

Encapsulação do Óleo Essencial de Lavandim e sua Incorporação em Filmes Bioativos para Aplicação na Indústria Alimentar

Versão final após defesa

Bárbara Maia Saraiva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Industrial
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Ângelo Filipe Santos Luís
Coorientadores: Prof.^a Doutora Ana Maria Matos Ramos
Prof.^a Doutora Fernanda da Conceição Domingues

dezembro de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Bárbara Maia Saraiva, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M12277 do Mestrado em Química Industrial da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 07/12/2023

A handwritten signature in black ink that reads "Bárbara Maia Saraiva". The signature is written in a cursive, flowing style.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), I.P./MCTES, através de fundos nacionais (PIDDAC), e decorreu na Unidade de Investigação Fiber Materials and Environmental Technologies (FibEnTech), da Universidade da Beira Interior, no âmbito do Projeto de Investigação intitulado UIDB/00195/2020 - Projeto Estratégico da Unidade de Investigação FibEnTech.



REPÚBLICA
PORTUGUESA



FACULDADE
CIÊNCIAS

Departamento de
Química

Dedicatória

Aos meus pais e à minha irmã, que são os melhores do mundo.

Aos meus avós, em especial ao meu companheiro de aniversário, o avô Zé, que nos deixou nesta reta final, mas que estará sempre nos nossos corações.

Agradecimentos

Como esta etapa não teria sido finalizada sem o apoio de todos aqueles que estiveram presentes ao longo do meu percurso académico, quero agradecer a todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente neste trabalho.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Ângelo Luís, pela orientação excelente, por todos os ensinamentos, por toda a paciência, persistência e total disponibilidade.

Agradeço às minhas coorientadoras por todo o apoio prestado. À Professora Doutora Ana Ramos por toda a ajuda, principalmente com o Ângulo de Contacto, e por todos os conhecimentos que me transmitiu, e à Professora Doutora Fernanda Domingues por tornar parte deste trabalho possível.

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

Quero agradecer a possibilidade de realizar este trabalho na Unidade de Investigação *Fiber Materials and Environmental Technologies* (FibEnTech) e Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS).

Agradeço também ao projeto com o qual esta dissertação contou com o apoio, o Projeto de Investigação intitulado UIDB/00195/2020 - Projeto Estratégico da Unidade de Investigação FibEnTech. Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), I.P./MCTES, através de fundos nacionais (PIDDAC).

Quero agradecer a todos os meus amigos, colegas e professores com quem eu tive o privilégio de me cruzar, em especial às diretoras do melhor curso da UBI, a Professora Doutora Maria João Nunes e a Professora Doutora Ana Carreira, muito obrigada por estarem sempre disponíveis.

Dirijo um agradecimento muito especial aos meus pais. À minha mãe, por ser a mais querida e uma guerreira, e ao meu pai, por ter feito sempre tudo o que podia e o que não podia para que nada nos faltasse. Tenho a certeza que seria muito mais difícil chegar até aqui sem os ter ao meu lado. Sou-lhes muito grata.

Agradeço à minha irmã Mónica por ser a minha primeira amiga e ter contribuído muito para eu ser quem sou hoje. Ao meu cunhado Francisco, por ser meu amigo também.

Apesar de só me terem “atrapalhado”, não posso deixar de agradecer aos meus meninos, à Maria Luísa e ao Frederico. Tenho muita sorte em ser tia de umas crianças tão lindas e especiais.

Um grande bem-haja a toda a minha família, em especial aos meus avós que, mesmo não sabendo bem o que eu estudava, sempre se mostraram orgulhosos.

Como os últimos são sempre os primeiros, quero agradecer ao Rui por ser o meu melhor amigo e companheiro, por todo o amor e dedicação. Obrigada por acreditares sempre em mim.

Resumo

Em resposta à crescente preocupação ambiental no que concerne ao elevado consumo de plásticos derivados do petróleo, como embalagens alimentares, a procura por alternativas sustentáveis, como a utilização de biopolímeros como substitutos dos plásticos sintéticos em embalagens, ganhou destaque. A pululana, produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, é considerada uma alternativa promissora aos plásticos sintéticos e tem despertado um crescente interesse na produção de filmes comestíveis para potenciais embalagens alimentares ativas. Os óleos essenciais (OEs) destacam-se como agentes antioxidantes e antimicrobianos naturais, contribuindo para minimizar os impactos negativos dos resíduos químicos nos alimentos, na saúde humana e no meio ambiente, enquanto prolongam o tempo de prateleira dos produtos. Um exemplo é o OE de lavandim, extraído da espécie *Lavandula hybrida*, cujas propriedades aromáticas e medicinais são idênticas às do OE de lavanda, mas têm efeitos mais rápidos e intensos. Apesar de todas as vantagens que os OEs e os seus compostos bioativos possuem, a sua aplicação ainda é limitada devido a desvantagens como a sua volatilidade e instabilidade. Uma estratégia possível para combater estas desvantagens é o seu encapsulamento. Este trabalho teve como principal objetivo a encapsulação do OE de lavandim e a sua incorporação em filmes de pululana, conferindo-lhes propriedades bioativas, para aplicação na indústria alimentar, como embalagens ativas. Inicialmente, o OE de lavandim foi analisado, revelando fortes propriedades antioxidantes e antimicrobianas contra vários patógenos alimentares. Utilizou-se o método de emulsão e evaporação do solvente para preparar cápsulas de ácido polilático (PLA) e encapsular o OE de lavandim. Foram preparadas cápsulas com e sem OE, tendo sido confirmada a sua estrutura física e química por SEM, FTIR e DSC. Para as amostras sem OE, obtiveram-se esferas com $0,585 \pm 0,067 \mu\text{m}$ de diâmetro, enquanto para as amostras com OE, obtiveram-se esferas maiores com $1,242 \pm 0,138 \mu\text{m}$ de diâmetro. Foram então produzidos quatro tipos de filmes: pululana, pululana com OE de lavandim e pululana + cápsulas, com e sem OE; em todos eles a pululana foi dissolvida em água, com adição de glicerol como plastificante. Ao analisar as propriedades bioativas dos filmes, estes revelaram-se potenciais materiais para embalagens alimentares inibindo a oxidação e peroxidação lipídica. Os filmes de pululana com OE de lavandim e de pululana + cápsulas c/ OE apresentaram ainda uma percentagem de inibição de cerca de 51 % no ensaio de sequestração de radicais livres DPPH. Já no ensaio de difusão em disco, ocorreu inibição do crescimento bacteriano nos filmes de pululana e nos filmes de pululana com OE, especificamente nas bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) e registaram-se ainda inibições por contacto para os filmes de pululana com OE (*E. coli*) e de pululana + cápsulas com OE (*P. aeruginosa*). A incorporação do OE de lavandim melhorou as propriedades de superfície dos filmes de pululana devido à hidrofobicidade do OE e estes filmes revelaram ser transparentes e com uma cor amarelada. Já a adição do OE encapsulado, aumentou a gramagem e espessura dos filmes, aumentando a permeabilidade e a opacidade destes. O OE encapsulado demonstrou melhorar as propriedades mecânicas, tornando-os mais dúcteis e menos rígidos. Estes filmes biocompósitos de pululana com OE de lavandim encapsulado apresentam-se como

