Pelo contrário, um material frágil, quando submetido a uma força de tração sofre rutura sem exibir deformação plástica [52].

### 2.3.3 Módulo de Young

O módulo de Young tem origem na energia de ligação entre os átomos do material e divide os materiais em dois grandes grupos: os flexíveis e os rígidos [49]. É uma medida da rigidez do material ou da sua resistência à deformação elástica, quanto maior for o módulo de Young mais rígido é o material [48–50].

O módulo de Young é a razão entre a tensão de rutura e a deformação de um material, esta relação pode ser obtida através do declive no regime de elasticidade linear no gráfico da resistência à tração. Quando o módulo de Young é alto, significa que é necessário aplicar uma grande força sobre o material para que ele deforme, então o declive apresenta uma inclinação acentuada, se o módulo for baixo, a força necessária para deformar o material é menor, sendo a inclinação da reta menor [48–50].

A rigidez dos materiais flexíveis, como polímeros e biopolímeros, pode ser testada em tensão ou compressão, no entanto, deve ter-se em atenção que a velocidade à qual a amostra é testada tem um efeito significativo nos valores do módulo de Young calculados a partir do teste [49,51].

## 2.4 Propriedades óticas e de superfície

### 2.4.1 Transparência

A transparência é uma característica ótica que permite a um material que a luz o atravesse [53], é a propriedade oposta à opacidade. Geralmente, a transparência nas embalagens alimentares é um fator importante, pois permite a visualização do conteúdo e do seu estado de conservação [53–56]. Uma embalagem transparente facilita a identificação de eventuais problemas com os alimentos reduzindo a possibilidade do consumidor ser enganado [53–55,57].

### 2.4.2 Cor

As diferentes cores que observamos com a luz visível são o resultado da percepção por parte dos nossos olhos em relação à radiação eletromagnética em diferentes frequências e comprimentos de onda

entre 380 e 750 nm [37]. Assim, a cor de um objeto pode ser definida como a percepção visual alcançada quando a luz é refletida desse objeto e determinada pelos comprimentos de onda que não são absorvidos por essa cor [53,58]. Essa percepção ocorre quando a radiação eletromagnética da luz visível de um determinado comprimento de onda atinge a retina do olho humano, que por sua vez, transforma essa percepção num sinal nervoso que é transmitido ao cérebro, e desta forma torna perceptível a cor [37].

### 2.4.3 Energia de superfície

A energia livre de superfície quantifica a interrupção das ligações intermoleculares que ocorrem quando uma superfície é criada. As moléculas da superfície de um sólido têm mais energia comparativamente às moléculas do interior do material, pelo que, a energia de superfície pode ser definida como o excesso de energia na superfície de um material relativamente ao seu volume [59].

A energia de superfície afeta as interações interfaciais entre os materiais, uma energia de superfície elevada significa que existem fortes interações superficiais, por exemplo, entre a superfície de uma embalagem e os líquidos que contém. Para o setor da embalagem alimentar, uma energia de superfície elevada não apresenta grandes benefícios, pois as superfícies da embalagem são facilmente contaminadas devido à fácil adesão de contaminantes, por outro lado, quando a energia de superfície é baixa as interações entre as superfícies da embalagem e os líquidos são fracas, manifestando propriedades de repelência à água, óleo e outros produtos [59].

Normalmente, a energia de superfície é calculada a partir da medição do ângulo de contacto ( $\theta$ ), por ser um método simples, rápido e pela sua aplicabilidade numa grande variedade de superfícies. Um  $\theta$  elevado pode indicar energia de superfície baixa [59].

O  $\theta$  resulta do equilíbrio das tensões superficiais entre as fases, líquido/sólido, sólido/gás e líquido/gás. Em termos gerais é visto como a capacidade da superfície em manter uma gota de líquido nela depositada [59].

Considera-se que uma superfície é superhidrofílica quando  $\theta \leq 10^\circ$ , hidrofílica quando  $\theta$  está compreendido entre  $10^\circ$  e  $90^\circ$ , hidrofóbica quando  $\theta$  está compreendido entre  $90^\circ$  e  $150^\circ$  e superhidrofóbica quando  $\theta > 150^\circ$  [60], na Figura 4 podem ser observadas estas condições.

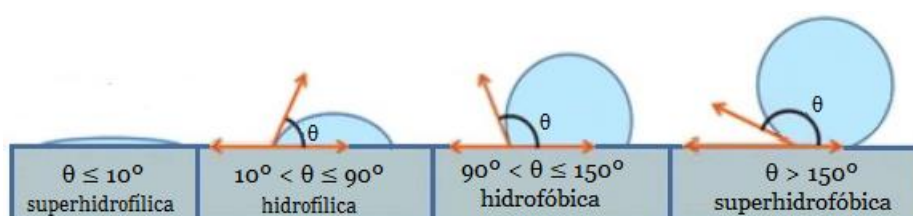


Figura 4: Valores de ângulo de contacto *versus* tipos de superfície ( figura adaptada de [60]).

## 2.5 Propriedades antimicrobianas e antioxidantes

As principais preocupações por parte dos produtores de alimentos, indústria alimentar e consumidores é a segurança e qualidade dos alimentos [61]. Os alimentos podem ser deteriorados por diversos fatores biológicos, químicos e físicos, onde as suas propriedades organolépticas e segurança são afetadas [61]. As propriedades antimicrobianas são um ponto chave na proteção dos alimentos após a sua produção, pois estes devem estar contidos numa embalagem que apresente diversas funções, entre elas, não permitir a entrada de poeiras, substâncias nocivas e microrganismos patogénicos [62].

A ausência de agentes antimicrobianos nas embalagens pode levar ao crescimento de microrganismos patogénicos, que por sua vez leva a um efeito em cadeia na perda de qualidade e segurança dos alimentos, acelerando o aparecimento de odores indesejáveis, alterações de cor e aroma, libertação de toxinas, entre outros problemas [61,62]. Para garantir a segurança e qualidade dos alimentos, têm sido implementadas regras para prevenir possíveis contaminações como sistemas HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points* ou Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos). Este sistema tem na sua base a prevenção, com o objetivo de evitar potenciais riscos que podem causar danos aos consumidores, através da eliminação ou redução de perigos, para garantir a segurança, impedindo que alimentos que não sejam seguros não cheguem às suas mãos [61–63].

A preocupação do homem pela contaminação de alimentos por microrganismos patogénicos não é recente, pois ao longo da história da humanidade existem vários documentos escritos que demonstram esta preocupação de aumentar o tempo de prateleira dos alimentos. Nos séculos passados já se utilizava prata para armazenar alimentos e bebidas, prova disso é a utilização por parte das sociedades antigas de vasos de prata para armazenar a água e o vinho. Na época dos descobrimentos colocavam-se moedas ou colheres de prata em tanques de água, de forma a mantê-la potável por longos períodos dentro dos navios. Atualmente, a NASA e a Estação Espacial Russa ainda utilizam a prata como agente de esterilização da água [64].

Para planear a produção de embalagens antimicrobianas é necessário ter em consideração qual o alimento a ser embalado e qual o material da embalagem para que o agente antimicrobiano seja ajustado, pois a incorporação do agente antimicrobiano pode afetar as propriedades barreira e mecânicas dos polímeros utilizados na produção da embalagem [61].

Como alternativa aos agentes antimicrobianos sintéticos, os óleos essenciais (OE) têm surgido como uma ótima alternativa por serem constituídos por compostos hidrofóbicos e voláteis, são geralmente eficazes contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo o seu mecanismo de ação uma combinação de diferentes efeitos [61].

Os agentes antimicrobianos podem ser aplicados sobre os polímeros ou podem ser incorporados diretamente neles. O tipo de aplicação vai depender do objetivo final requerido, se é para uma

libertação controlada ao longo do tempo com uma ação mais prolongada, ou para uma ação mais momentânea [61].

A oxidação é um fator de qualidade primário que limita o tempo de prateleira de grande parte dos alimentos. Quando ocorre dentro das embalagens é muito prejudicial para os alimentos, pois pode causar alterações organolépticas, alterações na cor e levar ao aparecimento de odores desagradáveis [8,65,66]. A presença de oxigénio é uma das causas da oxidação, mas não só, pois existem outros fatores como, a combinação dos ácidos gordos insaturados com um catalisador, a luz, o calor, ferro, cobre ou enzimas [66].

Em comparação com a deterioração microbiana, a oxidação é um processo mais lento e dominante em alimentos secos e ricos em gorduras (como as carnes, batatas fritas e alguns frutos secos), pois estes apresentam uma maior tendência a sofrer oxidação [8,66]. A incorporação de antioxidantes nas embalagens, permite que estes sejam libertados de forma a proteger os alimentos da degradação oxidativa, reduzindo ou inibindo as reações de oxidação, ao reagir com os radicais livres e peróxidos, aumentando o tempo de prateleira dos alimentos, sendo este método já muito utilizado na indústria alimentar [8,65,66].

Os antioxidantes sintéticos são utilizados há muito tempo pela indústria alimentar nas suas embalagens servindo dois propósitos, a proteção do alimento e da embalagem, protegendo-a da degradação [66]. No entanto, têm sido realizados vários estudos com o objetivo de substituir os produtos sintéticos por alternativas naturais como os OE, extratos de plantas entre outros produtos naturais [66–68].

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados são o butil-hidroxianisol (BHA) (E320), o butil-hidroxitolueno (BHT) (E321) e a *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ) (E319) [69–71].

O BHT foi inicialmente produzido como antioxidante para produtos petrolíferos e borrachas, só mais tarde foi utilizado como antioxidante alimentar. A sua utilização foi reduzida com o aparecimento do BHA, por este ser mais estável a altas temperaturas. Mais recentemente apareceu a TBHQ, em 2004 a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) considerou a TBHQ não cancerígeno, mesmo existindo estudos que apontam o contrário [69–71].

Estudos apontam para algumas consequências negativas nos humanos devido ao uso excessivo de BHA, BHT e TBHQ, nomeadamente, problemas oculares, alergias, urticária, rinite, asma, aumento do peso, dermatite e o aumento da possibilidade de aparecimento de cancro do estômago e intestinos [69–71].

Embora a utilização de compostos antimicrobianos e/ou antioxidantes seja importante para a garantia de qualidade e segurança, existem regulamentações e restrições para a utilização deste tipo de compostos, a entidade que regula este tipo de compostos na união europeia é a EFSA e em Portugal

quem controla o cumprimento dessas regras é a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) [72]

# Capítulo 3 – Materiais biodegradáveis para embalagens alimentares

## 3.1 Biopolímeros naturais

As embalagens naturais são compostas por materiais biodegradáveis designados por biopolímeros [8], os quais podem ser de origem natural, síntese química ou síntese microbiana como ilustrado na Figura 5. A zeína, o biopolímero utilizado neste trabalho de investigação, é um biopolímero natural.

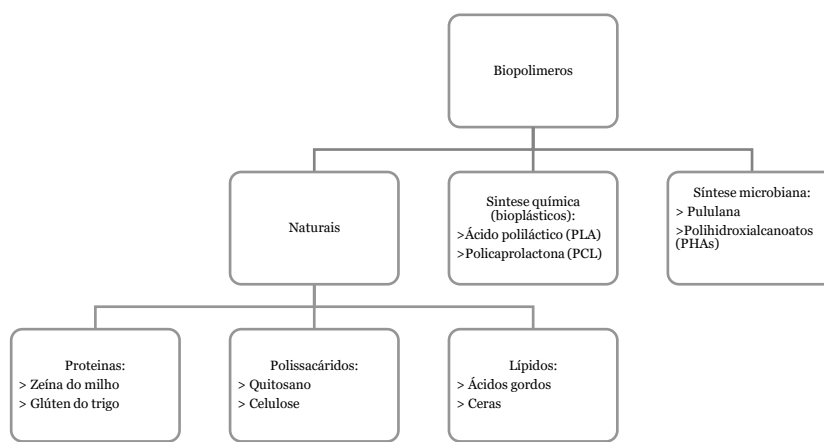


Figura 5: Biopolímeros (adaptado de [7]).

As embalagens produzidas a partir de biopolímeros têm surgido como uma alternativa ecológica para a proteção dos alimentos. Existem vários estudos sobre estes biopolímeros e as suas aplicações na indústria farmacêutica, têxtil, alimentar, entre outras [8,9].

Os biopolímeros mais usados na produção de embalagens são as proteínas, polissacáridos e lípidos, no entanto, a mistura de biopolímeros permite obter filmes com características melhoradas, uma vez que a combinação de vários polímeros pode proporcionar simultaneamente características físicas, como resistência mecânica, boas propriedades óticas, propriedades barreira ao oxigénio e ao vapor de água e ainda impedir a libertação de compostos. [8,9].

### 3.1.1 Proteínas

As proteínas utilizadas na produção de filmes podem ser de origem animal ou vegetal, sendo necessário proceder à sua desnaturação pela ação do calor, do pH ácido ou de solventes. As forças intermoleculares resultantes produzem uma coesão na matriz dos filmes, sendo essas forças estabilizadas pela distribuição uniforme de pontes de hidrogénio, ligações covalentes e forças de Van der Waals [30].

Os filmes à base de proteínas exibem, geralmente, propriedades mecânicas e barreira superiores aos filmes à base de polissacáridos e lípidos. Esta distinção é devida à estrutura particular das proteínas, a qual oferece uma gama mais ampla de propriedades funcionais, além de potenciar um maior número de ligação intermoleculares. Assim, pode afirmar-se que as proteínas fazem parte do grupo de materiais mais promissores para a produção de filmes [73].

As embalagens alimentares produzidas a partir de proteínas apresentam boas propriedades mecânicas, nomeadamente resistência e flexibilidade, são transparentes e exibem excelentes propriedades barreira a aromas, oxigénio e vapores orgânicos e ainda, uma permeabilidade seletiva a alguns gases [8].

Trabalhos de investigação recentes mostraram que filmes à base de proteínas podem exibir características físicas, mecânicas, de barreira e térmicas semelhantes a alguns filmes plásticos [8,73]. Existe uma grande variedade de proteínas que são utilizadas na produção de filmes (gelatina, soro do leite, soja, glúten, zeína e queratina). A gelatina, as proteínas do soro do leite e a zeína do milho são proteínas bastante utilizadas na indústria alimentar, por serem subprodutos da indústria alimentar gerados em abundância, apresentando custos relativamente baixos. A utilização dessas proteínas na produção de filmes com propriedades sensoriais, óticas, mecânicas e de barreira tem sido investigada. No entanto, a zeína, proteína do milho, apresenta características específicas devido à quantidade significativa de aminoácidos não polares na sua composição, proporcionando maior hidrofobicidade comparativamente a filmes à base de outras proteínas. A zeína produz filmes resistentes e flexíveis, com baixa permeabilidade ao oxigénio, elevada transparência e boa resistência térmica. A principal desvantagem destes filmes é a sua fragilidade em ambientes secos [8,74].

### **3.1.2 Polissacáridos**

Os polissacáridos são uma alternativa aos polímeros sintéticos por proporcionarem excelentes propriedades mecânicas e estruturais, apesar das fracas propriedades barreira ao vapor de água [9,75]. Os principais polissacáridos utilizados na produção de filmes são a celulose, amido, pectina, extratos de algas, pululana e quitosano [9,30,75].

Os filmes de polissacáridos apresentam uma estrutura compacta e dura, elevada viscosidade e adesividade e uma boa capacidade para a formação de géis. Estes filmes possuem também boas propriedades de permeabilidade aos gases, característica importante para materiais de embalagem, permitindo o aumento do tempo de prateleira do alimentos [75].

A celulose é o polissacárido mais abundante encontrado no planeta, sendo obtido a baixo custo. Encontra-se na parede celular das plantas, sendo um recurso renovável, totalmente biodegradável e insolúvel em água. No entanto, a sua natureza hidrofílica, a insolubilidade em água e a sua estrutura cristalina são algumas limitações, devido à formação de hélices sustentadas por pontes de hidrogénio [75]. Contudo, as excelentes propriedades mecânicas da celulose e dos seus derivados, fazem dela um bom substituto dos polímeros sintéticos como materiais de embalagem. Embora os derivados de

celulose apresentem boas propriedades mecânicas também podem ser muito caros devido aos processos utilizados para a sua obtenção [9,75].

O papel é um derivado de celulose muito utilizado para a produção de embalagens, devido à facilidade de obtenção, baixo custo e baixo peso. A maior limitação do papel é a fraca barreira ao vapor de água, e a sua elevada porosidade resultante da organização das fibras [9]. Estas desvantagens restringem algumas aplicações industriais [9]. Com o intuito de superar estes problemas, tem sido investigada a combinação da celulose com ácidos gordos, para melhorar as propriedades barreira dos filmes [30].

### **3.1.3 Lípidos**

A utilização de lípidos na produção de filmes depende da sua natureza, isto porque os lípidos apresentam diferentes propriedades químicas (hidrofobicidade) e físicas (dependendo da temperatura, os lípidos podem estar no estado sólido ou líquido) [9]. Os filmes à base de lípidos são espessos e quebradiços devido à sua baixa resistência mecânica, mas exibem uma boa barreira à humidade, superior à dos filmes à base de hidrocoloides, devido as suas propriedades hidrofóbicas [30]. Os filmes de lípidos são muito suscetíveis à oxidação e ao ranço lipídico, podendo alterar a aparência e o sabor dos alimentos. Assim, os lípidos puros devem ser usados em combinação com proteínas e polissacáridos, tirando partido das suas propriedades barreira aos gases e humidade. As ceras e os ácidos gordos são exemplos desses lípidos que conferem resistência à penetração de água e aumentam a flexibilidade dos filmes [9,30].

O ácido oleico (AO) é um ácido gordo de origem vegetal ou animal, presente em praticamente todos os lípidos, que tem sido amplamente usado na formulação de filmes [76].

## **3.2 Filmes de zeína**

### **3.2.1 Descrição química da zeína**

O milho (*Zea mays*) pertence à família das gramíneas (*Poaceae*), teve a sua origem na América Central, tendo sido cultivado pela primeira vez há 10000 anos por povos nativos do México, tendo estes posteriormente ensinado os colonos europeus a cultivar os grãos de milho. Após os descobrimentos, rapidamente se tornou a cultura alimentar mais amplamente distribuída pelo mundo, sendo usado como alimento de humanos e animais, na produção de biocombustíveis e como matéria-prima para diversas indústrias [77]. O milho pode ser processado através da moagem a seco, processamento alcalino e moagem a húmido [78,79].

A composição do milho é cerca de 72% de amido, 10% de proteínas, 4% de gordura e várias vitaminas e minerais [80,81]. Sabe-se que os 10% de proteínas existentes no milho estão distribuídas principalmente entre o endosperma e o germe, consistindo numa mistura de prolaminas, glutelinas, albuminas e globulinas, diferenciadas pela sua solubilidade [80,82], Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das frações proteicas do milho (% base seca) (adaptado de [78]).

Proteína	Solubilidade	Núcleo inteiro	Endosperma	Gérmen
Albumina	Água	8	4	30
Globulina	Sal	9	4	30
Glutelina	Base	40	39	25
Zeína	Álcool	39	47	5

A zeína faz parte das proteínas mais investigadas, foi identificada pela primeira vez em 1897 [78], é uma proteína de armazenamento do milho contida no endosperma do grão, representando 35-60% do total de proteínas existentes no mesmo. Constituída por 17 aminoácidos, é uma prolamina, insolúvel em água, essa insolubilidade é devida a escassez de aminoácidos polares e ao alto teor de aminoácidos não polares [83], sendo solúvel em etanol 70-80% (Figura 6). Apresenta ótimas propriedades de formação de filmes devido às ligações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e dissulfureto formadas entre as cadeias de zeína [5,6,79,84–86]. A sequência de aminoácidos da zeína tem sido estudada ao longo dos anos, sendo por isso bem conhecida, no entanto, não há consenso sobre a sua estrutura terciária até ao momento. Dependendo das diferenças estruturais, pode ser classificada em quatro tipos,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - e  $\gamma$ -zeína, sendo a  $\alpha$ -zeína a mais abundante [5,87].