uma alternativa promissora e ecológica para embalagens alimentares, contribuindo para a redução do uso de plásticos convencionais derivados do petróleo.

Palavras-chave

Embalagens ativas; encapsulamento; lavandim; *Lavandula hybrida*; óleo essencial; pululana

Abstract

In response to the growing environmental concern over the extensive use of petroleum-derived plastics in food packaging, the search for sustainable alternatives, such as the use of biopolymers as substitutes for synthetic plastics in packaging, has gained prominence. Pullulan, produced by the fungus *Aureobasidium pullulans*, is considered a promising alternative to synthetic plastics and has attracted increasing interest in producing edible films for potential active food packaging. Moreover, considering public saturation with chemical and synthetic additives, essential oils (EOs) emerge as natural antioxidant and antimicrobial agents, contributing to mitigate the negative impacts of chemical residues on food, human health, and the environment, while extending the product shelf-life. An example is lavandin EO, extracted from *Lavandula hybrida*, whose aromatic and medicinal properties are identical to those of lavender EO but exhibit faster and more intense effects. Despite the advantages offered by the EOs and their bioactive compounds, their application is limited by disadvantages like hydrophobicity, volatility, and instability. One possible strategy to overcome these limitations is their encapsulation. This work primarily aimed to encapsulate lavandin EO and incorporate it into pullulan films, giving them bioactive properties for application in the food industry, as active packaging. Lavandin EO was initially analyzed, revealing strong antioxidant and antimicrobial properties against several foodborne pathogens. The emulsion and solvent evaporation method was employed to prepare polylactic acid (PLA) capsules for encapsulating lavandin EO. Capsules were produced with and without EO, and their physical and chemical structure was confirmed by SEM, FTIR, and DSC. For samples without lavandin EO spheres with a diameter of $0.585 \pm 0.067 \mu\text{m}$ were obtained, whereas for samples with EO, larger spheres with a diameter of $1.242 \pm 0.138 \mu\text{m}$ were obtained. Subsequently, pullulan films containing glycerol as a plasticizer were developed, resulting in four types of films: pullulan, pullulan with EO, pullulan + capsules, with and without EO. Significant roughness was observed in the pullulan + capsules films due to the dimensions of the incorporated capsules. Finally, the resulting films were evaluated for their bioactive, thermal, structural, mechanical, surface, barrier, and optical properties. When analyzing the bioactive properties of the films, they proved to be potential materials for food packaging, inhibiting lipid oxidation and peroxidation. The pullulan films with lavandin EO and pullulan + capsules with EO films also exhibited a inhibition rate of approximately 51% in the DPPH free radical scavenging assay. In the disk diffusion assay, bacterial growth inhibition was observed in the pullulan films and pullulan with EO films, particularly in Gram-positive bacteria (*L. monocytogenes* and *S. aureus*). Contact inhibitions were also observed for pullulan with EO films (*E. coli*) and pullulan + capsules with EO films (*P. aeruginosa*). The incorporation of lavandin EO improved the surface properties of pullulan films due to the hydrophobic nature of the EO. These films were found to be transparent with a yellowish color. On the other hand, the addition of encapsulated EO increased the weight and thickness of the films, leading to increased permeability and opacity. The encapsulated EO also showed an improvement in mechanical properties, making them more ductile and less rigid. These biocomposite films of pullulan with encapsulated lavandin EO present a promising and

ecological alternative for food packaging, contributing to the reduction of conventional petroleum-derived plastics usage.

Keywords

Active packaging; encapsulation; essential oil; lavandin, *Lavandula hybrida*; pullulan.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Estado da Arte.....	3
2.1. Embalagens alimentares ativas	5
2.1.1 Principais tipos de embalagens ativas.....	5
2.1.2 Materiais utilizados em embalagens ativas.....	6
2.2 Biopolímeros.....	7
2.2.1 Pululana	8
2.3 Óleos essenciais	9
2.3.1 Óleo essencial de lavandim.....	10
2.3.1.1 Propriedades antioxidantes	11
2.3.1.2 Propriedades antimicrobianas	12
2.4 Técnicas de encapsulamento.....	12
2.4.1 Emulsão e evaporação do solvente	13
2.4.2 Nanoprecipitação	13
2.4.3 Salificação.....	14
2.4.4 Emulsão dupla.....	14
Capítulo 3 - Objetivos.....	17
Capítulo 4 - Materiais e métodos	19
4.1 Reagentes	19
4.2 Métodos	19
4.2.1 Óleo essencial de lavandim: extração e análise da composição química	19
4.2.1.1 Avaliação da atividade antioxidante	19
4.2.1.2 Avaliação das propriedades antimicrobianas.....	21
4.2.1.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) ...	23
4.2.2 Preparação das cápsulas	23
4.2.3 Caracterização das cápsulas	24
4.2.3.1 Análise da microestrutura	24
4.2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana	24
4.2.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) ...	24
4.2.3.4 Propriedades térmicas	25
4.2.4 Preparação dos filmes	25
4.2.5 Caracterização dos filmes	26
4.2.5.1. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana	26
4.2.5.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) ..	26

4.2.5.3. Propriedades térmicas	26
4.2.5.4 Propriedades estruturais dos filmes	26
4.2.5.5 Propriedades mecânicas	27
4.2.5.6 Ângulo de contacto e energia livre de superfície	27
4.2.5.7 Propriedades barreira.....	28
4.2.5.8 Propriedades óticas.....	29
4.2.5.9 Análise de resultados.....	29
Capítulo 5 - Resultados e discussão	31
5.1 Análise química do OE	31
5.1.1 Avaliação da atividade antioxidante	34
5.1.2 Avaliação das propriedades antimicrobianas	35
5.1.3 Espetroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	37
5.2 Análise das cápsulas.....	37
5.2.1 Análise da microestrutura.....	37
5.2.2 Avaliação da atividade antioxidante	38
5.2.3 Avaliação das propriedades antimicrobianas	38
5.2.3 Espetroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	39
5.2.5 Avaliação das propriedades térmicas	41
5.3 Análise dos filmes	42
5.3.1 Avaliação da atividade antioxidante	43
5.3.2 Avaliação das propriedades antimicrobianas	44
5.3.3 Espetroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	47
5.3.4 Avaliação das propriedades térmicas	47
5.3.5 Avaliação das propriedades estruturais	49
5.3.6 Avaliação das propriedades mecânicas	49
5.3.7 Ângulo de contacto e energia livre de superfície	51
5.3.8 Avaliação das propriedades de barreira	54
5.3.9 Avaliação das propriedades óticas	55
Capítulo 6 - Conclusões e perspectivas de trabalho futuro	57
Referências bibliográficas	61

Lista de Figuras

Figura 1-Tipos de biopolímeros (adaptado de [13] e [28]).	8
Figura 2-Representação esquemática da metodologia aplicada na preparação das cápsulas.	23
Figura 3-Cromatograma do OE de lavandim.....	31
Figura 4-Estrutura química do linalool.	34
Figura 5-Estrutura química do acetato de linalilo.	34
Figura 7-Imagens SEM das cápsulas obtidas.....	38
Figura 8-Espetro de FTIR do PLA.....	39
Figura 9-Estrutura química do PLA.....	39
Figura 10-Espetro de FTIR do PVA.....	40
Figura 11-Estrutura química do PVA.....	40
Figura 12-Espetro de FTIR das cápsulas, com e sem OE de lavandim.	40
Figura 13-Espetro de FTIR do OE de lavandim + cápsulas com OE de lavandim.	41
Figura 14-Termogramas de DSC das cápsulas com e sem OE de lavandim (a verde e vermelho, respetivamente).	42
Figura 15-Aparência dos filmes produzidos.....	43
Figura 16-Imagens de microscopia ótica da atividade antimicrobiana (Ampliação: 100x).....	46
Figura 17-Espetros de FTIR dos filmes Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (a azul, roxo, verde e vermelho, respetivamente).	47
Figura 18-Termogramas de DSC dos filmes de de Pu, Pu+cápsulas c/OE e Pu+cápsulas s/OE (verde, vermelho e azul, respetivamente).	48

Lista de Tabelas

Tabela 1-Diluições metanólicas do OE.....	20
Tabela 2-Diluições das soluções contendo as cápsulas.	24
Tabela 3-Análise da composição química do OE de lavandim.....	31
Tabela 4-Resultados do ensaio de difusão em disco para o OE de lavandim (média \pm DP).....	35
Tabela 5-Resultados da CMI ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de OE de lavandim (valores modais).	36
Tabela 6- Resultados do ensaio de difusão em disco para as cápsulas (média \pm DP).	39
Tabela 7- Resultados do teste de sequestração dos radicais livres de DPPH para os filmes de PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	43
Tabela 8- Resultados do teste de branqueamento do β -caroteno para os filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	44
Tabela 9- Resultados do ensaio de difusão em disco para os filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	45
Tabela 10-Propriedades estruturais dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	49
Tabela 11-Propriedades mecânicas dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	50
Tabela 12-Ângulos de contacto dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	51
Tabela 13-Energias de superfície dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	53
Tabela 14-Propriedades de barreira dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	54
Tabela 15-Cor dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	55
Tabela 16-Transparência dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).....	56