Os filmes formados apenas por zeína são muito quebradiços, pelo que, a adição de plastificantes é essencial para melhorar as suas propriedades elásticas [84–86], H. Xu *et al* (2012) [87] destacam no seu trabalho a importância da utilização de plastificantes, o glicerol (GLY) e o AO, para melhorar as propriedades dos filmes de zeína [87].

A excelente capacidade de formar filmes e as ótimas propriedades barreira, nomeadamente ao vapor de água, tornam a zeína num dos materiais biodegradáveis com enorme potencial para embalagem alimentar [86,88].

### 3.2.2 Solventes para a zeína

Para que uma substância seja um bom solvente para a zeína, a sua composição deverá ter um equilíbrio adequado entre os grupos polares e apolares [89].

Existem três grupos de solventes para a zeína: solventes primários, solventes binários e solventes ternários [90]. Um solvente primário é um composto que tem a capacidade de dissolver a zeína numa concentração superior a 10%, para isso, precisa ser capaz de interagir com os aminoácidos da zeína, de modo a poder dissolver simultaneamente os aminoácidos polares e não polares [89,90].

Os solventes binários são compostos orgânicos que podem ser divididos em duas classes: aqueles que são adicionados à água e os que são adicionados a um álcool alifático inferior com o objetivo de alcançar o poder de solvatação. Estes solventes dependem do composto orgânico para interagir com os aminoácidos apolares e a água para interagir com os aminoácidos polares [89,90].

À semelhança dos solventes binários, os solventes ternários apresentam duas classes, mas podem ser uma combinação solvente, água e álcool alifático inferior [89,90].

Os solventes binários que contêm álcoois alifáticos e baixo teor de água, são as soluções aquosas de álcoois mais utilizadas como solventes de zeína [89,90]. O etanol 50-90% é o solvente mais usado para a produção de filmes [78,89,90]. A zeína tem a capacidade de dissolução em elevadas concentrações de álcool quando a temperatura do solvente está acima do seu ponto de ebulição [78,91].

Na Figura 6 está representado o diagrama de fase ternária da solubilidade de zeína em etanol e água, a temperatura constante a solubilidade da zeína varia com a concentração do etanol. Pode observar-se a existência de duas linhas quando a concentração de etanol é de 50% e 90%, evidenciando a solubilidade da zeína nessa zona, no entanto, a solubilidade pode ser alargada com o recurso ao aumento da temperatura [78].

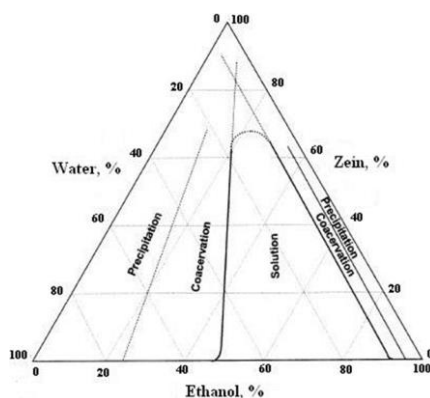


Figura 6: Diagrama de fase ternária para a solubilidade da zeína em etanol e água (adaptada de [78]).

### 3.2.3 Plastificantes para a zeína

Os plastificantes são compostos de baixo peso molecular não voláteis (como GLY, sorbitol, polietileno glicol, etc.) que interagem com as cadeias dos polímeros, diminuindo a ocorrência de ligações intermoleculares entre elas, resultando num aumento da flexibilidade [92]. A adição dos plastificantes à zeína afeta, igualmente, as propriedades mecânicas e a resistência à permeabilidade aos gases e vapor de água dos materiais produzidos [8,30,92,93].

A adição dos plastificantes origina filmes compósitos que são constituídos por uma fase contínua (matriz proteica) e uma fase dispersa (carga lipídica) tipicamente produzida via emulsificação, ou via laminação camada por camada [93]. Os plastificantes com menores pesos moleculares são os mais eficientes, e os plastificantes com baixa polaridade são os menos eficazes devido à sua baixa competição pelos locais de ligação ao hidrogénio comparativamente aos plastificantes altamente polares [93].

O plastificante mais eficaz para os materiais biopoliméricos, não para a zeína pois origina a sua precipitação, é a água, no entanto, também tem sido estudado o efeito de outros plastificantes

comuns, como o GLY, sorbitol e xilitol, glicóis, açúcares, trietanolamina e hidrolisado de gelatina, nos filmes à base de proteínas [93].

O GLY é muito usado na formulação de filmes à base zeína por possuir propriedades hidrofílicas. Quanto maior for a quantidade de GLY adicionado na produção de filmes, menor a resistência à tração e menor o módulo de Young, no entanto, o alongamento será maior [94]. O GLY é muitas vezes usado como agente plastificante para reduzir as fragilidades dos filmes de zeína podendo ser adicionado até concentrações de 30%, no entanto, a adição de plastificantes pode afetar algumas das propriedades funcionais dos filmes [29,87].

### **3.2.4 Aplicações da zeína**

A zeína tem como principal aplicação a indústria alimentar, no entanto, também pode ser usada como material de base no *electrospinning* e em processos de extrusão. Outras aplicações da zeína incluem a indústria farmacêutica, como agente de revestimento para entrega de fármacos [84] e pensos rápidos, e ainda, as indústrias da cerâmica, cosmética e têxteis. As aplicações desta proteína continuam a crescer conforme documentado em vários estudos [5,79], onde foi proposta a utilização da zeína no desenvolvimento de filmes biodegradáveis. A produção de filmes de zeína envolve o desenvolvimento de ligações hidrofóbicas, hidrogénio e dissulfureto, formadas entre as cadeias de zeína na matriz do filme. Os filmes à base de zeína apresentam boas propriedades para incorporarem agentes antimicrobianos, como a lisozima, lactoperoxidase, glicose oxidase, bactericidas e OE [45,79,95,96].

A utilização da zeína na produção de filmes com propriedades de conservação de carne e queijo foi documentada em trabalhos de investigação [33,37,95]. Os filmes de zeína podem incorporar OE na sua formulação, pois reduzem as contaminações microbianas. Outro estudo, reporta a utilização da zeína na encapsulação de nutrientes alimentares em nanocápsulas de libertação controlada [96].

O desenvolvimento de embalagens à base de zeína poderá ter um enorme potencial no que diz respeito à qualidade e ao alargamento do tempo de prateleira dos alimentos. Além disso, a incorporação de compostos ativos pode melhorar o valor tecnológico dos filmes de zeína no que concerne à conservação e qualidade dos alimentos [45].

## **3.3 Laminados de biopolímeros**

Um laminado é um material composto por uma mistura de materiais sobrepostos por camadas para a produção de um único material [13,21]. Quando um filme de um biopolímero não fornece a proteção adequada a um alimento, dois ou mais filmes flexíveis podem ser combinados sob a forma de laminado para melhorar as suas performances [97].

Os laminados resultam da conjugação de diferentes materiais, em que cada um deles contribui com a suas propriedades. Assim, a escolha dos materiais para o laminado deve ter em conta as propriedades individuais dos materiais e os requisitos que se pretendem para a embalagem

alimentar, os quais devem atender às necessidades do produto alimentar que irá embalar [13,21,97]. Por exemplo, o papel e o cartão proporcionam rigidez, protegem a embalagem de possíveis danos mecânicos e oferecem uma ótima superfície para impressão de informações. Os filmes de biopolímeros proporcionam boas propriedades barreira, transparência e brilho.). Os laminados podem ser constituídos pela combinação de diferentes tipos de papel, filmes de diferentes biopolímeros ou papel e biopolímeros. As diferentes camadas podem ser unidas por via química, com recurso a um adesivo, ou via física, por meios térmicos quando pelo menos um dos constituintes tem propriedades termoplásticas [97].

O conceito de laminação já existe há muito tempo, exemplo disso são as embalagens de leite, compostas por diferentes camadas de cartão, alumínio e polietileno [98]. Os laminados de biopolímeros podem combinar as propriedades individuais de cada material que os compõem, como resistência mecânica, boas propriedades barreira, biodegradabilidade, entre outras, obtendo desta forma uma embalagem com melhores capacidades e mais versáteis [13,15].

Existem diversas combinações possíveis de laminados, por exemplo, laminados de celulose e xilanas, cartão e glúten de trigo, quitina e polipropileno, entre outras [13,20,21,56,97,99].

Os laminados de biopolímeros podem ser aplicados em diversas áreas como a saúde, na produção de nanocompósitos para entrega de fármacos, na indústria alimentar no embalamento de alimentos, tendo a vantagem de poder também incorporar nas várias camadas outros compostos como antioxidantes e antimicrobianos que irão aumentar o tempo de prateleira dos alimentos. [10,13,15,66,100].

## Capítulo 4 – Óleos essenciais

Os OE podem ser extraídos de diferentes partes das plantas, nomeadamente, cascas, flores, folhas, frutos, madeira, sementes, raízes e ramos e são formados por compostos voláteis, os quais, geralmente, originam aromas [101].

A destilação como método de obtenção de OE foi usada pela primeira vez no Oriente (Egito, Índia e Pérsia), há mais de 2000 anos, atualmente a destilação a vapor continua a ser o método mais usado para a extração dos OE [102]. São conhecidos cerca de 3000 OE, dos quais 300 são comercialmente importantes, sendo usados como fragrâncias e aromatizantes [102]. Na União Europeia a maior utilização dos OE é em produtos alimentares, farmacêuticos e perfumes. As propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos OE estão a ser cada vez mais investigadas, devido ao seu potencial como alternativa promissora aos conservantes sintéticos [101]. Deste modo, muitos OE têm vindo a ser utilizados como conservantes naturais de alimentos, devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas [102]. Vários trabalhos de investigação descrevem a eficácia da utilização de revestimentos antimicrobianos contendo OE na proteção dos alimentos contra vários microrganismos [93,101,103].

Os OE podem ser incorporados nos filmes para embalagem alimentar, alterando a sua permeabilidade e solubilidade em água devido à sua natureza hidrofóbica. Simultaneamente, reduzem a resistência e aumentam a elasticidade dos filmes devido à sua estrutura heterogénea e descontínua. Esta alteração da matriz polimérica restringe as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas [93,101,103]. Outro aspeto menos atrativo dos OE prende-se com o odor e sabor que os mesmos possuem, os quais podem afetar as propriedades organolépticas dos alimentos, sendo este um dos maiores desafios a ser ultrapassado [93].

### 4.1. Óleo essencial de cipreste

Existem doze espécies de árvores do género *Cupressus* (*Cupressaceae*) espalhadas pela Ásia subtropical, América do Norte e a bacia do Mediterrâneo. A espécie *Cupressus sempervirens* L., também designada por cipreste-do-mediterrâneo, é uma árvore alta, geralmente de 15 a 20 m, mas podendo atingir 30 a 40 m e um tronco bem desenvolvido com cerca de 3 m de perímetro [104]. Apresenta características botânicas específicas, incluindo tolerância à seca, correntes de ar, poeiras movidas pelo vento, granizo e gases atmosféricos, possui um sistema radicular bem desenvolvido e a capacidade de florescer em solos ácidos e alcalinos [105]. É uma espécie muito utilizada na medicina tradicional, como diurético e desinfetante, contra constipações e inflamações, ajuda no combate à diabetes, é um antisséptico com propriedades medicinais e farmacológicas, sendo também amplamente usado como ingrediente cosmético. Além disso, as suas sementes secas são usadas para tratar feridas, úlceras, hematomas, espinhas, pústulas, erupções cutâneas e erisipela, e o óleo essencial das folhas e cones é usado externamente para a dor de cabeça, constipações, tosse e bronquite [105].

Vários trabalhos demonstram uma variação na composição química do OC entre as diferentes partes da planta [106]. O composto maioritário é o  $\alpha$ -Pinene, sendo o óleo essencial também constituído por  $\beta$ -Pinene,  $\Delta$ -3-Carene,  $\beta$ -Myrcene, Limonene,  $\alpha$ -Terpinolene,  $\alpha$ -Terpinyl acetate, entre outros, sendo estes os que se apresentam em maiores concentrações.

# Capítulo 5 - Materiais e Métodos

## 5.1 Reagentes

A zeína (CAS: 9010-66-6), apresentando um peso molecular de 22-24 kDa, foi adquirida na Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). O GLY (anidro extra puro) (CAS: 56-81-5) foi adquirido na Merck (Darmstadt, Alemanha). O AO (CAS: 112-80-1) foi adquirido na Merck (Darmstadt, Alemanha). O OC (*Cupressus sempervirens* L.) (Physalis®) foi adquirido numa loja local de produtos naturais.

## 5.2. Óleo essencial de cipreste: obtenção e análise da composição química

O OC foi isolado a partir dos ramos da árvore, proveniente de agricultura biológica (Eco Guarantee Label), com origem em Marrocos, por hidrodestilação. A composição química do OC foi analisada de acordo com a norma ISO 11024. As técnicas utilizadas para a análise foram a cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), em modo *total ion chromatogram* (TIC). Os compostos foram identificados por GC-MS sendo processado no modo espectro completo e quantificados por GC-FID, usando a percentagem de área relativa [107]. Foi utilizado o GC-FID Agilent Technologies 7820A / MS 5977B, com uma coluna DB-WAX UI 60 m × 0.25 mm × 0.5 µm, o gás de arraste foi o hélio, a uma pressão de 33 psi no detetor de ionização de chama (FID) e 25.5 psi no detetor espectrométrico de massas (MSD), a injeção de 0.1 µL (MSD) em modo *split*. O programa de temperatura utilizado foi o seguinte: 6 min a 50°C, 2°C/min até 190°C, 4°C/min até 220°C, 10 min a 220°C, 4°C/min até 250°C, 10 min a 250°C [107].

### 5.2.1. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do OC foi avaliada por dois métodos previamente implementados: ensaio de sequestração dos radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e teste de branqueamento do β-caroteno [108].

#### 5.2.1.1. Ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH

A atividade antioxidante de uma substância pode ser avaliada pela sua capacidade de sequestrar radicais livres de DPPH, pois na presença de uma substância antioxidante, o radical é reduzido provocando alteração da coloração [109].

Inicialmente foram preparadas diversas diluições do OC e 0.1 mL dessas amostras foram adicionados a 3.9 mL de três soluções metanólicas DPPH (0.20; 0.12 e 0.08 mM). Estas concentrações foram selecionadas devido à faixa de linearidade das soluções DPPH, pois acima de 0.2 mM a concentração é muito elevada e podem ocorrer erros devido à lei de Lambert-Beer, e abaixo dos 0.05 mM a cor é muito fraca com uma faixa de leitura de absorvência limitada [109]. O controlo negativo foi composto por 0.1 mL de metanol e 3.9 mL de cada solução de DPPH. O ácido gálico foi usado como controlo

positivo. A preparação deste controlo foi semelhante à aplicada para as amostras do OC. As soluções foram incubadas durante 1.5 h à temperatura ambiente e na ausência de luz durante toda a reação, a absorvência foi medida a 517 nm usando um espectrofotómetro. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação (4) [108,109]:

$$\%Inibição = \frac{A_{Controlo} - A_{Amostra}}{A_{Controlo}} \times 100 \quad (4)$$

Onde  $A_{Controlo}$  é a absorvência do controlo negativo e  $A_{Amostra}$  é a absorvência na presença do OC. A  $IC_{50}$  foi determinada utilizando uma curva de calibração onde se representa graficamente a concentração de OC em função da correspondente %Inibição. A atividade antioxidante foi expressa como Índice de Atividade Antioxidante (IAA), determinado utilizando a equação (5) [108,109]:

$$IAA = \frac{\text{Concentração final do DPPH no controlo negativo}}{IC_{50}} \quad (5)$$

O valor do IAA foi calculado tendo em consideração a massa do DPPH e do composto testado na reação, que resulta numa constante, independente da concentração do DPPH e da amostra utilizada. O IAA permite a classificação da atividade antioxidante do OC como: pobre ( $IAA \leq 0.5$ ), moderada ( $0.5 < IAA \leq 1.0$ ), forte ( $1.0 < IAA < 2.0$ ) ou muito forte ( $IAA \geq 2.0$ ) [109]. Os ensaios foram realizados em triplicado e as soluções de DPPH foram preparadas diariamente.

### 5.2.1.2. Teste de branqueamento do $\beta$ -caroteno

Para determinar a atividade antioxidante do OC, foram adicionados 500  $\mu$ L de uma solução de  $\beta$ -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) a 40  $\mu$ L de ácido linoleico, 400  $\mu$ L de Tween 40 e 1 mL de clorofórmio. Após a homogeneização da mistura, o clorofórmio foi evaporado sob vácuo, e 100 mL de água destilada saturada com oxigénio foram adicionados à mistura, efetuando uma agitação vigorosa, para formar uma emulsão homogénea. Foi utilizada uma emulsão preparada de modo semelhante à anterior com substituição da solução de  $\beta$ -caroteno por clorofórmio para ser utilizada como branco na leitura da absorvência. De seguida, 5 mL da emulsão com  $\beta$ -caroteno foram adicionados a 300  $\mu$ L de diluições metanólicas do OC. O controlo negativo consistiu em 5 mL da emulsão e 300  $\mu$ L de metanol. O BHT foi utilizado como controlo positivo a preparação deste controlo foi semelhante à aplicada para as amostras do OC. Para finalizar, os tubos foram agitados e colocados a 50°C em banho-maria por 1 h. As absorvências das amostras foram medidas a 470 nm. As medições foram realizadas em triplicado no tempo inicial ( $t=0$  h) e no tempo final de incubação ( $t=1$  h). A atividade antioxidante do OC foi determinada como percentagem de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno (% de Inibição) equação (6) [108]:

$$\%Inibição = \frac{A_{amostra}^{t=1h} - A_{controlo}^{t=1h}}{A_{controlo}^{t=0h} - A_{controlo}^{t=1h}} \times 100 \quad (6)$$

Onde  $A^{t=1\text{ h}}$  é a absorvência das amostras após a incubação, e  $A^{t=0\text{ h}}$  é a absorvência inicial das amostras.

### **5.2.3. Avaliação das propriedades antibacterianas**

A atividade antibacteriana do OC foi avaliada contra sete espécies de microrganismos: quatro Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923); e três Gram-negativas (*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Escherichia coli* ATCC 25922). As culturas bacterianas foram mantidas em 20% (v/v) de GLY à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Todas as espécies foram subcultivadas em meio de cultura apropriado 24 h antes dos ensaios antibacterianos [108].

#### **5.2.3.1. Ensaio de difusão em agar**

Para realizar a avaliação da atividade antimicrobiana do OC foi aplicado um método que consiste na aplicação de discos de celulose estéreis impregnados com OC sobre uma placa de agar previamente inoculada com os microrganismos, após as placas serem incubadas sobre condições específicas é medido o diâmetro da zona onde não ocorreu crescimento microbiano. Os inóculos foram preparados por suspensão de colônias de bactérias em solução salina estéril (NaCl a 0.85% (m/v)), ajustando a suspensão a uma turbidez correspondente a 0.5 unidades de McFarland ( $1-2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL)), tendo sido os microrganismos previamente repicados 24 h antes do ensaio [108]. Para a inoculação das placas de teste, mergulhou-se uma zaragatoa estéril na suspensão previamente preparada, retirou-se o excesso de líquido rodando a zaragatoa contra as paredes do tubo de Falcon, e em seguida espalhou-se o inóculo sobre toda a superfície do agar, tendo sido efetuados três espalhamentos, girando a placa num ângulo de  $60^{\circ}$  a cada espalhamento de forma a garantir que o inóculo ficava uniformemente espalhado, finalizando com a zaragatoa nas margens da placa e posterior secagem [108].