Lista de Acrónimos

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GC-FID	Cromatografia Gasosa Acoplada a um Detetor de Ionização de Chama (<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detection</i>)
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espetrometria de Massa (<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i>)
HR	Humidade Relativa
IAA	Índice de Atividade Antioxidante
ISO	<i>International Standard Organization</i>
MHA	Müeller-Hinton Agar
MHB	Müeller-Hinton Broth
OE	Óleo Essencial
OWRK	Owens, Wendt, Rabel e Kaelble
PLA	Ácido polilático
PVA	Álcool polivinílico
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
Tg	Temperatura de Transição Vítrea (<i>Glass Transition Temperature</i>)
Tm	Temperatura de Fusão (<i>Melting Temperature</i>)
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
WVP	Permeabilidade ao Vapor de Água (<i>Water Vapor Permeability</i>)
WVTR	Taxa de Transmissão do Vapor de Água (<i>Water Vapor Transmission Rate</i>)

Capítulo 1 - Introdução

Desde a sua descoberta e durante muito tempo, o plástico foi a escolha tradicional para embalar alimentos, no entanto, as mudanças que têm ocorrido no nosso planeta têm aumentado a consciência ambiental do consumidor em relação aos danos ambientais causados pela utilização excessiva dos derivados do petróleo, como os plásticos utilizados em embalagens alimentares. Atualmente, a indústria de embalagens para o setor alimentar é conhecida como a maior consumidora de plásticos sintéticos. A utilização destes materiais acarreta desafios tanto económicos como ambientais, especialmente devido à falta de uma adequada eliminação e de um sistema eficaz de gestão de resíduos, uma vez que estes materiais não são biodegradáveis [1]. Além disso, o desperdício alimentar é uma preocupação crescente a nível mundial. Os alimentos que não são consumidos são deitados ao lixo, e o lixo orgânico é uma das grandes fontes de gases com efeito de estufa. Estes motivos têm vindo a aumentar a consciencialização da população e a investigação da indústria para o desenvolvimento de novas embalagens sustentáveis, biodegradáveis e comestíveis que podem aprimorar a segurança alimentar e elevar a qualidade dos alimentos [2].

O conceito de “embalagem ativa” foi estabelecido pelo Regulamento da Comissão Europeia (CE) N.º 450/2009, de 29 de maio de 2009, relativo aos materiais e objetos ativos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos. De acordo com o artigo 3º deste regulamento, "materiais e objetos ativos" são utilizados com o propósito de prolongar o tempo de prateleira dos alimentos ou preservar e melhorar a qualidade dos alimentos embalados. Estes materiais são projetados de forma a incluir intencionalmente componentes que libertam substâncias para os alimentos embalados ou o meio envolvente, ou que absorvem tais substâncias dos alimentos ou do meio em que se encontram [3].

A utilização de biopolímeros como uma alternativa aos polímeros convencionais para embalagens alimentares ativas tem sido amplamente estudada nos últimos anos [1], pois estes são mais ecológicos e compatíveis com a proteção ambiental. Estes polímeros são compostos que, ao contrário dos polímeros derivados do petróleo, são biodegradáveis, comestíveis e produzidos a partir de fontes renováveis que possuem um ciclo de vida mais curto quando comparado com os polímeros derivados de combustíveis fósseis. A degradação biológica surge como uma alternativa aos métodos tradicionais de reciclagem, como os meios mecânicos, químicos e energéticos. Este método é particularmente útil para o desenvolvimento sustentável, pois baseia-se na decomposição da matéria orgânica por meio da atividade biológica, predominantemente por meio de reações enzimáticas causadas por microrganismos [4], [5]. Geralmente, os biopolímeros podem ser processados utilizando as mesmas tecnologias usadas para plásticos convencionais, como moldagem por injeção, moldagem por sopro, termoformagem, extrusão e formação de filmes [6].

Os materiais usados nas embalagens ativas devem ser inertes, garantindo que ocorra uma mínima interação entre os alimentos e as embalagens. A pululana é um polissacárido não iónico, linear, solúvel em água e neutro, composto por repetidas unidades de maltotriose α -(1,6) unidas por meio de ligações glicosídicas α -(1,4), tendo como principais vantagens ser um biopolímero biodegradável e biocompatível, não tóxico, não imunogénico, não mutagénico e não carcinogénico [7]. Os filmes de pululana podem também ser utilizados como embalagens ativas, proporcionando uma melhoria na qualidade e segurança dos alimentos ao funcionarem como veículos para agentes antioxidantes e/ou antimicrobianos [8].

A espécie *Lavandula hybrida* (lavandim) tem vindo a ser estudada como um destes agentes, assim como a sua possível incorporação em embalagens ativas, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. O óleo essencial (OE) de lavandim é caracterizado por um conteúdo elevado de terpenos como o linalool, acetato de linalilo, cânfora, entre outros, que contribuem para as suas propriedades bioativas [8]. Como este OE tem aromas fortes, a sua encapsulação poderá preservar as características organolépticas dos alimentos. Adicionalmente, consegue-se um melhor controlo da sua disponibilidade e libertação, possibilitando o desenvolvimento de embalagens ativas que aumentam a qualidade dos produtos alimentares [9].

Pretende-se com este trabalho contribuir para a investigação sobre o desenvolvimento de novos materiais de embalagem alimentar, tendo em vista o prolongamento do tempo de prateleira dos alimentos, a redução da utilização de conservantes sintéticos, a melhoria da qualidade dos alimentos e, ainda, a sustentabilidade ambiental.

Capítulo 2 - Estado da Arte

À medida que a sociedade progride, o desenvolvimento de embalagens destinadas à preservação e armazenamento de alimentos tem sido uma constante. No entanto, há uma procura crescente por embalagens e conservantes naturais. As embalagens têm como função principal a salvaguarda dos alimentos, prevenindo a sua contaminação ou degradação devido a influências externas, como humidade, luz, choques, entre outros. Além disso, desempenham um papel crucial, assegurando a integridade dos produtos durante o transporte e o armazenamento [10]. A seleção adequada de embalagens de alimentos pode ajudar a reduzir e prevenir o desperdício alimentar e deve ainda garantir que não haja alterações negativas na qualidade dos alimentos, crescimento microbiano, oxidação de lípidos ou degradação de nutrientes. As embalagens alimentares tradicionais costumam ser de utilização única, sendo descartadas ao chegar ao consumidor ou após o consumo do produto. Alguns dos materiais mais usados em embalagens alimentares incluem papel, plástico, vidro, aço, alumínio e diferentes ligas. Assim, enquanto alguns materiais têm taxas de reciclagem relativamente altas (mais de 20% para alguns papéis e papelão), outros, como muitos plásticos, normalmente têm taxas de reciclagem mais baixas (menos de 20%) [2].

A utilização dos plásticos trouxe uma série de vantagens à sociedade, como a minimização do desperdício de alimentos por meio do uso de embalagens e a redução do consumo global de energia, uma vez que, substituir os plásticos por alternativas, como vidro e alumínio, elevaria o consumo de energia em 57% e as emissões de gases com efeito de estufa até 61%. Esses materiais encontram ampla aplicação em embalagens de diversos produtos devido à facilidade de moldagem e à baixa massa molecular, resultando em embalagens leves que reduzem os custos de produção e transporte. Apesar destas vantagens, a maioria dos plásticos utilizados é derivada de hidrocarbonetos fósseis, não é biodegradável nem renovável, e acaba frequentemente em aterros ou nos oceanos, gerando resíduos de longa persistência que prejudicam o ambiente e a vida selvagem. Além disso, a produção desses plásticos liberta gases com efeito de estufa, contribuindo potencialmente para mudanças climáticas e interações indesejáveis entre o plástico e os alimentos embalados [10], [11].

Atualmente, cada europeu gera, em média, cerca de 180 kg de resíduos de embalagens por ano. São gerados quase 26 milhões de toneladas de lixo plástico anualmente na Europa, e cerca de 80% do lixo marinho é plástico. A quantidade de resíduos de embalagens aumentou mais de 20% nos últimos 10 anos na União Europeia e prevê-se que aumentem mais 19% até 2030, se nenhuma ação for tomada. Perante esta situação, os plásticos de base biológica e biodegradáveis estão a surgir no nosso quotidiano como alternativas aos plásticos convencionais. A União Europeia tem desenvolvido o Plano de Ação para a Economia Circular do Pacto Ecológico Europeu para responder às exigências específicas dos europeus, tal como expressas na Conferência sobre o

Futuro da Europa, de forma a prevenir o desperdício de embalagens, aumentar a reutilização e tornar todas as embalagens recicláveis até 2030 [12].

Dado que a sociedade está mais consciente sobre a finitude dos recursos fósseis e à grande quantidade de materiais poliméricos não degradáveis gerados, é imperativo desenvolver novos materiais a partir de fontes renováveis e sustentáveis. Assim, a utilização de polímeros biodegradáveis (naturais e sintéticos) surge como uma opção para solucionar o problema da poluição ambiental. Na indústria alimentar, uma das abordagens passa pela adoção de embalagens/filmes comestíveis, os quais podem suceder aos materiais sintéticos e, em certos contextos, reduzir o seu uso em embalagens alimentares [13].

Os biopolímeros são compostos poliméricos originados de organismos vivos ou fontes de energia renováveis. Dada a escassez de petróleo e o impacto ambiental associado à produção e descarte de polímeros derivados de combustíveis fósseis, estes materiais têm o potencial de substituir os polímeros derivados do petróleo, e devido à sua natureza frequentemente biodegradável, podem oferecer uma solução para o problema da acumulação contínua de plásticos no ambiente [11].

A procura por produtos pouco processados e de fácil preparação, aliada à internacionalização do comércio de alimentos, apresenta desafios significativos em termos de segurança e qualidade alimentar. Certos produtos alimentares são propensos à deterioração e, por isso, necessitam de proteção contra processos de degradação durante a preparação, armazenamento e distribuição. Além dos benefícios ecológicos, as embalagens compostas por polímeros biodegradáveis também podem possuir propriedades antioxidantes e antimicrobianas que agregam valor aos alimentos, respondendo à preocupação da indústria alimentar com o crescimento de microrganismos. A transferência de bactérias patogénicas através de alimentos para os seres humanos é responsável por mais de 64% das hospitalizações anuais nos Estados Unidos, e os sintomas dessas doenças podem variar desde gastroenterites leves a síndromes neurológicas, hepáticas e renais, ou até mesmo morte [14], [15].

Com o intuito de reduzir as contaminações microbianas, a tecnologia alimentar tem explorado alternativas inovadoras para alcançar este propósito. Dentro das embalagens inovadoras existem duas categorias: embalagens ativas, que visam a proteção do alimento, e embalagens inteligentes, que se focam na comunicação com o consumidor. Preferencialmente, utilizam-se combinações de sistemas inteligentes e ativos de forma a alcançar uma maior segurança e aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, para além de comunicar sobre a qualidade dos produtos até chegarem ao consumidor final. As embalagens antimicrobianas representam uma categoria de embalagens ativas que visam reduzir e inibir o crescimento microbiano que pode ocorrer tanto nos alimentos como no próprio material da embalagem [10], [14].