Os discos de celulose estéreis, com um diâmetro de 6 mm, foram previamente impregnados com 15  $\mu\text{L}$  do OC, colocados na superfície das placas de Müller-Hinton agar (MHA) inoculadas. Finalmente, as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Após a incubação, as placas foram visualmente observadas quanto a zonas de inibição, sendo os respectivos diâmetros medidos utilizando um paquímetro digital [108]. Foi considerado halo de inibição a área sem crescimento microbiano visível a olho nu, tendo também sido avaliada a superfície do agar que esteve em contacto com os discos. Este ensaio foi executado em triplicado e de forma independente.

#### **5.2.3.2. Determinação dos valores da concentração mínima inibitória: método da resazurina**

O valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI) do OC foram determinados usando o ensaio de microdiluição com a resazurina como indicador de crescimento [108]. Inicialmente, diluições sucessivas do OC (de 32 a 0.25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) foram preparadas numa placa de 96 poços (50  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ), usando Müller-Hinton broth (MHB) como meio de cultura e uma concentração máxima de DMSO

de 2 % (v/v) para aumentar a solubilidade do OC. De seguida, a solução indicadora de resazurina (10 µL, 0.1% (p/v) diluída em MHB, foi adicionada a cada poço, seguida por 30 µL de MHB. Finalmente, a suspensão bacteriana (10 mL, 0.5 McFarland) foi adicionada aos poços. Cada placa continha um conjunto de controlos: uma coluna com todas as soluções sem o OC, e uma coluna com todas as soluções sem a suspensão bacteriana, sendo adicionando o respetivo volume em falta com MHB. As placas foram preparadas em triplicado e incubadas a 37 °C por 24 h. A mudança de cor de roxo para rosa ou incolor foi avaliada visualmente e registada como crescimento microbiano. A menor concentração em que a mudança não ocorreu foi tomada como valor de CMI [108,110].

## **5.3. Preparação dos filmes de zeína e laminados**

### **5.3.1. Filmes de zeína**

Para a preparação dos filmes de zeína sem OC (controlo) foi utilizada uma proporção de 1:10 de zeína em relação ao etanol (80%) (m/v). A zeína foi dissolvida no etanol à temperatura ambiente sob agitação magnética (300 rpm) durante 5 min. Seguidamente, adicionou-se 25% de plastificante em relação à zeína. O plastificante, constituído por três partes de AO e uma parte de GLY, foi misturado à temperatura de 60°C, sob a mesma agitação durante 30 min. A preparação dos filmes incorporando o OC seguiu o mesmo procedimento com uma etapa adicional, a qual incluiu a adição de 15% do OC em relação à massa da zeína, 8 min antes do final da agitação [87].

A mistura foi colocada sob vácuo durante alguns segundos, por forma a eliminar algum ar incluso, tendo sido posteriormente colocada em placas de Petri de poliestireno, as quais foram colocadas em estufa ventilada à mesma temperatura de produção dos filmes durante 1h. Os filmes foram depois destacados e acondicionados à temperatura de 23±1°C e humidade relativa de 50±2% [87].

### **5.3.2. Preparação dos laminados**

Os laminados foram preparados a partir de dois materiais, papel de pasta de eucalipto refinada com 80 g m<sup>-2</sup> e os filmes de zeína. A combinação dos dois materiais foi realizada utilizando a via química, recorrendo ao uso do próprio solvente (etanol) de forma a promover as ligações químicas e físicas, usando um processo mecânico de calandragem, com pressão, temperatura e velocidade controladas. A calandra de laboratório utilizada neste trabalho foi Beloit Wheelers, Modelo 703, sob condições constantes de temperatura de 100 °C, pressão de 1 bar e velocidade 1 m min<sup>-1</sup>. Os filmes de zeína foram sujeitos a uma humificação por spray, de cerca de 70%, em etanol, na face que adere ao papel, imediatamente antes da produção do laminado. As amostras de laminados foram condicionadas a 23±1°C e 50±2% de humidade relativa antes de qualquer caracterização [99].

## 5.4. Caracterização dos filmes e laminados

### 5.4.1. Espessura e gramagem

A espessura foi medida em cinco posições aleatórias de cada amostra de filme ou laminado num micrómetro (ADAMEL LHOMARGY mi 20), com uma sensibilidade de 0.001 mm, seguindo parcialmente a norma ISO 534:2011. A gramagem (G) foi determinada a partir da razão entre a massa (g) dos filmes ou dos laminados, determinada em balança analítica com precisão de  $\pm 0.001$  g e a respetiva área (m<sup>2</sup>), de acordo com a norma ISO 536:1995, equação (7) [111].

$$\text{Gramagem} = \frac{\text{massa}}{\text{área}} \quad (7)$$

### 5.4.2. Propriedades mecânicas

Para avaliar as propriedades mecânicas dos filmes e laminados efetuaram-se ensaios de tensão de rutura ( $\sigma$ ) expressa em MPa, índice de tração (IT) expresso em Nm/g e o módulo de elasticidade ou módulo de Young (E) expresso em MPa. Para o efeito foi usado o equipamento Thwing-Albert Instrument Co., segundo uma adaptação da norma ISO 1924/1. A distância inicial da garra foi fixada em 50 mm e a velocidade em 10 mm/min [111].

O ensaio consiste na aplicação de uma carga uniaxial, a velocidade constante, sobre a amostra, obtendo-se uma relação tensão *versus* deformação, característica de cada material.

Onde  $\sigma$ , é a força máxima (F) exercida por área da secção transversal do provete ( $A_t$ ), equação (8).

$$\sigma = \frac{F}{A_t} \quad (8)$$

O IT foi determinado pela razão entre a resistência à tração (S) e a gramagem do filme, equação (9). A resistência à tração é a razão entre a força máxima de rutura e a largura do provete.

$$\text{IT} = \frac{S}{G} \quad (9)$$

O módulo de Young (E), é a razão entre  $\sigma$  e a deformação ( $\epsilon$ ), na região elástica da curva de tensão *versus* deformação, equação (10), onde L e L<sub>0</sub>, são, respetivamente, os comprimentos final e inicial do provete.

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} = \left( \frac{\sigma}{\frac{L - L_0}{L_0}} \right) \quad (10)$$

### 5.4.3. Hidrofobicidade

A hidrofobicidade da superfície dos filmes de zeína e dos laminados foi avaliada pela medição do  $\theta$  com três líquidos: água (polar), etilenoglicol (anfifílico) e o diiodometano (apolar). O  $\theta$  é definido como o ângulo formado entre a linha de base, a gota de líquido e a amostra, pela tangente no ponto trifásico sólido-líquido-vapor.

Para realizar as medições, cada seringa foi cheia com o respectivo líquido, depositada uma gota sobre a superfície da amostra e medido o  $\theta$ . O instrumento de medição do  $\theta$  utilizado foi o OCAH 200 Dataphysics. Para cada amostra foram realizadas 5 medições e calculados os valores médios [111,112]. Com os dados do  $\theta$  obtidos para cada líquido, foram calculadas as energias livres de superfície das amostras utilizando o método de Owens-Wendt [107].

### 5.4.4. Propriedades óticas

A cor e a transparência dos filmes de zeína e laminados foram avaliadas utilizando um espectrofotômetro Technidyne Color Touch 2 (New Albany, IN, EUA). As medições foram realizadas em três posições aleatórias da amostra usando o iluminante D65 e observador 10°. O sistema de cor selecionado foi o CIE  $L^*a^*b^*$ , onde as coordenadas cromáticas representam,  $L^*$  (luminosidade, que varia entre 0 (preto) e 100 (branco))  $a^*$  (que varia entre  $\pm a^*$ , respectivamente verde e vermelho) e  $b^*$  (que varia entre  $\pm b^*$  respectivamente azul e amarelo). A transparência das amostras foi calculada de acordo com a equação (11) adaptada [53], seguindo a norma ISO 2289 [25].

$$T = \sqrt{(R_W - R_0) \left[ \frac{10000}{R_{(W)}} - R_0 \right]} \quad (11)$$

Onde T é a transparência,  $R_W$  é a refletância da amostra em % quando posicionada sobre um fundo branco,  $R_0$  é a refletância da amostra sobre um fundo negro e  $R_{(W)} = 90.41$  é a refletância do fundo branco usado [53].

### 5.4.5. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (WVP; g/(Pa.dia.m)) e a taxa de transmissão de vapor de água (WVTR; g/(m<sup>2</sup>.dia)) foram determinadas de acordo com a norma ASTM E96-00. As amostras foram expostas à temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e humidade relativa de  $50 \pm 2\%$  na face superior e 0% de humidade relativa na face inferior, garantida pela presença de 15 g de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) anidro. A área de amostra exposta foi de 38.48 cm<sup>2</sup>. As alterações gravimétricas foram monitorizadas a cada 2 horas durante 48 horas. O gradiente foi calculado a partir do declive de uma regressão linear entre a variação de peso em função do tempo. WVTR foi calculada de acordo com a equação (12):

$$\text{WVTR} = \frac{\frac{\Delta m}{\Delta t}}{A} \quad (12)$$

onde  $\Delta m$  é a variação de peso das caixas de teste (g),  $A$  é a área de teste ( $m^2$ ),  $\Delta t$  é a variação do tempo de teste (dia),  $\Delta m/\Delta t$  é o declive da reta obtida a partir dos 11 pontos resultantes da pesagem das caixas, sendo expresso em g/dia. WVP foi calculada de acordo com a equação (13):

$$WVP = \frac{WVTR}{\Delta p} = \frac{WVTR}{p (RH_1 - RH_2)} \times e \quad (13)$$

onde  $p$  é a pressão de vapor da água a  $23^\circ C$  (2811 Pa),  $RH_1$  é a humidade relativa na face superior do filme (50 %),  $RH_2$  é a humidade relativa na face inferior do filme (0%),  $e$  refere-se à espessura (m) das amostras [25]. Os ensaios foram realizados em duplicado, no entanto, se os valores não fossem concordantes os ensaios eram repetidos [111].

#### 5.4.6. Permeabilidade ao oxigénio

Os ensaios de OTR foram realizados nos laboratórios do Instituto de Investigação da Floresta e do Papel (RAIZ), utilizando o equipamento Labthink PERME® OX2/23 e o software associado.

As amostras foram condicionadas usando um agente exsicante para secarem à temperatura de teste por um período não inferior a 48 horas.

As condições de teste foram selecionadas entre o conjunto de condições de temperatura e humidade relativa especificadas pela norma ISO 15101-2:2003. A área de amostra exposta foi de  $5.31 \text{ cm}^2$ .

Todas as medições foram efetuadas em duplicado e os valores de OTR foram usados para determinar a permeabilidade ao oxigénio (OP), os resultados de OTR ( $\text{cm}^3 / (\text{m}^2 \cdot \text{dia})$ ) e OP ( $(\text{cm}^3 \mu\text{m}) / (\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa})$ ) foram expressos em média. A OP foi calculada multiplicando a OTR pela espessura média ( $e$ ) do filme e dividindo pela diferença da pressão parcial do oxigénio ( $\Delta PO_2$ ) entre as duas faces do filme, conforme equação (14), [99,111].

$$OP = \frac{OTR}{\Delta PO_2} \times e \quad (14)$$

#### 5.4.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos filmes de zeína e dos laminados foram obtidos entre os valores de  $4000$  e  $600 \text{ cm}^{-1}$  usando um FTIR ( Nicolet iS10 smart iTRBasic, Thermo Fisher Scientific, Waltham), com 64 varrimentos e a resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  [25].

#### 5.4.8. Microestrutura dos filmes e laminados

Utilizou-se a microscopia eletrónica de varrimento (SEM - *Scanning Electron Microscopy*) de forma a visualizar a microestrutura das amostras. As imagens foram obtidas no microscópio Hitachi S-3400N. Para a avaliação da secção transversal das amostras, os cortes foram realizados com a ajuda

de uma lâmina. Posteriormente, as amostras foram fixadas em suportes com o auxílio de fita-cola de dupla face e pulverizadas com ouro utilizando um evaporador de metais (Quorum Q150R ES). Antes da observação no SEM, as amostras foram mantidas num exsiccador durante três semanas. Todas as amostras foram analisadas a uma voltagem de aceleração de 20 KV [111].

#### **5.4.9. Calorimetria diferencial de varrimento**

O comportamento térmico dos filmes, laminados e dos respectivos componentes foi analisado por calorimetria diferencial de varrimento (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*). As análises foram realizadas num calorímetro (Netzsch DSC 204, Selb, Alemanha) usando as seguintes condições: temperatura entre 22 e 350 °C, com uma taxa de aquecimento de 2°C/min e uma atmosfera inerte. Para todas as análises, as respectivas linhas de base foram inicialmente obtidas [25].

#### **5.4.10. Atividade antioxidante**

Foram seguidos os mesmos protocolos utilizados para avaliar a atividade antioxidante do OC, com algumas alterações. Para o ensaio do DPPH, foram adicionados 3 discos das amostras (6 mm de diâmetro) a 2.9 mL de uma solução metanólica de DPPH (0.1 mM). Em seguida, as absorvências foram medidas a 517 nm a cada 30 minutos, durante 5 h, contra um branco de metanol [108]. Para o teste de branqueamento do  $\beta$ -caroteno, foram adicionados 3 discos das amostras (6 mm de diâmetro) aos 5 mL da emulsão de  $\beta$ -caroteno, ácido linoleico, Tween e clorofórmio [108].

#### **5.4.11. Propriedades antimicrobianas**

Foi seguido o mesmo protocolo do ensaio de difusão em agar descrito para o OC, substituindo os discos de celulose estéreis por discos das amostras (6 mm de diâmetro) preparados em condições de assepsia [108].

## Capítulo 6 – Resultados e Discussão

Neste trabalho foi estudada a composição química do OC e as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, e foram estudados filmes de zeína com ácido oleico (AO) e glicerol (GLY) (filme controlo-FC), e com OC (FOC) e os seus laminados (LFC e LFOC) para verificar as suas capacidades para formar uma embalagem alimentar, tendo sido analisadas várias propriedades como, a barreira ao vapor de água e oxigénio, propriedades óticas e de superfície, propriedades físicas, propriedades antioxidantes e antimicrobianas, as quais permitiram fazer uma caracterização geral dos materiais produzidos.

### 6.1 Caracterização do óleo essencial de cipreste

#### 6.1.1 Análise química do óleo essencial de cipreste

Os resultados da análise à composição química do OC estudado neste trabalho estão apresentados na Tabela 2. Foram identificados 51 compostos presentes no OC, tendo sido 98.66% da sua composição química identificada. Os compostos cuja percentagem relativa é superior a 1% foram o  $\alpha$ -Pinene,  $\beta$ -Pinene,  $\Delta$ -3-Carene,  $\beta$ -Myrcene, Limonene,  $\alpha$ -Terpinolene,  $\alpha$ -Terpinyl acetate, resultados que estão consistentes com trabalhos anteriormente publicados em que  $\alpha$ -Pinene, e  $\Delta$ -3-Carene foram os principais constituintes do OC [113]. O  $\alpha$ -Pinene é o composto principal presente no OC com uma percentagem de 52.77%, é um terpeno tal como o  $\beta$ -Pinene,  $\Delta$ -3-Carene,  $\beta$ -Myrcene, Limonene,  $\alpha$ -Terpinolene, todos eles com a fórmula química ( $C_{10}H_{16}$ ), e o  $\alpha$ -Terpinyl acetate com a fórmula química ( $C_{12}H_{20}O_2$ ), sendo composto maioritariamente por monoterpenos. Os monoterpenos são hidrocarbonetos aromáticos, os principais constituintes dos OE de várias plantas e responsáveis pela produção de sabor e aroma, sendo utilizados em aromaterapia, fragrâncias de perfumes e na medicina [114,115]. O Limonene tem um aroma cítrico, é bactericida, antifúngico e anti-carcinogénico, tem sido usado como aditivo de aroma e fragrância em produtos de limpeza, cosméticos, alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos [116]. O  $\beta$ -Myrcene tem um aroma terroso meio amargo, tem propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antibióticas [117], o  $\alpha$ -Pinene e  $\beta$ -Pinene têm um aroma a pinheiro, podem ser encontrados em espécies de árvores e plantas mediterrânicas, têm diversas aplicações, como agentes fungicidas, aromatizantes, fragrâncias, antivirais e antimicrobianos [118]. O  $\Delta$ -3-Carene tem um aroma doce, é usado no tratamento de distúrbios na regulação de líquidos no corpo humano [117], o  $\alpha$ -Terpinyl acetate tem a capacidade de potenciar os sabores dos alimentos, estando presente em alguns alimentos [119]. O  $\alpha$ -Terpinolene é usado como aditivo alimentar, por exemplo, em produtos de panificação, gelados, refrigerantes e doces [120].

Tabela 2: Análise química do óleo essencial de cipreste.