Nas embalagens alimentares de plástico, têm sido introduzidos diversos agentes antimicrobianos de origem sintética (como ácidos orgânicos e inorgânicos, metais, álcoois, compostos de amónio

ou aminas, etc.). No entanto, devido às limitações estabelecidas por reguladores e pela indústria em relação aos aditivos alimentares sintéticos, a incorporação de agentes antimicrobianos naturais (como OEs e seus principais compostos, enzimas provenientes de fontes animais, bacteriocinas, polímeros com atividade antimicrobiana e compostos fenólicos) tem aumentado consideravelmente em embalagens alimentares. Na indústria alimentar, estes compostos têm sido considerados seguros pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, tendo diversas aplicações [14].

Os OEs de *Lavandula* têm sido intensamente investigados pelas suas potencialidades como agentes antioxidantes e antimicrobianos em alimentos, combatendo patogêneos comuns de origem alimentar, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium. A atividade antimicrobiana do OE de lavandim pode ser ainda justificada pelos seus principais compostos, como o linalool e o acetato de linalilo. Sendo a espécie *Lavandula hybrida*, (lavandim), um cruzamento entre a alfazema (*Lavandula officinalis*) e a lavanda aspic (*Lavandula latifolia*), este apresenta ainda características das espécies que lhe deram origem, apresentando assim uma promissora atividade antioxidante [16], [17].

2.1. Embalagens alimentares ativas

O desenvolvimento contínuo das embalagens ao longo da história tem sido vital para a preservação e armazenamento adequado dos alimentos. Nesse contexto, as embalagens ativas surgem como uma abordagem inovadora que vai além do simples embalamento dos produtos. O conceito de embalagens ativas envolve a incorporação de materiais ou agentes que interagem com o ambiente interno da embalagem ou com o próprio alimento, com o objetivo de prolongar o seu tempo de prateleira, melhorar a segurança alimentar e minimizar o desperdício [14], [18].

Estas embalagens têm ganho destaque devido aos diversos benefícios que oferecem, podem preservar a qualidade sensorial, nutricional e microbiológica dos alimentos, reduzindo a deterioração causada por fatores externos, como oxigênio, humidade e microrganismos indesejados. Além disso, ao criar um ambiente controlado dentro da embalagem, as embalagens ativas podem melhorar a estabilidade dos produtos, permitindo que os alimentos alcancem mercados distantes com qualidade intacta [19].

Esta abordagem vai ao encontro dos esforços globais para reduzir o desperdício alimentar e otimizar a utilização dos recursos. Ao minimizar a deterioração e o descarte prematuro de produtos alimentares, as embalagens ativas beneficiam não só a indústria alimentar, mas também contribuem para uma abordagem mais sustentável no setor. Nesse sentido, explorar os conceitos e os benefícios das embalagens ativas é crucial para avançar nas soluções de preservação de alimentos e promover a economia circular [11].

2.1.1 Principais tipos de embalagens ativas

As embalagens ativas abrangem uma ampla gama de abordagens inovadoras adaptadas para atender às necessidades específicas de diferentes produtos alimentares e contextos de uso. Entre essas abordagens, destacam-se as embalagens absorventes e as embalagens emissoras, cada uma com suas características e funcionalidades distintas [19].

As embalagens absorventes têm como objetivo principal controlar a umidade e gases dentro da embalagem, o que é essencial para manter a qualidade dos alimentos. Estas embalagens são projetadas com materiais que têm a capacidade de absorver o excesso de umidade ou líquidos libertados pelos produtos alimentares, evitando a formação de condensação e o crescimento de microrganismos indesejados. Além disso, algumas embalagens absorventes também podem absorver gases indesejados, como o etileno, que acelera a maturação e deterioração de frutas e vegetais. Essa abordagem não preserva apenas a qualidade dos alimentos, mas também pode aumentar o tempo de prateleira e a aparência dos produtos [20], [21].

As embalagens emissoras, por outro lado, são projetadas para libertar substâncias ativas de forma controlada no ambiente interno da embalagem ou diretamente no alimento. Estas substâncias podem incluir agentes antimicrobianos, antioxidantes, aromatizantes ou outras substâncias funcionais que melhoram a qualidade e segurança dos produtos. Ao libertar essas substâncias de forma controlada, as embalagens emissoras podem inibir o crescimento de microrganismos, retardar a oxidação e até mesmo realçar o aroma ou sabor dos alimentos [22], [23].

A diversidade desses tipos de embalagens ativas reflete a contínua procura por soluções inovadoras para atender às complexas necessidades da indústria alimentar. Ao explorar as funcionalidades únicas das embalagens absorventes e emissoras, a indústria pode melhorar a qualidade dos alimentos e simultaneamente, promover práticas mais sustentáveis, reduzindo o desperdício e otimizando a utilização de recursos.

2.1.2 Materiais utilizados em embalagens ativas

As embalagens ativas usam uma variedade de polímeros, que desempenham um papel fundamental na determinação das características funcionais e das propriedades de barreira destas embalagens. Os polímeros escolhidos devem ser capazes de proteger os alimentos, ao mesmo tempo em que permitem a libertação controlada de substâncias ativas. Dentre os tipos de polímeros frequentemente utilizados, destacam-se os sintéticos e os biopolímeros.

Os polímeros sintéticos, como polietileno, polipropileno e poliéster, são amplamente utilizados na indústria de embalagens ativas devido às suas propriedades de barreira excepcionais. Estes polímeros oferecem uma barreira eficaz contra gases, umidade e odores, protegendo os alimentos do ambiente externo e mantendo a sua qualidade. Além disso, os polímeros sintéticos podem ser moldados em diversas formas e tamanhos, permitindo a produção de embalagens específicas para diferentes produtos alimentares. No entanto, a resistência destes polímeros à degradação ambiental é uma preocupação, o que tem levado a um interesse crescente em alternativas mais sustentáveis [21].

Os biopolímeros, por sua vez, têm ganho destaque como alternativas mais sustentáveis aos polímeros sintéticos tradicionais. Estes polímeros são derivados de fontes renováveis, como amido de milho, celulose e proteínas, e são biodegradáveis, reduzindo o impacto ambiental. Os biopolímeros têm sido amplamente investigados para uso em embalagens ativas devido às suas propriedades de barreira e à capacidade de liberação controlada de substâncias bioativas. A versatilidade dos biopolímeros permite a produção de embalagens mais ecológicas, ao mesmo tempo em que atendem às exigências de desempenho [24], [25].

A escolha entre polímeros sintéticos e biopolímeros depende das necessidades específicas de cada aplicação e do equilíbrio entre funcionalidade, sustentabilidade e eficácia. À medida que a indústria de embalagens ativas evolui, a pesquisa e a inovação continuam a explorar novos materiais e abordagens para melhorar a qualidade dos alimentos, prolongar a vida útil dos produtos e reduzir o impacto ambiental das embalagens.

2.2 Biopolímeros

Os biopolímeros, também conhecidos como plásticos biodegradáveis, são materiais poliméricos nos quais pelo menos uma etapa no processo de degradação ocorre por meio do metabolismo de organismos naturais. Estes materiais possuem estruturas e funcionalidades similares aos plásticos de origem fóssil, porém, são de base biológica, total ou parcialmente derivados de fontes renováveis. A biodegradação consiste num processo químico em que os microrganismos disponíveis no ambiente convertem os materiais em substâncias naturais, como água e dióxido de carbono. Este processo depende das condições ambientais, do material e da sua aplicação. A biodegradação desses bioplásticos resulta na desintegração sem a libertação de substâncias tóxicas ou resíduos prejudiciais ao meio ambiente [11], [26].

Os biopolímeros de origem natural têm atraído grande atenção nos últimos anos devido às suas propriedades, como a não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, flexibilidade e renovabilidade. No entanto, estes possuem algumas limitações técnicas que os tornam difíceis de processar, portanto, devido a essas limitações, misturas, compósitos e nanocompósitos têm sido investigados para melhorar diversas propriedades como processabilidade, resistência ao calor, propriedades mecânicas e desempenho reológico [4].

Atualmente, têm sido usados vários biopolímeros em diversas áreas (alimentar, farmacêutica, biomédica), devido às suas propriedades físico-químicas únicas, especialmente quando comparadas com os seus homólogos derivados do petróleo (por exemplo, os plásticos) [27]. Os biopolímeros podem ser organizados em diversas categorias conforme a proveniência das matérias-primas e o processo de produção associado. O esquema apresentado na Figura 1 reporta esta organização.

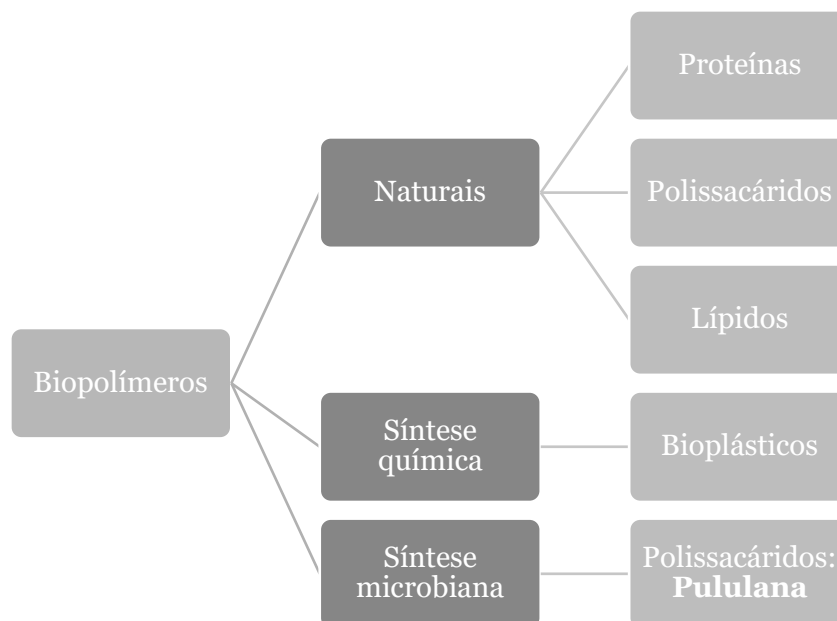


Figura 1-Tipos de biopolímeros (adaptado de [13] e [28]).

2.2.1 Pululana

A pululana é um polissacárido produzido pela levedura *Aureobasidium pullulans* e tem vindo a ser utilizada em diversas áreas, como a medicina e a biotecnologia [29]. A pululana é um polímero não tóxico, não mutagénico, não cancerígeno e comestível, geralmente comercializado como um pó esbranquiçado. É insípido, inodoro e é altamente solúvel em água, embora seja insolúvel em álcool e outros solventes orgânicos e tem uma boa resistência mecânica. Também foi descrito que a pululana inibe o crescimento de diversos microrganismos em alimentos [27].