Compostos	% Relativa	Especificação (ISO 20809:2017)
Santene	0.07	-
Tricyclene	0.19	-
$\alpha$ -Pinene	<b>52.77</b>	40-60
$\alpha$ -Thujene	0.75	0.5-2
$\alpha$ -Fenchene	0.86	0.5-2
Camphene	0.31	-
$\beta$ -Pinene	<b>2.38</b>	0.5-3
Sabinene	0.52	0.5-2
Verbenene	0.02	-
$\Delta$ -3-Carene	<b>22.85</b>	16-27
$\beta$ -Myrcene	<b>1.97</b>	1-3.5
$\alpha$ -Phellandrene	0.06	-
3,7,7-Trimethyl-1,3,5-cycloheptatriene	0.10	-
$\alpha$ -Terpinene	0.33	-
Sylvestrene	0.21	-
Limonene	<b>3.44</b>	2-5
$\beta$ -Phellandrene	0.30	-
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimene	0.04	-
$\gamma$ -Terpinene	0.72	-
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimene	0.04	-
<i>m</i> -Cymene	0.06	-
<i>p</i> -Cymene	0.74	-
Isoterpinolene	0.15	-
$\alpha$ -Terpinolene	<b>2.29</b>	-
$\alpha$ -Pinene epoxide	0.03	-
$\alpha$ - <i>p</i> -Dimethylstyrene	0.10	-
$\alpha$ -Cubebene	0.11	-
$\alpha$ -Copaene	0.06	-
Camphor	0.44	-
Linalool	0.57	-
<i>n</i> -Octanol	0.01	-
$\alpha$ -Cedrene	0.03	-
$\beta$ -Funebrene	0.26	-
Bornyl acetate	0.38	-
Terpinen-4-ol	<b>1.25</b>	0.5-2
<i>trans</i> - $\beta$ -Caryophyllene + Terpinen-4-ol Acetate	0.40	-
Umbellulone	0.09	-
<i>trans</i> -Muurolo-3,5-diene	0.02	-

<i>trans</i> -Pinocarveol	0.04	-
<i>cis</i> -Muuroala-4(14),5-diene	0.02	-
<b><math>\alpha</math>-Humulene + Terpinyl formate</b>	0.43	-
<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	0.36	-
<b><math>\alpha</math>-Amorphene</b>	0.17	-
<b><math>\alpha</math>-Terpinyl acetate</b>	<b>1.46</b>	1-4
<b>Germacrene D</b>	0.20	0.2-1
<b><math>\gamma</math>-Amorphene</b>	0.03	-
<b><math>\alpha</math>-Muurolene</b>	0.08	-
<b><math>\Delta</math>-Cadinene</b>	0.24	-
<b><math>\gamma</math>-Cadinene</b>	0.08	-
<b><i>p</i>-Cymen-8-ol</b>	0.13	-
<b><math>\alpha</math>-Cedrol</b>	0.50	0.5-3
<b>Total identificado</b>	<b>98.66 %</b>	<b>51 compostos</b>

### 6.1.2 Análise das propriedades antioxidantes do óleo essencial de cipreste

Com o objetivo de analisar as propriedades antioxidantes do OC utilizaram-se dois métodos *in vitro*. A capacidade de sequestração de radicais livres foi medida pelo método do DPPH e os resultados encontram-se na Tabela 3. No método do DPPH, a capacidade do OC para atuar como dador de átomos de hidrogénio ou elétrões na conversão do DPPH na sua forma reduzida DPPH-H, foi avaliada [121]. O OC mostrou capacidade para sequestrar os radicais livres de DPPH ao transformar a solução com DPPH de cor roxa para cor amarela, demonstrando uma forte atividade antioxidante ( $IC_{50} = 3.17\%$ , IAA = 1.63) [108,122]. Comparando os resultados obtidos com o controlo positivo, o ácido gálico que segundo Scherer e Godoy (2009) [109] apresenta propriedades antioxidantes muito fortes e uma ótima capacidade de sequestrar radicais livres de DPPH, este apresenta um valor de IAA quase 14 vezes maior do que o do OC, e um  $IC_{50}$  quase 14 vezes inferior. O ácido gálico é um composto fenólico, que pertence a um grupo de antioxidantes que promovem a captura ou inibição dos radicais livres e são conhecidos por apresentarem uma atividade antioxidante muito forte, o OC também apresenta uma atividade antioxidante forte [109,123]. Foi também realizado o teste de branqueamento do  $\beta$ -caroteno para avaliar a capacidade do OC em inibir a peroxidação lipídica, os resultados foram comparados com os obtidos para o BHT, um antioxidante de referência, Tabela 3 [108]. Quanto maior a eficácia do antioxidante, mais lenta será a diminuição da cor da emulsão. Uma menor diminuição na absorvência do  $\beta$ -caroteno, indica menor taxa de oxidação do ácido linoleico e maior atividade antioxidante [122]. O  $IC_{50}$  do OC para o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico é 0.32%, comparando com o  $IC_{50}$  obtido pelo BHT 3.58%, este resultado indica que a concentração de OC necessária para inibir 50% da oxidação do ácido linoleico é 11 vezes inferior à do BHT [108]. O BHT é um antioxidante sintético muitas vezes usado na indústria de alimentos para evitar a oxidação de gorduras, as quais levam a rancificação. Uma vez que o OC apresentou maior atividade antioxidante

comparativamente ao BHT, pode dizer-se que apresenta potencial para ser utilizado como antioxidante, sendo necessário, no entanto, complementar este estudo.

Tabela 3: Propriedades antioxidantes do óleo essencial de cipreste (média ± desvio-padrão).

Amostra	Método do DPPH			Teste de branqueamento do $\beta$ -caroteno
	IC <sub>50</sub> (% - v/v)	IAA	Atividade antioxidante	IC <sub>50</sub> (% - v/v)
OC	3.17 ± 0.19	1.63 ± 0.21	Forte	0.32 ± 0.02
BHT	-	-	-	3.58 <sup>a</sup> ± 0.01
Ácido gálico	0.23 <sup>a</sup>	22.56 <sup>a</sup>	Muito forte <sup>a</sup>	-

<sup>a</sup>: Valores retirados de [108]

### 6.1.3 Análise das propriedades antimicrobianas do óleo essencial de cipreste

Foram realizados vários testes para analisar a atividade antimicrobiana do OC, entre os quais, a difusão em agar. A

Tabela 4 mostra os resultados obtidos, onde o OC apresentou atividade antimicrobiana para todas as bactérias testadas.

Tabela 4: Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cipreste pela medição dos halos de inibição (média ± desvio-padrão).

Amostra	Diâmetros dos halos de inibição (mm)		
OC	Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27.51 ± 4.26
		<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	12.78 ± 2.16
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	7.87 ± 1.05
		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	15.21 ± 0.50
	Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	23.80 ± 3.73
		<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	23.17 ± 3.86
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11.40 ± 1.39

As bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes do que as Gram-positivas ao efeito dos OE em testes de difusão em agar, apresentando diâmetros de halos de inibição menores. A literatura refere que a resistência das bactérias Gram-negativas é devida às características da membrana externa desses microrganismos que lhes confere uma superfície bacteriana com forte hidrofobicidade, levando a que atue como uma barreira robusta [124,125].

O OC apresenta grande atividade antibacteriana por apresentar halos de inibição consideráveis tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas, tendo apresentado o maior halo de inibição para *S. aureus* ATCC 25923 com um valor de 27.51 mm, e o menor para *E. faecalis* ATCC 29212 (7.87 mm), o menor entre todas as bactérias testadas. O OC apresentou também halos de inibição consideráveis para as bactérias Gram-negativas, evidenciando boas propriedades antibacterianas.

A capacidade antimicrobiana de um composto pode ser quantificada com base na concentração mínima desse composto capaz de inibir completamente o crescimento de um determinado microrganismo, esse valor é chamado de *Minimum Inhibitory Concentration* do inglês e em português de Concentração Mínima Inibitória (CMI). Os valores de CMI obtidos para o OC encontram-se na Tabela 5. O OC inibiu todos os microrganismos testados. O microrganismo mais sensível ao OC foi o *B. cereus* ATCC 11778 com um valor de CMI de 4 µL/mL, seguindo-se todas as Gram-negativas com um valor de CMI de 16 µL/mL, contrastando com estes resultados estão *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* LMG 16779, e *E. faecalis* ATCC 29212 cujos valores de CMI foram superiores ao observado para as bactérias Gram-negativas, com um valor de 32 µL/mL idêntico para todas.

A atividade antimicrobiana do OC poderá, em parte, estar associada aos seus principais constituintes, como  $\alpha$ -Pinene e  $\alpha$ -Cedrol [105]

Tabela 5: Valor de CMI do óleo essencial de cipreste (valores modais).

<b>Amostra</b>	<b>CMI (µL/mL)</b>		
<b>OC</b>	<b>Gram-positivas</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	32
		<b><i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779</b>	32
		<b><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212</b>	32
		<b><i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778</b>	4
	<b>Gram-negativas</b>	<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>	16
		<b><i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311</b>	16
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</b>		16	

## 6.2 Caracterização do papel, filmes e laminados

### 6.2.1 Análise da microestrutura

A microscopia eletrônica de varrimento é uma técnica útil na observação da microestrutura dos filmes, laminados e papel, pois fornece informações importantes sobre a estrutura das amostras e o arranjo dos constituintes que a compõem [111]. Os laminados são compostos pelo papel e pelos filmes de zeína (com e sem OC), os quais foram obtidos usando um processo mecânico de calandragem, sob condições previamente otimizadas. Inicialmente, os filmes foram pulverizados com etanol, na face

que contacta com o papel, este processo é essencial para garantir a adesão entre os dois materiais, a qual resulta das ligações de hidrogénio formadas e que impedem a separação das duas camadas quando os laminados são manuseados, obtendo-se assim, laminados finos, flexíveis e opacos [99].

As imagens SEM do corte transversal das amostras, encontram-se na Figura 7. Na imagem do FC pode visualizar-se que uma das faces do filme exhibe uma morfologia menos uniforme, a subcamada superior é mais compacta que a inferior. Esta diferença na morfologia das duas faces do filme poderá ter ocorrido durante a secagem do mesmo, onde os constituintes do filme podem organizar-se preferencialmente ao entrar em contacto com o ar e com a superfície das placas de Petri, podendo ocorrer diferenças na migração dos compostos ao longo da espessura do filme contribuindo assim, para a formação de duas matrizes distintas. Quanto ao FOC, a imagem de SEM revelou uma maior uniformidade em toda a secção transversal do filme comparativamente ao FC. A maior uniformidade da estrutura do FOC é resultante da adição do OC, que promove a emulsão entre todos os constituintes do filme [99]. Pode observar-se no FOC, a existência de microbolhas no interior da matriz que poderão ter sido causadas pela evaporação de compostos voláteis do OC após o processo de secagem, este acontecimento também foi observado por Antônio *et al.* (2019) quando usou óleo essencial em filmes de zeína [103,126].

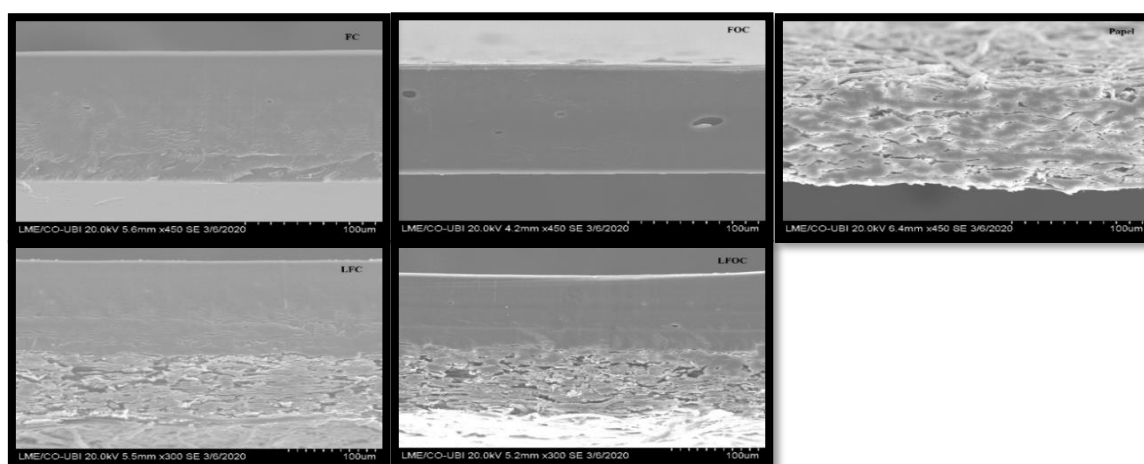


Figura 7: Imagens SEM da secção transversal dos filmes, laminados e papel.

As imagens de SEM dos cortes transversais dos laminados, tanto dos LFC como do LFOC, permitem uma fácil identificação de duas camadas, papel e filme de zeína, observando-se na camada superior o filme de zeína homogéneo ligado à camada inferior de papel, sendo este último composto por uma matriz porosa e heterogénea de fibras de celulose ligadas entre si [99]. Pode observar-se que em ambos os laminados existe uma penetração do filme na superfície do papel, não existindo nenhuma fronteira clara entre os dois constituintes [99]. O plastificante, sob condições de calandragem (pressão e temperatura), facilita a incorporação da matriz onde está inserido na superfície irregular do papel, preenchendo os vazios entre as fibras [99]. Esta incorporação dos filmes no papel pode ser documentada através da análise da espessura dos materiais apresentada na Tabela 6. Observa-se que

os filmes de zeína interagem intensivamente através de pontes de hidrogénio com a rede fibrosa do papel, contribuindo para uma maior resistência mecânica dos laminados [99].

### 6.2.2 Propriedades térmicas

A análise por DSC permite a monitorização de alterações nas propriedades físicas ou químicas dos materiais em função da temperatura, através da deteção de variações de temperatura associadas a tais processos.

Os perfis térmicos dos filmes e laminados com e sem o OC e os seus constituintes foram avaliados por DSC. Na Figura 8 encontram-se as curvas DSC da zeína, AO, OC e GLY e na Figura 9 encontram-se as curvas DSC de dos filmes e laminados com e sem OC e do papel.

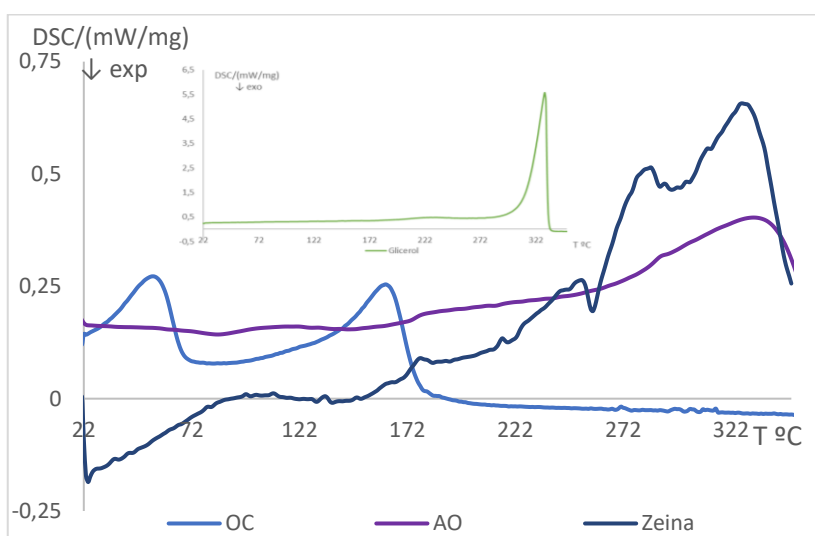


Figura 8: Curvas DSC da zeína, OC, AO, GLY.

O GLY puro é caracterizado por um único evento representando a sua pirólise, a qual corresponde à gama de temperatura compreendida entre 290 e 330 °C. Sendo o ponto de ebulição do GLY igual a 290 °C, a esta temperatura tem início o processo de evaporação seguindo-se a sua degradação, ambos os eventos são endotérmicos [127].

A curva de DSC do AO sugere dois estágios consecutivos de decomposição. O primeiro estágio registado na gama de temperatura compreendida entre 150 e 260 °C e o segundo estágio ocorre à temperatura máxima de 333 °C, no intervalo de 260 a 400 °C e poderá ser devido à degradação das ligações duplas C=C e C-H [128].

Na curva DSC do papel são observados dois eventos endotérmicos. O primeiro pico apresenta um valor máximo a 72°C e pode ser atribuído à evaporação da água livre presente na amostra. Para valores de temperatura compreendidos entre 125 e 300 °C a energia mantém-se constante e próxima de zero, indiciando a ocorrência simultânea de fenómenos exo e endotérmicos, como por exemplo combustão e reações de vaporização ou despolimerização. O segundo evento endotérmico, registado

entre 300 e 360 °C pode ser atribuído à fusão da celulose, correspondendo à quebra de ligações glicosídeas e despolimerização da celulose. De acordo com a referência, esta gama de temperatura está associada ao início da degradação térmica da celulose, compreendendo o rearranjo molecular das cadeias seguido da quebra das ligações glicosídeas e ligações *crosslinking* entre cadeias poliméricas [129].

A curva DSC do OC apresenta dois eventos endotérmicos, o primeiro evento endotérmico, registado entre 37 e 70 °C pode ser atribuído à evaporação da água existente, o segundo evento endotérmico, registado entre 140 e 170 °C pode estar relacionado com a volatilização do óleo essencial [122].

As proteínas apresentam no ensaio de DSC particularidades relacionadas com as suas estruturas tridimensionais, tal como o processo de desnaturação. A desnaturação de proteínas pela temperatura foi objeto de estudo usando análise térmica [130]. Na faixa de temperatura de 150 a 180 °C foi identificado um aumento de energia, este evento é assinalado por uma modificação no perfil linear da curva zeína, podendo estar associado à sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) [25]. Para valores de temperatura superiores, as cadeias da proteína entram num estado flexível [25]. Os sucessivos picos endotérmicos observados na curva de DSC da zeína são atribuídos à desestabilização das interações físicas, tais como, ligações de hidrogénio, interações eletrostáticas e interações dipolo-dipolo, as quais causam a perda da estrutura tridimensional da proteína [88,131].

Os termogramas dos filmes à base de zeína mostram dois picos endotérmicos. O primeiro evento registado na faixa de temperatura de 50 °C a 120 °C está habitualmente associado à evaporação de água livre presente no filme, no entanto, poderá igualmente estar associado à libertação de componentes voláteis. Poderá ainda ser atribuído ao início do relaxamento da cadeia proteica. Nesta faixa de temperatura podem ocorrer desagregação das ligações de hidrogénio presentes na estrutura da zeína. Comparando os diagramas energéticos dos dois filmes de zeína (FC e FOC), pode observar-se que o primeiro apresenta um pico mais energético comparativamente ao FOC, revelando maior estabilidade. Possivelmente, a presença de óleo essencial na matriz do filme reduz as interações intermoleculares das cadeias poliméricas, reduzindo simultaneamente a retenção de água livre na matriz, podendo afirmar-se que os filmes sem óleo essencial contêm maior quantidade de água livre.

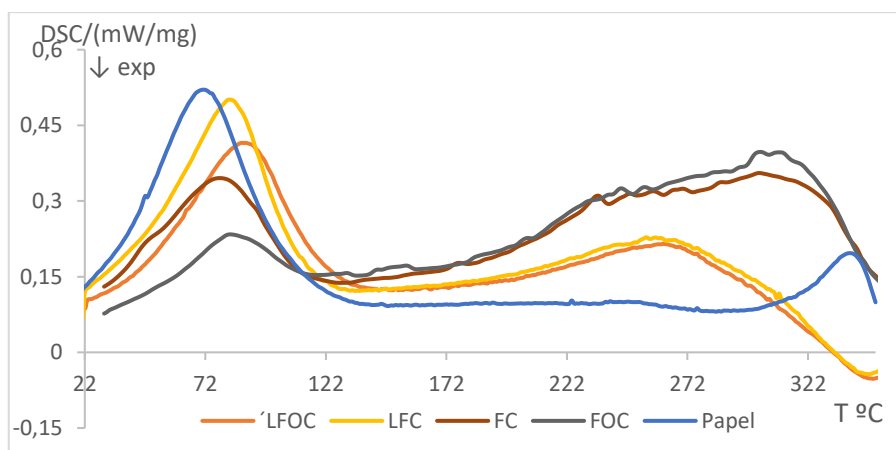


Figura 9 Curvas DSC dos filmes, laminados e papel

O segundo evento igualmente endotérmico é registado na gama de temperatura compreendida entre 200 a 325 °C, podendo estar associado aos desdobramentos da estrutura tridimensional da proteína ou à despolimerização parcial das cadeias [18,25]. Observou-se também, a degradação térmica da prolamina entre 287 e 301 °C [131]. É de salientar que neste segundo evento não são registadas diferenças significativas entre os dois tipos de filmes e ambos os traçados apresentam nesta etapa uma linha com alguma irregularidade, igualmente observada no diagrama da zeína pura e que foi atribuída à desnaturação da proteína. Ao comparar as curvas de DSC dos filmes e zeína verifica-se a diminuição dessas irregularidades podendo esta alteração estar associada ao aumento da resistência devido à presença dos plastificantes GLY e AO, este aumento demonstra a compatibilidade existente entre os plastificantes e o biopolímero [132].

O diagrama de DSC das amostras de laminados apresenta um traçado energético muito semelhante ao dos filmes. Da análise térmica salientam-se duas incidências de natureza endotérmica, o primeiro pico com um valor energético ligeiramente superior ao obtido para os filmes, pode ser atribuído à evaporação da água presente na amostra e também à quebra de ligações intermoleculares no mesmo [25]. Este evento térmico é extremamente semelhante ao registado na amostra de papel, embora para este, o evento tenha início a uma temperatura ligeiramente inferior, comprovando a maior facilidade de degradação térmica da celulose. Apesar do valor energético dos laminados e do papel ser semelhante, ele é bastante superior aos dos respetivos filmes, evidenciando a presença de maior quantidade de água livre nestes materiais, resultante do carácter hidrofílico da celulose. No entanto, observa-se uma pequena diferença energética entre o laminado controlo, LFC e o LFOC, possivelmente atribuída à presença do óleo essencial no filme do LFOC, este resultado foi igualmente registado para os filmes. O segundo evento endotérmico encontra-se no intervalo de temperatura compreendido entre 200 e 300 °C, este pico pode ser atribuído à despolimerização parcial das cadeias poliméricas da celulose e da zeína [18]. Salienta-se, nesta etapa, o menor valor energético dos laminados comparativamente aos filmes de zeína, mas substancialmente superior ao papel. Finalmente, encontra-se um evento de natureza exotérmica, com valor máximo à temperatura de 350 °C, esta incidência poderá ser atribuída à formação de compostos voláteis resultantes da despolimerização da celulose, constituinte principal do papel no laminado.

Pode ainda observar-se que as curvas DSC dos filmes e laminados com OC exibem um traçado gráfico semelhante ao dos respetivos controlos, salienta-se no entanto, a existência de um retardamento no aparecimento do primeiro evento endotérmico, o qual pode ser consequência da presença do óleo essencial, o qual melhorou a estabilidade térmica [79].

### **6.2.3 Análise FTIR**

Foi realizada a análise FTIR ao papel, filmes e laminados com e sem OC estando os resultados da espetroscopia apresentados na Figura 10.

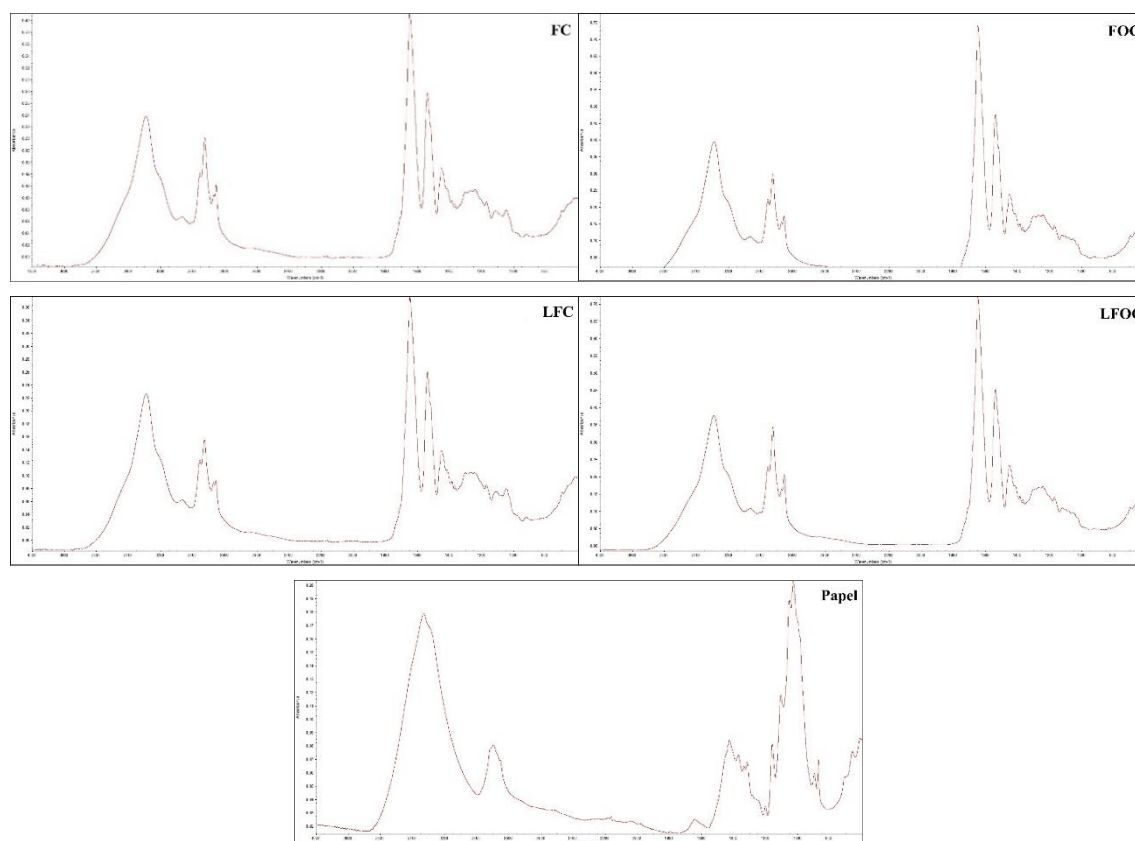


Figura 10: Análise FTIR dos filmes, laminados e papel.

Os resultados obtidos na análise a ambos os lados do papel, antes e após calandragem, foram semelhantes, confirmando que esta operação não alterou quimicamente a superfície do papel.

No espectro do papel, a banda detetada a  $3350\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao alongamento das ligações O-H do grupo hidroxilo, pico característico nos polissacáridos, aos  $2900\text{ cm}^{-1}$  a banda é atribuída à vibração de alongamento das ligações C-H de todos os constituintes do hidrocarboneto nos polissacáridos, a banda observada a  $1650\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração das moléculas de água absorvidas na celulose, a banda de  $1425\text{ cm}^{-1}$  está associada à estrutura cristalina da celulose, ligações H-C-H e O-C-H, as bandas de  $1360\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1160$  e  $950\text{ cm}^{-1}$  pertencem às vibrações de alongamento e flexão das ligações  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}$ ,  $-\text{OH}$  e  $\text{CO}$  na celulose, enquanto a banda aos  $897\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à região amorfa da celulose [133–135].

Na análise comparativa dos espectros observa-se uma banda aos  $3300\text{ cm}^{-1}$  nos filmes e laminados com e sem OC, característica da amida da zeína e que está relacionada com o estiramento das ligações N-H e O-H dos aminoácidos. A banda da amida I que surge no número de onda próximo de  $1650\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento do grupo carbonilo (C=O) da amida do péptido. A banda da amida II surge aos  $1540\text{ cm}^{-1}$  corresponde às vibrações de deformação angular da ligação N-H e vibrações de estiramento das ligações C-H. A banda da amida III que surge próximo dos  $1260\text{ cm}^{-1}$  pertence às vibrações de deformação axial das ligações C-N e vibrações de flexão do grupo carbonilo C=O. Por

último, a banda de absorção que surge aos 1650 cm<sup>-1</sup> relativa à amida I indica a existência de hélices- $\alpha$  [136,137].

No espectro do OC estudado por Chen *et al.* (2018) [122], foram detetadas bandas entre 1680-1635 cm<sup>-1</sup> referentes a um alceno trissubstituído, com ligações C=C associadas a um total de três átomos de carbono. Foi possível também observar-se os compostos dominantes do OC, esses compostos foram identificados como terpenos, correspondendo aos grupos vinilo e vinilideno [122], estes terpenos foram identificados na análise química que se encontra na Tabela 2.

Em síntese, os espectros de FTIR dos filmes e laminados com e sem OC incorporado apresentam como principal diferença o aumento da absorvência das suas bandas nas amostras com OC comparativamente aos filmes e laminados sem OC.

### 6.2.4 Propriedades estruturais e mecânicas

Os filmes de zeína, laminados, com e sem OC, e o papel foram caracterizados em termos das suas propriedades estruturais e mecânicas estando os resultados apresentados na Tabela 6.

A espessura é um fator importante na produção de filmes e laminados pois esta pode influenciar as propriedades mecânicas e de barreira, contribuindo também para a proteção dos alimentos [138].

Na análise da microestrutura dos laminados, realizada no ponto 6.2.1 foi mencionada a inclusão de uma pequena fração de filme na superfície do papel durante a produção dos laminados, esta constatação pode ser confirmada através dos resultados apresentados na Tabela 6. Uma vez que os laminados apresentam espessuras inferiores à soma dos seus constituintes. Estes resultados confirmam que os filmes, com e sem OC, penetram na estrutura superficial do papel. No entanto, a redução de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  será principalmente resultante do processo de calandragem [99].

Tabela 6: Gramagem, espessura e propriedades mecânicas das amostras (média  $\pm$  desvio-padrão).

Amostra	Propriedades Estruturais		Propriedades Mecânicas		
	Gramagem (g/m <sup>2</sup> )	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Tensão de rutura (MPa)	Índice de tração (Nm/g)	Módulo de Young (MPa)
<b>Papel</b>	81.02 $\pm$ 0.22	104 $\pm$ 0.69	54.26 $\pm$ 1.76	69.7 $\pm$ 2.3	5012.03 $\pm$ 423.81
<b>FC</b>	115.19 $\pm$ 4.61	126 $\pm$ 7.28	26.78 $\pm$ 1.76	30.4 $\pm$ 2.0	994.92 $\pm$ 65.98
<b>FOC</b>	110.67 $\pm$ 5.60	118 $\pm$ 6.95	22.38 $\pm$ 4.12	23.8 $\pm$ 4.4	977.96 $\pm$ 70.89
<b>LFC</b>	190.10 $\pm$ 2.72	207 $\pm$ 7.03	44.96 $\pm$ 1.63	48.7 $\pm$ 1.8	3062.75 $\pm$ 138.39
<b>LFOC</b>	187.78 $\pm$ 1.28	198 $\pm$ 6.99	48.12 $\pm$ 2.30	50.8 $\pm$ 2.4	2877.88 $\pm$ 82.43

Os filmes de zeína são caracterizados por serem rígidos e quebradiços, pelo que é necessário a adição de plastificantes, como o GLY e AO para lhes proporcionar alguma plasticidade. No entanto, estes aditivos também alteram as propriedades mecânicas dos filmes de zeína. O caráter hidrofílico do GLY e hidrofóbico do AO origina interações químicas e físicas diferentes entre o plastificante e a zeína. A

interação hidrofóbica é a principal responsável pelo efeito plastificante do AO, enquanto as ligações de hidrogénio formadas com grupos amida são as principais responsáveis pelo efeito plastificante do GLY [87,92]. Segundo o estudo de Xu *et al* (2012)[87] a incorporação do AO na matriz da zeína tem uma maior influencia no aumento da flexibilidade do filme, comparativamente ao GLY. A avaliação das propriedades mecânicas dos filmes ou laminados é muito importante no estabelecimento dos requisitos necessários das embalagens, de forma a garantir a integridade física e durabilidade das mesmas, devendo possuir boa resistência à tração e alongamento [25,87].

O comportamento mecânico dos laminados depende de cada um dos materiais que é usado no conjunto. Os resultados indicam que as propriedades dos laminados foram essencialmente influenciadas pelo papel, como se pode verificar pelos dados apresentados na Tabela 6. A tensão de rutura, índice de tração e módulo de Young do laminado apresentam valores próximos aos do papel, este resultado pode ser explicado pela forte resistência deste último constituinte, a qual resulta das ligações químicas e físicas da sua matriz fibrosa [99].

A tensão de rutura dos filmes, de 26.78 MPa para o FC e 22.38 MPa para o FOC, sugere que o OC possa diminuir a tensão de rutura, este efeito pode ser explicado pela substituição parcial de interações polímero-polímero mais fortes por interações polímero-óleo essencial mais fracas na matriz do filme na presença do OC, o que pode enfraquecer a estrutura da matriz e, portanto, a resistência à tração dos filmes diminui [126]. No entanto, os respetivos laminados apresentam uma inversão nesta propriedade, respetivamente com 44.96 MPa para o LFC e 48.12 MPa para o LFOC, este resultado pode ser resultado da maior facilidade de ligação entre o filme e o papel devido à presença do OC. Salienta-se um aumento de 1.7 vezes para o primeiro e 2.2 vezes para o segundo. O valor da tensão de rutura dos laminados, cerca de 2 vezes superior aos dos filmes é originado pelas excelentes propriedades mecânicas do papel, o qual apresenta uma tensão de rutura de 54.26 MPa, valor ligeiramente superior ao apresentado pelos dos laminados. O aumento da tensão de rutura dos laminados em relação aos filmes mostra igualmente, que existe uma boa coesão entre os filmes e o papel resultante do processo de calandragem.

À semelhança da tensão de rutura, os valores do índice de tração dos filmes aumentaram quando incorporados ao papel, no caso do FC com 30.4 Nm/g passou para 48.7 Nm/g no LFC, 1.6 vezes superior, enquanto o FOC com 23.8 Nm/g passou para 50.8 Nm/g no LFOC, valor 2.1 vezes superior, indicando que o processo de laminação também melhorou o índice de tração.

No que concerne ao módulo de Young e comparando ambos os materiais com e sem óleo essencial, verifica-se que os filmes e laminados que contêm OC apresentam valores mais baixos de resistência intrínseca, provavelmente pela menor capacidade de se formarem ligações devido à presença das microbolhas resultantes do processo de homogeneização do óleo essencial [126]. Comparando os resultados dos filmes e respetivos laminados verifica-se que os LFC apresentaram um aumento 3 vezes superior no módulo de Young em relação ao FC, enquanto os LFOC este aumento é ligeiramente inferior.

Os valores superiores das propriedades mecânicas nos laminados comparativamente aos respectivos filmes mostram que o novo material, resultante da conjugação do filme com o papel é um material mais resistente, capaz de manter a sua integridade durante o transporte, armazenamento e entrega ao consumidor.

### 6.2.5 Propriedades de barreira

As propriedades barreira dos filmes e laminados são importantes para avaliar as condições de preservação dos alimentos e o uso pretendido [18]. A permeabilidade ao vapor de água e a permeabilidade ao oxigénio são dois indicadores importantes estudados em aplicações de embalagens de alimentos, pois se os resultados forem favoráveis ao tipo de alimento a ser embalado, irá aumentar o seu tempo de prateleira [138]. A difusão do vapor de água e oxigénio através do filme ou laminado são causadas pelas taxas de adsorção, difusão e dessorção, onde as moléculas de gás são difundidas numa das faces da amostra, movidas pelo espaço entre os as ligações dos polímeros e ocorre a dessorção da superfície do polímero para o outro lado da amostra [138]. Os resultados da permeabilidade ao vapor de água e ao oxigénio encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Propriedades barreira dos filmes e laminados (média  $\pm$  desvio-padrão).

Amostra	WVTR (g/(dia.m <sup>2</sup> ))	WVP ( $\times 10^{-11}$ g/(Pa.s.m))	OTR (cm <sup>3</sup> /(m <sup>2</sup> .dia))	OP (cm <sup>3</sup> . $\mu$ m)/ (m <sup>2</sup> .dia.kPa)
Papel	637.33 $\pm$ 5.15	54.27 $\pm$ 0.44	*	*
FC	32.63 $\pm$ 0.59	3.39 $\pm$ 0.06	368.13 $\pm$ 35.39	491.0 $\pm$ 111.7
FOC	31.20 $\pm$ 0.01	3.07 $\pm$ 0.00	385.56 $\pm$ 17.66	502.5 $\pm$ 77.1
LFC	32.77 $\pm$ 3.14	5.50 $\pm$ 0.53	309.51 $\pm$ 0.00	727 $\pm$ 0.0
LFOC	31.52 $\pm$ 0.31	5.00 $\pm$ 0.05	328.19 $\pm$ 10.21	714.0 $\pm$ 19.8

\*Não foi possível determinar valores de OTR do papel uma vez que todas as amostras sobrecarregaram o sensor de infravermelhos.

A estrutura porosa e a natureza hidrofílica do papel tornam-no um material com fracas propriedades de barreira, que tem uma fraca capacidade de impedir a transmissão de vapor de água e de oxigénio [99].

#### 6.2.5.1 Permeabilidade ao vapor de água

A WVP foi medida de acordo com a norma ASTM E96 e está relacionada com o carácter hidrofílico e hidrofóbico das amostras e com a presença de poros na sua estrutura. O vapor de água absorvido pelo CaCl<sub>2</sub> é medido através do aumento do peso ao longo do tempo. O WVP é calculado pela equação (10). É possível dizer que WVP está diretamente relacionado com o carácter hidrofóbico e hidrofílico dos filmes, e com a porosidade dos mesmos.

Os FC e FOC apresentam valores de WVTR de 32.63 e 31.20 g/(dia.m<sup>2</sup>) respetivamente, valores substancialmente mais baixos do que os 637.33 g/(dia.m<sup>2</sup>) do papel, isto deve-se à natureza

hidrofóbica da zeína, levando a que os filmes de zeína inibam o transporte das moléculas de água [18]. Os laminados apresentam valores de WVTR semelhantes aos dos filmes que os compõem, para o LFC  $32.77 \text{ g}/(\text{dia.m}^2)$ , e para o LFOC  $31.52 \text{ g}/(\text{dia.m}^2)$ , o que indica que o processo de formação dos laminados não alterou as propriedades de barreira ao vapor de água dos seus filmes.

Os laminados, por terem uma espessura superior aos filmes fazem com que o vapor de água demore mais tempo a atravessá-los, pois existe uma maior resistência à passagem das moléculas. Os filmes e laminados com OC apresentam valores menores que os seus controlos, indicando que o OC ajuda na coesão da estrutura, retardando a passagem do vapor de água, essa coesão é visível na Figura 7, a qual mostra que os filmes e laminados com OC apresentam uma estrutura mais homogênea que os seus controlos.

Os valores da WVP são calculados tendo em conta o WVTR, a espessura das amostras e a pressão de vapor saturado da água a  $23^\circ\text{C}$ . Os LFC apresentam valores de WVP de  $5.50 \times 10^{-11} \text{ g}/(\text{Pa.s.m})$  um aumento de 1.62 vezes comparado com os valores de FC, quanto aos LFOC os valores são de  $5 \times 10^{-11} \text{ g}/(\text{Pa.s.m})$  sendo 1.63 vezes superior aos valores dos FOC, estes aumentos são proporcionais ao aumento da espessura.

O papel, por ter uma grande porosidade, apresenta valores de WVP de  $54.27 \times 10^{-11} \text{ g}/(\text{Pa.s.m})$  demonstrando ser pouco eficaz no impedimento da passagem do vapor de água. No entanto, o laminado não mantém as propriedades barreira ao vapor de água relativamente ao filme de zeína, podendo mesmo potenciar essas propriedades.

### **6.2.5.2 Permeabilidade ao oxigénio**

Normalmente, os filmes à base de proteínas e/ou polissacáridos apresentam uma baixa permeabilidade a substâncias polares como o oxigénio [139]. A OP é uma das propriedades mais importantes a ser avaliada na produção de embalagens alimentares, pois é devido à presença de oxigénio que muitas vezes está associado o fenómeno da oxidação em alimentos [18].

Os filmes compostos por proteínas globulares como a zeína, apresentam uma fraca barreira ao oxigénio em comparação com os filmes de proteínas fibrosas, como o colagénio. Isso ocorre porque as proteínas fibrosas têm uma estrutura linear, portanto, menos volume livre [140].

A OP e a OTR dos FOC foram afetadas com a incorporação do OC, tendo aumentado em comparação com o seu controlo. Este aumento da permeabilidade e da taxa de transmissão de oxigénio pode ser devida às pequenas bolhas existentes na estrutura dos FOC como se podem visualizar na Figura 7. O processo de produção dos laminados afetou a permeabilidade, fazendo com que os valores diminuíssem em relação aos filmes que os compõem [99]. Os LFC e os LFOC apresentaram valores de OTR mais baixos que os filmes, possivelmente resultado do processo de calandragem e uma boa adesão entre o filme e o papel. O processo de produção dos laminados poderá ter levado a uma melhoria da sua estrutura permitindo uma possível reorganização de algumas moléculas devido à

pressão e temperatura a que foram submetidos, conduzindo à diminuição da permeabilidade. A permeabilidade dos LFOC é menor do que a do controlo, esta diferença poderá ser devido à ausência do OC no LFC o fator diferenciador que levou ao aumento da permeabilidade. Como observado na Figura 7, os LFOC apresentam uma estrutura mais homogénea e uniforme que os LFC, neste sentido a diferença nos resultados obtidos entre os dois laminados foi a incorporação do OC, permitindo que os LFOC fossem menos permeáveis que os LFC.

### 6.2.6 Propriedade óticas

As propriedades óticas das embalagens alimentares são um dos fatores mais importantes no que concerne à influencia dos consumidores [57].

Os valores de transparência obtidos para as amostras encontram-se na Tabela 8, e os resultados da cor no sistema CIE  $L^*a^*b^*$  estão representados na Figura 11.

Tabela 8: Transparência dos filmes, laminados e papel (média  $\pm$  desvio-padrão).

Amostra	Papel	FC	FOC	LFC	LFOC
Transparência %	14.19 $\pm$ 0.06	95.82 $\pm$ 0.088	94.95 $\pm$ 0.333	31.76 $\pm$ 1.32	36.75 $\pm$ 1.77

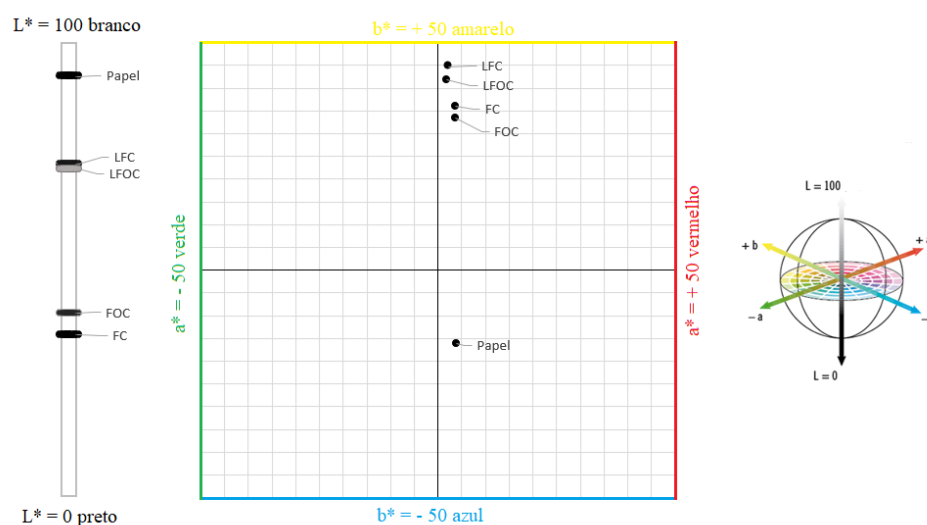


Figura 11: Gráfico das cores no sistema CIELAB do papel, filmes e laminados.

Face aos resultados pode afirmar-se que os filmes apresentam uma elevada transparência, cerca de 96% para os FC e 95% para os FOC. A diminuição da transparência resulta da adição do OC, contudo estes filmes apresentam-se mais brilhantes. Em trabalhos anteriores, verificou-se que a presença de lípidos em filmes, leva à reflexão de uma parte significativa da luz que incide na superfície dos mesmos [141]. Pelo contrário, o papel é um material opaco, apresentando uma baixa transparência (14%), consequentemente, os laminados apresentam uma transparência mais próxima dos valores do papel do que dos filmes, 32% e 37%, respetivamente para os LFC e LFOC.

Ambos os laminados apresentam elevados valores de  $L^*$  (luminosidade), próximos dos valores do papel, enquanto os filmes apresentaram valores mais baixos. Analogamente à transparência, esta diferença é causada pelo valor de  $L^*$  do papel, pois este afeta a luminosidade dos mesmos por lhes dar uma aparência mais clara que os filmes. Tanto os filmes como os laminados exibem uma cor amarelada, confirmada pelos elevados valores do parâmetro  $b^*$ , sendo, no entanto, estes valores um pouco superiores nos laminados devido à camada de papel que evidencia a cor amarelada dos mesmos. A presença do OC influencia os valores de  $b^*$  dado que filmes e laminados com OC apresentam valores mais baixos que os respetivos controlos. Relativamente ao parâmetro  $a^*$ , a adição do OC aos filmes e laminados não provocou grandes alterações comparativamente aos respetivos controlos. Os resultados obtidos na avaliação das propriedades óticas vêm fundamentar o que é possível visualizar a olho nu na Figura 12.

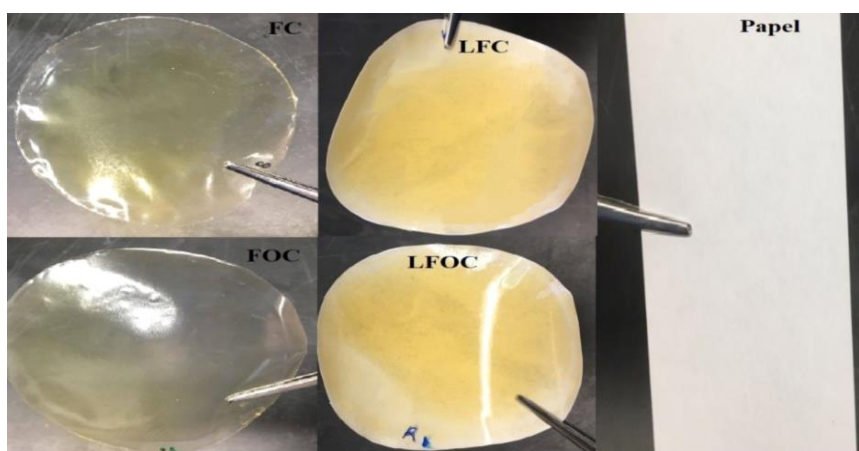


Figura 12: Aparência dos filmes, laminados e papel.

### 6.2.7 Propriedades de superfície

A medição do  $\theta$  permite obter informações sobre a hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície dos filmes e laminados. A energia livre de superfície de um sólido pode ser expressa como a soma das componentes dispersiva e polar [107,142]. Foram determinados os resultados dos  $\theta$  obtidos com os três líquidos puros sobre as amostras [107] como se pode observar na Tabela 9.

Verificou-se um aumento dos valores do  $\theta$  do papel calandrado em relação ao papel não calandrado. Este aumento poderá ser resultado da compressão a que as fibras de celulose foram sujeitas, diminuindo os espaços entre elas (menor porosidade), resultando no aumento dos  $\theta$  para os três líquidos testados. O papel usado pode classificar-se como hidrofóbico, pois apresenta valores de  $\theta$  com a água superiores a  $100^\circ$ . A medição do  $\theta$  nos filmes foi feita na face superior e inferior (a face inferior é a que contacta com a placa de Petri e a face superior a que contacta com o ar no processo de produção do filme). Verificou-se que a face inferior do FC apresenta valores de  $\theta$  maiores do que a face superior quando o líquido é a água. Como foi referido anteriormente na análise da microestrutura, estes filmes, FC, apresentam uma das faces mais compacta, provavelmente devida à

organização dos componentes do filme durante a secagem, este fenómeno poderá explicar as diferenças nos valores do  $\theta$  entre faces.

Tabela 9: Propriedades de superfície (FS- face superior, FI- face inferior) (média  $\pm$  desvio-padrão).

Amostra- Designação	Ângulo de contacto ( $^{\circ}$ )			Energia de superfície (mN/m)		
	Água	DIM	EG	Total	Dispersiva	Polar
<b>Papel n/calandrado</b>	107.91 $\pm$ 2.37	57.47 $\pm$ 2.45	79.11 $\pm$ 1.75	29.57	29.56	0.00
<b>Papel calandrado</b>	118.22 $\pm$ 0.85	64.99 $\pm$ 2.34	86.27 $\pm$ 2.18	26.77	26.37	0.40
<b>FC -FS</b>	67.66 $\pm$ 2.35	44.4 $\pm$ 3.44	61.62 $\pm$ 2.57	38.00	24.44	13.56
<b>FC -FI</b>	72.49 $\pm$ 3.29	45.85 $\pm$ 1.75	61.79 $\pm$ 1.57	36.20	26.21	9.99
<b>FOC – FS</b>	72.17 $\pm$ 2.04	43.65 $\pm$ 1.67	59.11 $\pm$ 0.97	37.50	28.13	9.37
<b>FOC – FI</b>	71.55 $\pm$ 1.29	42.81 $\pm$ 0.47	55.06 $\pm$ 2.43	39.07	30.21	8.87
<b>LFC</b>	62.18 $\pm$ 2.00	40.39 $\pm$ 2.01	55.83 $\pm$ 3.00	42.07	26.18	15.89
<b>LFOC</b>	61.27 $\pm$ 2.60	35.98 $\pm$ 1.89	57.35 $\pm$ 2.27	42.70	25.76	16.94

(diiodometano (DIM); etilenoglicol (EG))

Quanto aos valores de  $\theta$  dos FOC, não são observadas diferenças entre as duas faces, estes resultados corroboram com as imagens SEM da Figura 7. Os FOC apresentam uma estrutura compacta e homogénea, resultante da incorporação do OC. Estes filmes apresentam valores de  $\theta$  semelhantes aos obtidos na superfície inferior dos FC, podendo assim concluir-se que o OC não aumentou o valor do  $\theta$  dos filmes, mas apenas a sua uniformidade, permitindo que ambas as faces apresentem valores muito semelhantes. No entanto, tanto os FC como os FOC apresentam  $\theta$  de  $70^{\circ}$  com a água, indicando algum carácter hidrofóbico [107].

Quanto aos laminados, ambos apresentaram valores muito semelhantes entre si, tal como aconteceu com os filmes. O processo de produção dos laminados diminui a hidrofobicidade, tendo os LFC apresentando melhores resultados comparativamente aos LFOC, sendo a diferença maior de cerca de  $5^{\circ}$  para o  $\theta$  com o diiodometano, tendo os LFC e LFOC valores de  $40.39^{\circ}$  e  $35.98^{\circ}$  respetivamente.

A zeína é uma proteína constituída por aminácidos, razão pela qual apresenta uma natureza apolar, consequentemente os valores de  $\theta$  com líquidos apolares são menores do que com líquidos polares, reflexo disso são os resultados obtidos para o diiodometano. Pelo contrário, os valores de  $\theta$  com água são mais elevados, demonstrando assim o carácter hidrofóbico dos filmes de zeína [83,142]

No que concerne aos valores das energias de superfície dos FC, em consonância com os resultados dos  $\theta$ , observam-se diferenças entre as duas faces dos filmes. Assim, a face superior apresenta um valor superior de energia total, salientando-se em particular a componente polar. Confirma-se a orientação preferencial dos constituintes do filme, onde provavelmente os componentes apolares se orientam na direção da superfície do poliestireno, libertando a componente polar para a superfície

do filme. No entanto, este fenómeno não é tão evidente quando se analisam os resultados das energias de superfície dos FOC, provavelmente devido à emulsão da mistura. Relativamente aos laminados, há a salientar um aspeto interessante que está relacionado com o aumento da energia de superfície dos laminados medida na face do filme, comparativamente às energias dos filmes que compõem o laminado. Este resultado está principalmente associado ao aumento da componente polar, o qual demonstra uma diminuição da hidrofobicidade na superfície dos laminados em relação aos seus filmes, resultado igualmente observado nos valores do  $\theta$  com a água. Estes resultados não estão de acordo com o esperado, pois o material é supostamente o mesmo, pois as medições foram realizadas sobre o filme. Assim, pode admitir-se que o processo de produção dos laminados modifica a energia de superfície dos filmes, aumentando a sua energia de superfície total e particularmente a componente polar [142].

### 6.2.8. Propriedades antioxidantes

Na Figura 13 está apresentada a atividade antioxidante das amostras avaliada pelo ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH ao longo do tempo. Todos os filmes e laminados apresentaram capacidade para sequestrar os radicais livres de DPPH, exceto o papel. Após 5h de reação, o FC e FOC apresentaram 79% e 75% de inibição dos radicais livres de DPPH, respetivamente, o LFC 67% e o LFOC 65%. Os filmes e laminados sem OC apresentaram melhores resultados comparativamente aos filmes e laminados com OC, pois a zeína tem uma natureza antioxidante, sendo já muito utilizada na indústria de embalagens alimentares devido a esta sua atividade intrínseca, sem necessitar de adicionar outros antioxidantes durante o processamento das embalagens [25]. Os filmes e laminados com OC apresentam uma diminuição da capacidade de sequestração dos radicais livres de DPPH em comparação com os seus controlos, a adição do OC não melhorou a capacidade de sequestração dos radicais livres de DPPH dos filmes e laminados em que esta incorporado [109,143]. Além disso, o OC pode ficar aprisionado na estrutura da zeína, o que dificulta a sua libertação para a mistura reacional.

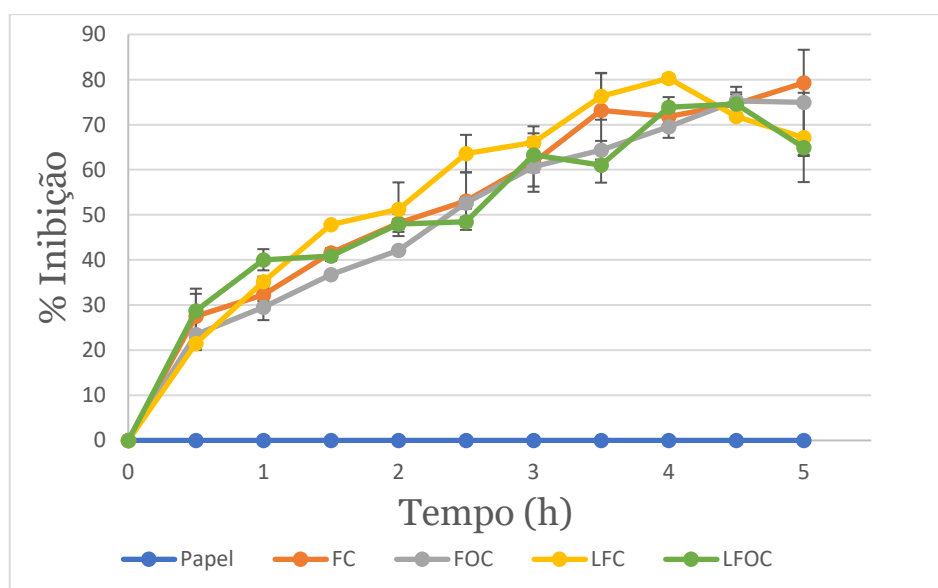


Figura 13: Atividade antioxidante do papel, filmes e laminados medida pelo ensaio de sequestração de DPPH.

Também foi avaliada a capacidade dos filmes, laminados e papel em inibir a peroxidação lipídica. Como se pode ver na Figura 14, os FOC e LFOC apresentaram 68.41 e 55.19% de inibição da peroxidação lipídica, medida pelo teste de branqueamento do  $\beta$ -caroteno, respetivamente. Valores superiores quando comparados com os seus controlos (FC e LFC) que apresentam 43.70% e 53.28%, respetivamente. Os resultados indicam que os filmes e laminados com OC apresentam potencial para serem utilizados em embalagens de alimentos que contenham elevados teores de gordura, sendo por isso suscetíveis à rancificação.

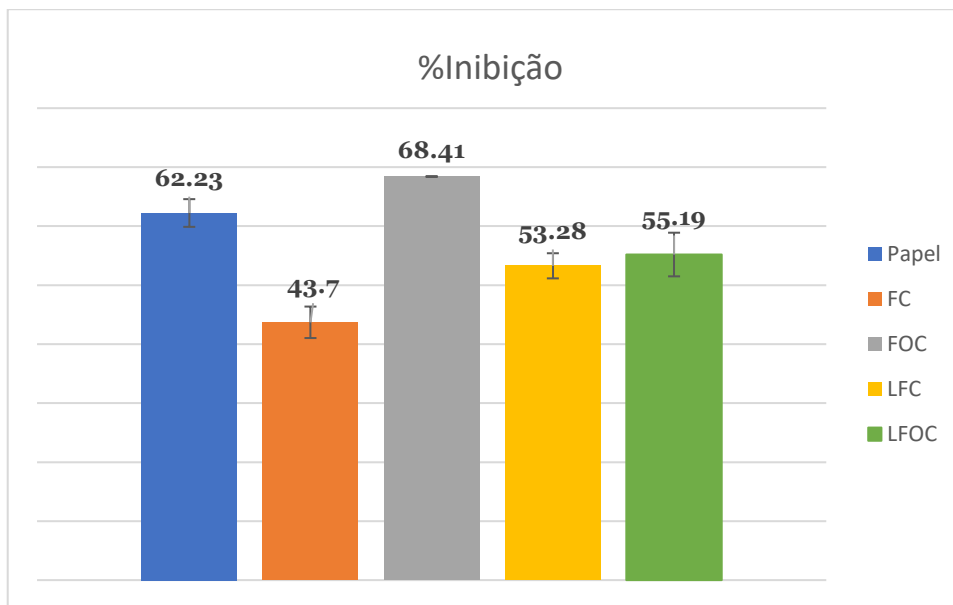


Figura 14: Atividade antioxidante do papel, filmes e laminados medida pelo ensaio do branqueamento do  $\beta$ -caroteno.

### 6.2.9. Propriedades antimicrobianas

As bactérias são os microrganismos que mais causam perigos à segurança dos alimentos. Conseguem crescer muito rapidamente com temperaturas favoráveis, e podem ser encontradas em alimentos, no solo, plantas, água e ar. Muitos dos microrganismos patogénicos não causam diretamente as doenças, mas sim as toxinas que eles produzem [61,144]. Todos os microrganismos utilizados para avaliação das propriedades antimicrobianas dos filmes e laminados, são conhecidos pelos potenciais perigos que a sua ingestão podem causar aos consumidores. Estes microrganismos podem estar presentes nos mais diversos géneros alimentícios, tais como carnes, vegetais, peixes, ovos, produtos lácteos, entre outros [144]. A segurança e qualidade dos alimentos é a principal preocupação de toda a indústria alimentar, para controlar o crescimento destes microrganismos são adicionados às embalagens agentes antimicrobianos, sendo os OE uma alternativa aos agentes antimicrobianos sintéticos [61]. Assim, neste trabalho, estudou-se atividade antimicrobiana dos filmes de zeína e laminados com e sem OC, contra *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Na Figura 15 e na Tabela 10 encontram-se os resultados obtidos relativos à atividade antimicrobiana dos filmes e laminados utilizando o teste de difusão em agar. Os tamanhos dos halos de inibição foram medidos à volta dos discos das amostras em mm, e foi analisado visualmente o crescimento das bactérias na área de contacto da amostra com a superfície de agar e por cima da amostra.

Tabela 10: Resultados do teste de difusão em meio sólido para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes e laminados através dos halos de inibição (média ± desvio-padrão).

		Amostras				
		FC	FOC	LFC	LFOC	
Diâmetros dos halos de inibição (mm)	Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00
		<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00
		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00
	Gram-negativas	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6 <sup>b</sup> ± 0.00
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6.64 ± 0.01	6 <sup>a</sup> ± 0.00	6.40 ± 0.02

<sup>a</sup>Crescimento sob a amostra.

<sup>b</sup>Inibição por contacto.

Observou-se neste estudo, que os filmes e laminados sem OC não apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias em estudo, inclusivamente, foi possível ver o crescimento microbiano em cima das amostras.

Nos filmes e laminados com OC verificou-se inibição do crescimento microbiano para todas as bactérias por contacto direto, exceto para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, onde se verificou um halo de inibição de 6.64 mm para os FOC e de 6.40 mm para os LFOC.

Os FOC e LFOC, mesmo não apresentando halos de inibição para todas as bactérias em estudo, ao não apresentarem crescimento microbiano por cima das amostras e inibirem o crescimento por contacto, ao contrario dos seus controlos, indicam que ao entrarem em contacto com as bactérias utilizadas no estudo não iram promover o seu crescimento.

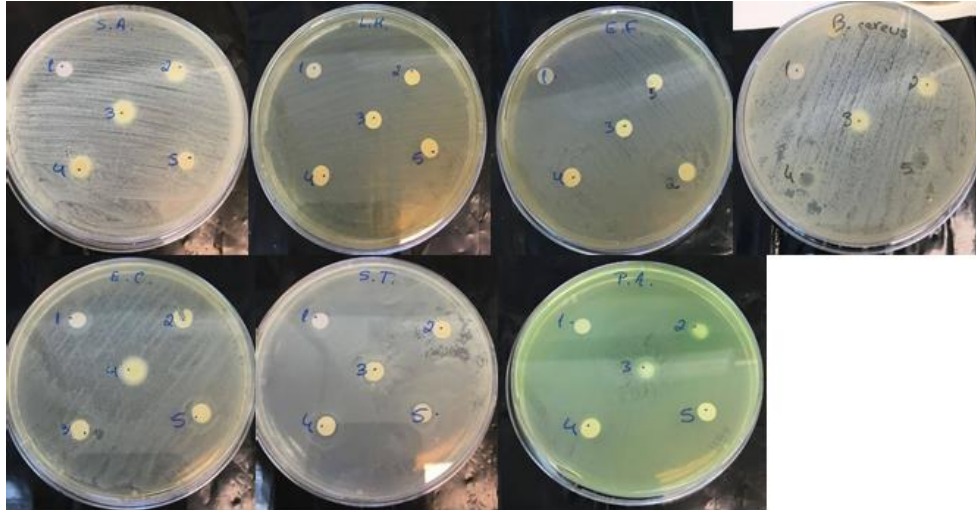


Figura 15: Testes de difusão em meio sólido para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes e laminados (1-papel; 2-FC; 3-FOC; 4-LFC; 5-LFOC) (*S. aureus* (S.A.); *L. monocytogenes* (L.M.); *E. faecalis* (E.F.); *B. cereus* (B.C.); *E. coli* (E.C); *S. Typhimurium* (S.T.); *P. aeruginosa* (P.A.)).

## Capítulo 7 – Conclusões e Perspetivas Futuras

Este estudo consistiu no desenvolvimento de laminados de celulose/zeína para embalagem alimentar, uma alternativa ecológica às embalagens convencionais de plástico, com baixa biodegradabilidade.

Para se atingir o objetivo de produzirem laminados biodegradáveis adequados para aplicações em embalagens alimentares, foi necessário começar pela produção dos filmes de zeína, para posteriormente serem produzidos os laminados por um processo de compressão. O papel e o filme de zeína ficam unidos sem adição de adesivos, esta coesão das duas camadas dos laminados é possível através da interpenetração do filme e o papel, formando ligações de hidrogénio capazes de impedir a separação das duas camadas quando os laminados são manuseados. Produziram-se dois tipos de filmes de zeína, com e sem OC.

Os filmes e laminados foram caracterizados, em termos das suas propriedades mecânicas, térmicas, óticas, hidrofóbicas, antimicrobianas, antioxidantes, permeabilidade ao oxigénio e vapor de água, microestrutura, como estava previsto nos objetivos.

Com o intuito de conferir propriedades antioxidantes e antimicrobianas aos laminados e selecionar um óleo essencial para ser incorporado nos filmes, foi efetuada uma análise química ao OC onde se verificou que ele é maioritariamente composto por monoterpenos, que são hidrocarbonetos aromáticos. Foram também efetuadas análises antimicrobianas e antioxidantes ao óleo essencial. Quanto às propriedades antioxidantes, o OC demonstrou resultados promissores para substituir o BHT, um antioxidante sintético, por apresentar no teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno um  $IC_{50}$  onze vezes inferior ao do BHT, apresentando também uma atividade antioxidante forte na capacidade de sequestrar os radicais livres do DPPH. Na análise das propriedades antimicrobianas, o OC apresentou halos de inibição no ensaio de difusão em agar para todos os microrganismos testados, e valores de CMI baixos para as bactérias Gram-negativas.

A análise das propriedades mecânicas dos filmes e seus laminados, permitiu concluir que os LFOC, ao contrário do que acontece para os filmes que o compõem, apresentaram melhores propriedades mecânicas, maior resistência e menor rigidez. Evidenciando que o OC poderá ter aumentado as interações entre o filme e o papel, facto visível na diminuição da espessura do conjunto e no SEM.

Quanto às propriedades de superfície, os laminados sofreram um aumento da componente polar, o qual demonstra uma diminuição da hidrofobicidade na superfície dos laminados em relação aos seus filmes. Os LFC apresentaram maior hidrofobicidade do que os LFOC, sendo a diferença existente entre eles pequena, o OC não melhorou as propriedades de superfície, provocando uma ligeira diminuição da hidrofobicidade dos FOC e dos LFOC em relação aos seus controlos, esta conclusão foi baseada nos resultados obtidos através da avaliação do  $\theta$  e da energia de superfície .

Relativamente à permeabilidade ao vapor de água, os FOC e os LFOC apresentaram melhores valores comparativamente aos seus controlos, indicando que o OC retarda a passagem do vapor de água. Os laminados ao serem compostos por uma camada de papel e uma camada de filme são mais espessos, apresentando os valores da permeabilidade superiores aos dos seus filmes.

Os LFOC apresentaram valores de permeabilidade ao oxigénio inferiores aos do seu controlo, permitindo concluir que a presença do OC diminui a permeabilidade ao oxigénio dos laminados, conclui-se também que o processo de produção de laminados leva a um melhoramento das propriedades de barreira.

A análise da microestrutura dos laminados e filmes, executada pela observação por SEM do corte transversal das amostras, permitiu concluir que os FOC e LFOC apresentam uma maior homogeneidade e coesão na sua estrutura do que os seus controlos, o que influencia os resultados obtidos em outras propriedades como a permeabilidade ao vapor de água e ao oxigénio.

Relativamente às propriedades antioxidantes dos filmes e laminados, observou-se nos resultados obtidos no ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH, que ambos os filmes e laminados apresentaram valores semelhantes. No ensaio do branqueamento do  $\beta$ -caroteno foram os FOC e LFOC que apresentaram os melhores valores de inibição, evidenciando a capacidade dos laminados para serem utilizados em embalagens de alimentos que contenham lípidos. Os FOC e LFOC apresentaram inibição do crescimento microbiano para todas as bactérias em estudo por contacto direto, exceto para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, onde se verificou um halo de inibição de 6.64 mm para os FOC e de 6.40 mm para os LFOC, os seus controlos não apresentaram nenhuma propriedade antibacteriana, tendo inclusive existido crescimento microbiano sobre as amostras.

Quanto às restantes propriedades, conclui-se que todos os filmes e laminados produzidos eram de cor amarela, sendo os filmes transparentes e os laminados não, por terem uma camada de papel. Verificou-se também que o OC não alterou as propriedades dos filmes e laminados. Na análise DSC, os resultados sugeriram que a incorporação do OC melhorou a estabilidade térmica dos FOC e LFOC comparativamente aos seus controlos. O OC na análise FTIR intensificou os picos das bandas já existentes nos FOC e LFOC.

Concluiu-se também que o OC melhorou propriedades importantes como a permeabilidade ao vapor de água, atividades antioxidantes e antimicrobianas, propriedades mecânicas e a microestrutura, permitindo que os FOC e LFOC se destacassem dos seus controlos.

O presente trabalho contribuiu não só para o desenvolvimento dos laminados, como também para o estudo das diversas propriedades que o OC pode conferir aos mesmos.

Em aplicações futuras deste trabalho seria interessante uma melhor compreensão de ação que o OC tem nos laminados ao nível microbiano, sendo necessário a aplicação de mais testes como análise do crescimento microbiano sobre os laminados, testar a eficácia antimicrobiana com um modelo

alimentar, efetuar um estudo da cinética de libertação dos principais compostos do OC de forma a garantir que o uso do mesmo respeita as regras da União Europeia para os materiais destinados a entrar em contacto com alimentos.

## Capítulo 8 -Referências bibliográficas

- [1] N.A. Al-Tayyar, A.M. Youssef, R. Al-hindi, "Antimicrobial food packaging based on sustainable Bio-based materials for reducing foodborne Pathogens: A review", *Food Chem.* 310, 125915, 2020;
- [2] R. Coles, D. McDowell, M. J. Kirwan, "Food Packaging Technology", Oxford (GB): Blackwell Publishing, 2003;
- [3] R. Geyer, J.R. Jambeck, K.L. Law, "Production, use, and fate of all plastics ever made", *Sci. Adv.*, 3, 7, e1700782, 2017;
- [4] L. Lebreton, B. Slat, F. Ferrari, B. Sainte-Rose, J. Aitken, R. Marthouse, S. Hajbane, S. Cunsolo, A. Schwarz, A. Levivier, K. Noble, P. Debeljak, H. Maral, R. Schoeneich-Argent, R. Brambini, J. Reisser, "Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic", *Scientific Reports.*, 8, 1, 4666, 2018;
- [5] H. Turasan, J.L. Kokini, "Advances in Understanding the Molecular Structures and Functionalities of Biodegradable Zein-Based Materials Using Spectroscopic Techniques: A Review", *Biomacromolecules.*, 18, 2, 331–354, 2017;
- [6] H. Turasan, E.A. Barber, M. Malm, J.L. Kokini, "Mechanical and spectroscopic characterization of crosslinked zein films cast from solutions of acetic acid leading to a new mechanism for the crosslinking of oleic acid plasticized zein films", *Food Res. Int.*, 108, 357–367, 2018;
- [7] J.W. Rhim, H.M. Park, C.S. Ha, "Bio-nanocomposites for food packaging applications", *Prog. Polym. Sci.*, 38, 10-11, 1629–1652, 2013;
- [8] R. Domínguez, F.J. Barba, B. Gómez, P. Putnik, D. Bursać Kovačević, M. Pateiro, E.M. Santos, J.M. Lorenzo, "Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review", *Food Res. Int.*, 113, 93–101, 2018;
- [9] A.M. Youssef, S.M. El-Sayed, "Bionanocomposites materials for food packaging applications: Concepts and future outlook", *Carbohydr. Polym.*, 193, 19–27, 2018;
- [10] M. Wihodo, C.I. Moraru, "Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review", *J. Food Eng.*, 114, 3, 292–302, 2013;
- [11] V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani, M.D. Rosa, "Biodegradable polymers for food packaging: a review", *Trends Food Sci. Technol.*, 19, 12, 634–643, 2008;
- [12] "Biofibers and Biopolymers for Biocomposites", Springer International Publishing, 2020, <https://doi.org/10.1007/978-3-030-40301-0>;
- [13] S.P. Roohi, K. Bano, M.R. Zaheer, M. Kuddus, "Biodegradable smart biopolymers for food packaging: Sustainable approach toward green environment", *Bio-Based Mater. Food Packag. Green Sustain. Adv. Packag. Mater.*, Springer Singapore, 197–216, 2018;
- [14] P. Pandit, G.T. Nadathur, S. Maiti, B. Regubalan, "Functionality And Properties Of Bio-Based Materials", *Bio-Based Mater. Food Packag. Green Sustain. Adv. Packag. Mater.*, Springer Singapore, 81–103, 2018;
- [15] S. Ahmed, "Bio-based materials for food packaging: Green and sustainable advanced

- packaging materials", Springer Singapore, 2018, <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9>;
- [16] S. Valizadeh, M. Naseri, S. Babaei, S.M.H. Hosseini, A. Imani, "Development of bioactive composite films from chitosan and carboxymethyl cellulose using glutaraldehyde, cinnamon essential oil and oleic acid", *Int. J. Biol. Macromol.* 134, 604–612, 2019;
- [17] S.Y. Lee, S.J. Lee, D.S. Choi, S.J. Hur, "Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods", *J. Sci. Food Agric.*, 95, 14, 2799–2810, 2015;
- [18] H. Sun, X. Shao, R. Jiang, Z. Shen, Z. Ma, "Mechanical and barrier properties of corn distarch phosphate-zein bilayer films by thermocompression", *Int. J. Biol. Macromol.* 118, 2076–2081, 2018;
- [19] M. Al-Hamdani, "Plain packaging policy: Preventing industry innovations", *Can J Public Heal.*, 108, 1, 98–100, 2017;
- [20] S.W. Cho, T.O.J. Blomfeldt, H. Halonen, M. Gällstedt, M.S. Hedenqvist, "Wheat gluten-laminated paperboard with improved moisture barrier properties: A new concept using a plasticizer (glycerol) containing a hydrophobic component (oleic acid)", *Int. J. Polym. Sci.*, 2012, 2012;
- [21] V. Krauter, U. Gürlich, V. Nieuwenhuizen, "Bioplastics in food packaging Background and potential applications", *Science News Food*, 2019, [www.bdsi.de/presse/nachrichten-aus-der-wissenschaft/](http://www.bdsi.de/presse/nachrichten-aus-der-wissenschaft/) (acedido 13/12/2019);
- [22] A.F. Bopp, "The Evolution of Food Preservation and Packaging", *ACS Symp. Ser.*, American Chemical Society, 1314, 211–228, 2019;
- [23] M. Sohail, D.-W. Sun, Z. Zhu, "Recent developments in intelligent packaging for enhancing food quality and safety", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 58, 15, 2650–2662, 2018;
- [24] H. Jayan, J.A. Moses, C. Anandharamakrishnan, "Testing methods for packaging materials", *Bio-Based Mater. Food Packag. Green Sustain. Adv. Packag. Mater.*, Springer Singapore., 57–79, 2018, [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9_3);
- [25] Â. Luís, F. Domingues, A. Ramos, "Production of Hydrophobic Zein-Based Films Bioinspired by The Lotus Leaf Surface: Characterization and Bioactive Properties", *Microorganisms.* 7, 8, 267, 2019;
- [26] K.S. Miller, J.M. Krochta, "Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review", *Trends Food Sci. Technol.* 8, 7, 228–237, 1997;
- [27] N. Lavoine, V. Guillard, I. Desloges, N. Gontard, J. Bras, "Active bio-based food-packaging: Diffusion and release of active substances through and from cellulose nanofiber coating toward food-packaging design", *Carbohydr. Polym.* 149, 40–50, 2016;
- [28] G.I. Olivas, G. V Barbosa-Cánovas, G. V Barbosa-C, Anovas, "Critical Reviews in Food Science and Nutrition Edible Coatings for Fresh-Cut Fruits Edible Coatings for Fresh-Cut Fruits", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 657–670, 2005;
- [29] C. Pena-Serna, J.F. Lopes-Filho, "Influence of ethanol and glycerol concentration over functional and structural properties of zein-oleic acid films", *Mater. Chem. Phys.* 142, 2-3, 580–585, 2013;
- [30] B. Regubalan, P. Pandit, S. Maiti, G.T. Nadathur, A. Mallick, "Potential bio-based edible films,

- foams, and hydrogels for food packaging”, *Bio-Based Mater. Food Packag. Green Sustain. Adv. Packag. Mater.*, Springer Singapore, 105–123, 2018, [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9_5);
- [31] "Permeability”, *Food Phys.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 233–255, 2007, [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34194-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34194-9_6);
- [32] V. Siracusa, "Food Packaging Permeability Behaviour: A Report”, *Int. J. Polym. Sci.*, 2012, 11, 2012;
- [33] P. Kofinas, R.E. Cohen, A.F. Halasa, "Gas permeability of polyethylene/poly(ethylene-propylene) semicrystalline diblock copolymers”, *Polymer (Guildf.)*, 35, 6, 1229–1235, 1994;
- [34] M. Karimi, "Diffusion in Polymer Solids and Solutions”, *Mass Transf. Chem. Eng. Process.*, InTech, 2011, <https://doi.org/10.5772/23436>;
- [35] H.M. Lai, G.W. Padua, "Water vapor barrier properties of zein films plasticized with oleic acid”, *Cereal Chem.* 75, 2, 194–199, 1998;
- [36] F.M. Fakhouri, L.C.B. Fontes, P.V.D.M. Gonçalves, C.R. Milanez, C.J. Steel, F.P. Collares-Queiroz, "Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson”, *Ciência e Tecnol. Aliment.*, 27, 2, 369–375, 2007;
- [37] L.O. Figura, A.A. Teixeira, "Food physics: Physical properties - Measurement and applications”, Springer Berlin Heidelberg, 2007, <https://doi.org/10.1007/978-3-540-34194-9>;
- [38] J.G. Brennan, B.P.F. Day, "Packaging”, *Food Process. Handb.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 291–350, 2006, <https://doi.org/10.1002/3527607579.ch9>;
- [39] S.K. Vimala Bharathi, J.A. Moses, C. Anandharamakrishnan, "Interaction phenomena between packaging and product”, *Bio-Based Mater. Food Packag. Green Sustain. Adv. Packag. Mater.*, Springer Singapore, 33–56, 2018, [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9_2);
- [40] J. Crank, "The Mathematics of Diffusion”, Clarendon Press Oxford, 1975;
- [41] X. Fang, O. Vitrac, "Predicting diffusion coefficients of chemicals in and through packaging materials”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2, 275-312, 2017;
- [42] H. Mehrer, "Diffusion in solids: fundamentals, methods, materials, diffusion-controlled processes”, Springer Ser. Solid-State Sci., 2007, <https://doi.org/10.1007/978-3-540-71488-0>;
- [43] J. Comyn, ed., "Polymer Permeability”, Springer Netherlands, Dordrecht, 1985. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-4858-7>;
- [44] E. Zeimaran, S. Pourshahrestani, I. Djordjevic, B. Pingguan-Murphy, • Nahrizul, A. Kadri, A.W. Wren, M.R. Towler, "Antibacterial properties of poly (octanediol citrate)/gallium-containing bioglass composite scaffolds”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 27, 1, 1–11, 2016;
- [45] M. Moradi, H. Tajik, S.M. Razavi Rohani, A. Mahmoudian, "Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with Zataria multiflora Boiss. essential oil and monolaurin”, *LWT - Food Sci. Technol.* 72, 37–43, 2016;
- [46] V.A. Vaclavik, E.W. Christian, "Essentials of Food Science”, 4th ed., Springer New York, New York, NY, 2014, <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9138-5>;

- [47] A. Ravve, "Principles of polymer chemistry", third edition, 3rd ed., Springer New York, 2012, <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2212-9>;
- [48] G. Wypych, "THE EFFECT OF FILLERS ON THE MECHANICAL PROPERTIES OF FILLED MATERIALS", *Handb. Fill.*, Elsevier, 467–531, 2016, <https://doi.org/10.1016/b978-1-895198-91-1.50010-5>;
- [49] D.R.H. Jones, M.F. Ashby, "Elastic Moduli", *Eng. Mater.* 1, Elsevier, 31–47, 2019, <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102051-7.00003-8>;
- [50] D.R.H. Jones, M.F. Ashby, "Physical Basis of Young's Modulus", *Eng. Mater.* 1, Elsevier, 83–94, 2019, <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102051-7.00006-3>;
- [51] M.J. Kirwan, S. Plant, J.W. Strawbridge, "Plastics in Food Packaging", *Food Beverage Packag. Technol.*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 157–212, 2011, <https://doi.org/10.1002/9781444392180.ch7>;
- [52] N. Özkaya, D. Goldsheyder, M. Nordin, D. Leger, "Fundamentals of biomechanics: Equilibrium, motion, and deformation", fourth edition, Springer International Publishing, 2016, <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44738-4>;
- [53] S. Popson, D. Malthouse, T. Crawford, M. Popson, P. Crawford, "Measurement and Control of the Optical Properties of Paper: Color, Brightness, Whiteness, Fluorescence, Opacity, Gloss", *Residual Ink*, 2nd ed., Technidyne Corporation, New Albany, USA, 1996;
- [54] "Optical Properties", *Food Phys.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 391–416, 2007, [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34194-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34194-9_11);
- [55] M. Fox, "Optical properties of solids", 2nd ed., Oxford University Press, 2010;
- [56] T. Zhong, M.P. Wolcott, H. Liu, J. Wang, "Developing chitin nanocrystals for flexible packaging coatings", *Carbohydr. Polym.* 226, 115276, 2019;
- [57] C. Vilela, C. Moreirinha, E.M. Domingues, F.M.L. Figueiredo, A. Almeida, C.S.R. Freire, "Antimicrobial and Conductive Nanocellulose-Based Films for Active and Intelligent Food Packaging", *Nanomaterials.* 9, 7, 980, 2019;
- [58] N. Pauler, "Paper Optics", 1st ed., AB Lorentzen & Wettre, Kista, Sweden, 2002;
- [59] C. Wang, G.O. Brown, D.L. Burriss, L.T.J. Korley, T.H. Epps, "Coating Architects: Manipulating Multiscale Structures To Optimize Interfacial Properties for Coating Applications", *ACS Appl. Polym. Mater.*, 1, 9, 2249–2266, 2019;
- [60] R. Bačovská, P. Wissian-Neilson, M. Alberti, J. Příhoda, L. Zárbynická, Z. Voráč, "Phenyl-methyl phosphazene derivatives for preparation and modification of hydrophobic properties of polymeric nonwoven textiles", *React. Funct. Polym.*, 100, 53–63, 2016;
- [61] M. Corrales, A. Fernández, J.H. Han, "Antimicrobial Packaging Systems", *Innov. Food Packag. Second Ed.*, Elsevier Ltd., 133–170, 2013, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00007-2>;
- [62] T. V. Duncan, "Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors", *J. Colloid Interface Sci.* 363, 1, 1–24, 2011;
- [63] HACCP - O que é, [www.asae.gov.pt/perguntas-frequentes1/haccp-o-que-e.aspx](http://www.asae.gov.pt/perguntas-frequentes1/haccp-o-que-e.aspx) (accedido 6/5/2020);
- [64] S. Silver, "Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver

- compounds”, *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 2-3, 341–353, 2003;
- [65] B.P.F. Day, L. Potter, "Active Packaging”, *Food Beverage Packag. Technol.*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 251–262, 2011, <https://doi.org/10.1002/9781444392180.ch9>;
- [66] D.S. Lee, "Antioxidative Packaging System”, *Innov. Food Packag. Second Ed.*, Elsevier Ltd., 111–131, 2013, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00006-0>;
- [67] Y.S. Lee, H.-S. Shin, J.-K. Han, M. Lee, J.R. Giacin, "Effectiveness of antioxidant-impregnated film in retarding lipid oxidation”, *J. Sci. Food Agric.* 84, 9, 993–1000, 2004;
- [68] T. Janjarasskul, P. Suppakul, "Active and intelligent packaging: The indication of quality and safety Active and intelligent packaging: The indication of quality and safety”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 5, 808-831, 2018;
- [69] H.-J. Suh, M.-S. Chung, Y.-H. Cho, J.-W. Kim, D.-H. Kim, K.-W. Han, C.-J. Kim, "Estimated daily intakes of butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) antioxidants in Korea”, *Food Addit. Contam.* 22, 12, 1176–1188, 2005;
- [70] "Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to tertiary-Butylhydroquinone (TBHQ)”, *EFSA J.* 2, 10, 84, 2004;
- [71] S. Race, *Antioxidants*, 2009. [www.foodcanmakeyouill.co.uk](http://www.foodcanmakeyouill.co.uk) (acedido 5/6/2020);
- [72] Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), (n.d.). <https://www.asae.gov.pt/cooperacao/internacional/multilateral1/efsa.aspx> (acedido 27/5/2020);
- [73] P. Kaewprachu, K. Osako, S. Benjakul, W. Tongdeesontorn, S. Rawdkuen, "Biodegradable Protein-based Films and Their Properties: A Comparative Study”, *Packag. Technol. Sci.* 29, 2, 77–90, 2016;
- [74] J.M. Milani, B. Tirgarian, "An overview of Edible Protein-Based Packaging: Main Sources, Advantages, Drawbacks, Recent Progressions and Food Applications”, *J. Packag. Technol. Res.* 4, 103–115, 2020;
- [75] T. Arfin, K. Sonawane, "Bio-based materials: Past to future”, *Bio-Based Mater. Food Packag. Green Sustain. Adv. Packag. Mater.*, Springer Singapore, 1–32, 2018, [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9_1);
- [76] S.G. Choi, S.R. Won, H.I. Rhee, "Oleic Acid and Inhibition of Glucosyltransferase”, *Olives Olive Oil Heal. Dis. Prev.*, Elsevier Inc., 1375–1383, 2010, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00153-4>;
- [77] Corn | History, Cultivation, Uses, & Description | Britannica, <https://www.britannica.com/plant/corn-plant> (acedido 4/3/2020);
- [78] R. Shukla, M. Cheryan, "Zein: The industrial protein from corn”, *Ind. Crops Prod.* 13, 3, 171–192, 2001;
- [79] N. Saadah Said, N. Mhd Sarbon, "Protein-Based Active Film as Antimicrobial Food Packaging: A Review”, *Act. Antimicrob. Food Packag.*, IntechOpen, 2019, <https://doi.org/10.5772/intechopen.80774>;
- [80] E.T. Nuss, S.A. Tanumihardjo, "Maize: A paramount staple crop in the context of global

- nutrition”, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 4, 417–436, 2010;
- [81] G. Yang, Q. Wang, C. Liu, X. Wang, S. Fan, W. Huang, "Rapid and visual detection of the main chemical compositions in maize seeds based on Raman hyperspectral imaging", *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 200, 186–194, 2018;
- [82] P. Ranum, J.P. Peña-Rosas, M.N. Garcia-Casal, "Global maize production, utilization, and consumption”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1312, 1, 105–112, 2014;
- [83] B. Ghanbarzadeh, A.R. Oromiehi, "Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis”, *Int. J. Biol. Macromol.* 43, 2, 209–215, 2008;
- [84] Y. Luo, Q. Wang, "Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review”, *J. Appl. Polym. Sci.* 131, 16, 2014;
- [85] B. Ghanbarzadeh, M. Musavi, A.R. Oromiehi, K. Rezayi, E. Razmi Rad, J. Milani, "Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films”, *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 7, 1191–1197, 2007;
- [86] W. Huo, D. Wei, W. Zhu, Z. Li, Y. Jiang, "High-elongation zein films for flexible packaging by synergistic plasticization: Preparation, structure and properties”, *J. Cereal Sci.* 79, 354–361, 2018;
- [87] H. Xu, Y. Chai, G. Zhang, "Synergistic effect of oleic acid and glycerol on zein film plasticization”, *J. Agric. Food Chem.* 60, 40, 10075–10081, 2012;
- [88] V. Müller, J.F. Piai, R. Fajardo, S.L. Fávoro, A.F. Rubira, E.C. Muniz, "Preparation and Characterization of Zein and Zein-Chitosan Microspheres with Great Prospective of Application in Controlled Drug Release”, *J. Nanomater.* 2011, 2011;
- [89] J.W. Lawton, "Zein: A History of Processing and Use”, *Cereal Chem. J.* 79, 1, 1–18, 2002;
- [90] T.J. Anderson, B.P. Lamsa, "Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: A review”, *Cereal Chem.* 88, 2, 159–173, 2011;
- [91] J. Gupta, B.W. Wilson, P. V. Vadlani, "Evaluation of green solvents for a sustainable zein extraction from ethanol industry DDGS”, *Biomass and Bioenergy.* 85, 313–319, 2016;
- [92] H.M. Lai, G.W. Padua, "Properties and microstructure of plasticized zein films”, *Cereal Chem.* 74, 6, 771–775, 1997;
- [93] S.J. Calva-Estrada, M. Jiménez-Fernández, E. Lugo-Cervantes, "Protein-Based Films: Advances in the Development of Biomaterials Applicable to Food Packaging”, *Food Eng. Rev.* 2019, 78–92, 2019;
- [94] C.B. De Almeida, E. Corradini, L.A. Forato, R. Fujihara, J.F.L. Filho, "Microstructure and thermal and functional properties of biodegradable films produced using zein”, *Polimeros.* 28, 1, 30–37, 2018;
- [95] Í. Arcan, D. Boyacı, A. Yemenicioğlu, "The Use of Zein and Its Edible Films for the Development of Food Packaging Materials”, *Ref. Modul. Food Sci.* 2017, <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21126-8>;
- [96] G.W. Padua, Q. Wang, "Controlled Self-Organization of Zein Nanostructures for Encapsulation of Food Ingredients”, *ACS Symp. Ser.*, American Chemical Society, 1007, 143–156, 2009, <https://doi.org/10.1021/bk-2009-1007.ch009>;

- [97] J.G. Brennan, "Food Processing Handbook", Wiley, 1-582, 2005, <https://doi.org/10.1002/3527607579>;
- [98] Material das embalagens cartonadas da Tetra Pak, <https://www.tetrapak.com/pt/packaging/materials> (acedido 26/5/ 2020);
- [99] A. Ramos, S. Sousa, D. V. Evtuguin, J.A.F. Gamelas, "Functionalized xylans in the production of xylan-coated paper laminates", *React. Funct. Polym.* 117, 89–96, 2017;
- [100] Y. Wu, Y. Luo, Q. Wang, "Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method", *LWT - Food Sci. Technol.* 48, 2, 283–290, 2012;
- [101] F. Froiio, A. Mosaddik, M.T. Morshed, D. Paolino, H. Fessi, A. Elaissari, "Edible Polymers for Essential Oils Encapsulation: Application in Food Preservation", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 58, 46, 20932–20945, 2019;
- [102] S. Burt, "Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review", *Int. J. Food Microbiol.* 94, 3, 223–253, 2004;
- [103] L. Antônio, S. Pereira, P. De Castro E Silva, J. Pamplona Pagnossa, K. Wilson, E. Miranda, E.S. Medeiros, R.H. Piccoli, J. Elvis De Oliveira, L.A.S. Pereira, P.C. Silva, J.P. Miranda, K.W.E. Medeiros, R.H. Oliveira, "Antimicrobial zein coatings plasticized with garlic and thyme essential oils", *Brazilian J. Food Technol.* 22, 2018135, 2019;
- [104] I.A. Nehdi, "Cupressus sempervirens var. horizontalis seed oil: Chemical composition, physicochemical characteristics, and utilizations", *Ind. Crops Prod.* 41, 1, 381–385, 2013;
- [105] S.A. Selim, M.E. Adam, S.M. Hassan, A.R. Albalawi, "Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.)", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 1, 1792014;
- [106] H. Fadel, F. Benayache, J.-C. Chalchat, G. Figueredo, P. Chalard, H. Hazmoune, S. Benayache, "Essential oil constituents of *Juniperus oxycedrus* L. and *Cupressus sempervirens* L. (*Cupressaceae*) growing in Aures region of Algeria Essential oil constituents of *Juniperus oxycedrus* L. and *Cupress*", *Nat. Prod. Res.*, 2019;
- [107] Â. Luís, E. Gallardo, A. Ramos, F. Domingues, "Design and Characterization of Bioactive Bilayer Films: Release Kinetics of Isopropyl Palmitate", *Antibiotics.*, 9, 8, 443, 2020;
- [108] Â. Luís, L. Pereira, F. Domingues, A. Ramos, "Development of a carboxymethyl xylan film containing licorice essential oil with antioxidant properties to inhibit the growth of foodborne pathogens", *LWT.* 111, 3, 218–225, 2019;
- [109] R. Scherer, H.T. Godoy, "Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method", *Food Chem.* 112, 654–658, 2009;
- [110] Â. Luís, D. Neiva, H. Pereira, J. Gominho, F. Domingues, A. Duarte, "Stumps of *Eucalyptus globulus* as a Source of Antioxidant and Antimicrobial Polyphenols", *Molecules.* 19, 10, 16428–16446, 2014;
- [111] L.C.C. Queirós, S.C.L. Sousa, A.F.S. Duarte, F.C. Domingues, A.M.M. Ramos, "Development of carboxymethyl xylan films with functional properties", *J. Food Sci. Technol.* 54, 1, 9–17, 2017;

- [112] Y. Li, Y. Bai, J. Huang, C. Yuan, T. Ding, D. Liu, Y. Hu, "Airglow discharge plasma treatment affects the surface structure and physical properties of zein films", *J. Food Eng.*, 273, 109813, 2019;
- [113] M. Jahani, M. Akaberi, M.H. Khayyat, S.A. Emami, "Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cupressus sempervirens* var. *sempervirens*, *C. sempervirens* cv. *Cereiformis* and *C. sempervirens* var. *horizontalis*", *J. Essent. Oil-Bearing Plants*. 22, 4, 917-931, 2019;
- [114] M. Winnacker, "Pinenes: Abundant and Renewable Building Blocks for a Variety of Sustainable Polymers", *Angew. Chemie Int. Ed.*, 57, 44, 14362–14371, 2018;
- [115] K.A. Wojtunik-Kulesza, K. Kasprzak, T. Oniszczyk, A. Oniszczyk, "Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent", *Chem. Biodivers.* 16, 12, 2019;
- [116] S. Nikfar, A.F. Behboudi, "Limonene", *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, Elsevier, 78–82, 2014, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00628-X>;
- [117] E.B. Russo, J. Marcu, "Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads", *Adv. Pharmacol., Academic Press Inc.*, 80, 67–134, 2017, <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004>;
- [118] B. Salehi, S. Upadhyay, I.E. Orhan, A.K. Jugran, S.L.D. Jayaweera, D.A. Dias, F. Sharopov, Y. Taheri, N. Martins, N. Baghalpour, W.C. Cho, J. Sharifi-Rad, "Therapeutic potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene: A miracle gift of nature", *Biomolecules*. 9, 11, 2019;
- [119] National Center for Biotechnology Information, "PubChem Compound Summary for CID 111037, alpha-Terpinyl acetate", <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Terpinyl-acetate> (acedido 9/9/ 2020);
- [120] M. Retajczyk, A. Wróblewska, "The Isomerization of Limonene over the Ti-SBA-15 Catalyst—The Influence of Reaction Time, Temperature, and Catalyst Content", *Catalysts*, 7, 9, 273, 2017;
- [121] A.I. Hussain, F. Anwar, S.T. Hussain Sherazi, R. Przybylski, "Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations", *Food Chem.* 108, 3, 986–995, 2008;
- [122] W.T. Chen, W.C. Chen, C.M. Ma, B. Laiwang, S.J. Shen, M.L. You, C.M. Shu, "Structural characteristics and decomposition analyses of four commercial essential oils by thermal approaches and GC/MS", *J. Therm. Anal. Calorim.* 131, 2, 1709–1719, 2018;
- [123] V.C. Ramalho, N. Jorge, "Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos", *Quim. Nova.* 29, 4, 755–760, 2006;
- [124] P. López, C. Sánchez, R. Batlle, C. Nerín, "Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains", *J. Agric. Food Chem.* 53, 6939–6946, 2005;
- [125] Â. Luís, A. Duarte, L. Pereira, F. Domingues, "Chemical Profiling and Evaluation of Antioxidant and Anti-Microbial Properties of Selected Commercial Essential Oils: A Comparative Study", *Medicines*. 4, 2, 36, 2017;
- [126] M. Jouki, S.A. Mortazavi, F.T. Yazdi, A. Koocheki, "Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil", *Carbohydr. Polym.*

- 99, 537–546, 2014;
- [127] M. Almazrouei, T. El Samad, I. Janajreh, "Thermogravimetric Kinetics and High Fidelity Analysis of Crude Glycerol", *Energy Procedia*, Elsevier Ltd, 142, 1699–1705, 2017;
- [128] R. Tajau, R. Rohani, W.N. Roslam, W. Isahak, M.Z. Salleh, "Palm Oil-Based Precursors for Development of Polymeric Delivery System", *Malaysian J. Anal. Sci.* 21, 2, 496–511, 2017;
- [129] L.C. Yeng, U. Wahit, N. Othman, "Thermal and flexural properties of regenerated cellulose(RC)/poly(3- hydroxybutyrate)(PHB)biocomposites", *J. Teknol.* 75, 107–112, 2015;
- [130] P. Relkin, "Differential scanning calorimetry: A useful tool for studying protein denaturation", *Thermochim. Acta.* 246, 2, 371–386, 1994;
- [131] I. Doğan Atik, B. Özen, F. TihmInIloğlu, "Water vapour barrier performance of corn-zein coated polypropylene (PP) packaging films", *J. Therm. Anal. Calorim.*, Springer, 94, 3, 687–693, 2008;
- [132] Y. Xia, Y. Wang, L. Chen, "Molecular structure, physicochemical characterization, and in vitro degradation of barley protein films", *J. Agric. Food Chem.* 59, 24, 13221–13229, 2011;
- [133] L.M. Proniewicz, C. Paluszkiwicz, A. Wesełucha-Birczyńska, H. Majcherczyk, A. Barański, A. Konieczna, "FT-IR and FT-Raman study of hydrothermally degraded cellulose", *J. Mol. Struct.*, Elsevier, 596, 1-3, 163–169, 2001;
- [134] S.Y. Oh, D. Il Yoo, Y. Shin, G. Seo, "FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide", *Carbohydr. Res.* 340, 3, 417–428, 2005;
- [135] V. Hospodarova, E. Singovszka, N. Stevulova, "Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials", *Am. J. Anal. Chem.* 9, 6, 303–310, 2018;
- [136] Y. Miao, R. Yang, D.Y.B. Deng, L.M. Zhang, "Poly(l-lysine) modified zein nanofibrous membranes as efficient scaffold for adhesion, proliferation, and differentiation of neural stem cells", *RSC Adv.* 7, 29, 17711–17719, 2017;
- [137] Y. Li, L.T. Lim, Y. Kakuda, "Electrospun zein fibers as carriers to stabilize (-)-epigallocatechin gallate", *J. Food Sci.* 74, 3, C233–C240, 2009;
- [138] Y. Sun, Z. Liu, L. Zhang, X. Wang, L. Li, "Effects of plasticizer type and concentration on rheological, physico-mechanical and structural properties of chitosan/zein film", *Int. J. Biol. Macromol.* 143, 334–340, 2019;
- [139] L.R. Amado, K. de S. Silva, M.A. Mauro, "Effects of interactions between soy protein isolate and pectin on properties of soy protein-based films", *J. Appl. Polym. Sci.* 48732, 2019;
- [140] H.P.S. Abdul Khalil, C.K. Saurabh, M.I. Syakir, M.R. Nurul Fazita, A. Bhat, A. Banerjee, H.M. Fizree, S. Rizal, P.M. Tahir, "Barrier properties of biocomposites/hybrid films", *Mech. Phys. Test. Biocomposites, Fibre-Reinforced Compos. Hybrid Compos.*, Elsevier, 241–258, 2018 <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102292-4.00013-8>;
- [141] V. Falguera, J.P. Quintero, A. Jiménez, J.A. Muñoz, A. Ibarz, "Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use", *Trends Food Sci. Technol.* 22, 6, 292–303, 2011;
- [142] M.R. Nunes, M. de Souza Maguerroski Castilho, A.P. de Lima Veeck, C.G. da Rosa, C.M. Noronha, M.V.O.B. Maciel, P.M. Barreto, "Antioxidant and antimicrobial methylcellulose

- films containing Lippia alba extract and silver nanoparticles”, *Carbohydr. Polym.* 192, 37–43, 2018;
- [143] W. Shi, M.J. Dumont, "Review: Bio-based films from zein, keratin, pea, and rapeseed protein feedstocks”, *J. Mater. Sci.* 49, 5, 1915–1930, 2014;
- [144] B. Chapman, C. Gunter, "Local Food Systems Food Safety Concerns”, *Preharvest Food Saf., American Society of Microbiology*, 249–260, 2018  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.pfs-0020-2017>.