Na área da indústria alimentar, as primeiras aplicações da pululana envolvem a sua utilização como agente espessante, estabilizante, texturizante e gelificante, produzindo produtos com boas propriedades sensoriais e de processamento mais fácil. As primeiras tentativas de utilizar a pululana em embalagens alimentares, no início dos anos 90, ficaram atrás do seu uso estabelecido como aditivo alimentar. Naquela época, entendia-se que os grandes benefícios teriam surgido de certas propriedades da pululana, como a sua alta solubilidade em água e a propriedade de barreira, contra oxigénio e dióxido de carbono. No início, os filmes comestíveis de pululana hidrossolúveis foram propostos como bolsas para porções que poderiam ser gradualmente dissolvidas em água ou em alimentos quentes. No entanto, a primeira aplicação maciça de pululana em embalagens de alimentos pode ser considerada como uma cobertura comestível, ou seja, uma camada relativamente fina de material aplicada e formada diretamente na superfície do alimento, que pode ser ingerida junto com o produto [27].

A maioria dos estudos das embalagens ativas para aplicações em alimentos e bebidas foca-se principalmente no desenvolvimento de sistemas antimicrobianos e antioxidantes. Como os revestimentos comestíveis podem ser concebidos como a embalagem primária que envolve o

alimento, estes podem assumir características ativas que geralmente pertencem aos filmes plásticos à base de petróleo comumente usados. Na verdade, a capacidade dos biopolímeros de “sentir” estímulos externos, como por exemplo, variações de humidade relativa, temperatura e pH, torna estes revestimentos mais adequados comparativamente aos plásticos derivados do petróleo para o desenvolvimento da segunda geração de embalagens ativas: embalagens projetadas para controlar a libertação de compostos ativos em taxas adequadas para uma ampla gama de alimentos e reações de degradação específicas de libertação controlada [27].

Nos últimos anos, vários trabalhos que estudaram este biopolímero e as embalagens ativas à base de pululana, demonstraram a adequação deste exopolissacárido para atuar como um excelente veículo para compostos bioativos. Além disso, comprovou-se que a pululana aumenta o tempo de prateleira dos alimentos, pois não pode ser prontamente assimilada como fonte de carbono por diversos microrganismos responsáveis pela deterioração de alimentos [30].

Vários autores avaliaram o efeito antimicrobiano contra diferentes espécies de origem alimentar (como, por exemplo, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis* e *P. aeruginosa*) em alguns alimentos embalados com filmes de pululana [31]–[33]. Estes filmes exibiram boas propriedades mecânicas e óticas, bem como efeitos antimicrobianos, inibindo os microrganismos patogêneos estudados, e foram sugeridos como uma alternativa válida ao plástico à base de petróleo para materiais de embalagem, sendo capazes de prolongar a vida útil de diversos alimentos [21].

2.3 Óleos essenciais

Os OEs, podem ser obtidos por meio de métodos clássicos ou mais modernos de extração de diferentes partes de plantas aromáticas, tais como flores, folhas, sementes, entre outros. Essas plantas, que contêm uma variedade de metabolitos secundários que compõe os OEs, constituem uma mistura rica em moléculas voláteis que variam em quantidade e qualidade de acordo com fatores exógenos e endógenos. Os OEs são constituídos principalmente por hidrocarbonetos, monoterpenos, sesquiterpenos e os seus derivados oxigenados, e possuem inúmeras atividades biológicas.

Os OEs são usados tradicionalmente há vários anos no tratamento de muitas doenças na medicina popular e exibem uma ampla gama de bioatividades, incluindo o tratamento de feridas corporais e tumores [34]. As plantas medicinais fizeram, desde sempre, parte do conhecimento humano. Atualmente, o interesse nas medicinas alternativas à base de plantas tem vindo a aumentar [35]. As propriedades curativas das plantas medicinais estão ligadas ao seu metabolismo natural, pois desenvolveram ao longo do tempo um mecanismo de autodefesa para sobreviver e evoluir [8]. A utilização de OEs não se limita apenas ao setor farmacêutico, mas também tem sido amplamente investigada pela indústria alimentar. De facto, os OEs podem ser usados não apenas como agentes aromatizantes para influenciar as características sensoriais dos alimentos, mas também como

agentes conservantes, para prolongar o tempo de prateleira dos alimentos devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes [36].

Existe uma grande necessidade na indústria alimentar de sistemas eficazes para inativar os patogêneos transmitidos por alimentos em produtos alimentícios e garantir a sua segurança para os consumidores. Os OEs podem ser agentes ativos nestas novas embalagens alimentares. Além do consumidor estar saturado de aditivos químicos e sintéticos, os OEs demonstraram ser poderosos antimicrobianos naturais contra uma variedade de patogêneos transmitidos por alimentos, uma vez que exibem efeitos inibitórios sobre vários microrganismos. As principais limitações do uso destes antimicrobianos em produtos alimentares são a possibilidade de alterarem as propriedades organolépticas dos alimentos e a sua insolubilidade em água, devido à sua natureza lipofílica, que limita o contacto com patogêneos em alimentos com alto teor de humidade [15].

Os OEs de *Lavandula* têm sido investigados como potenciais agentes antioxidantes e antimicrobianos em filmes que combatem bactérias como *S. aureus* e *E. coli*, patogêneos alimentares comuns [37]. Nas espécies de *Lavandula*, como *L. angustifolia*, *L. intermedia*, *L. stoechas* e *L. latifolia*, a principal classe de compostos são os monoterpenos oxigenados. A composição química nestas espécies difere apenas na proporção dos compostos [38].

2.3.1 Óleo essencial de lavandim

A lavanda é, normalmente, nativa de regiões de solos pobres e rochosos. Desde a antiguidade, esta tem sido usada como um remédio natural. Possui alta resistência a variações extremas de climas, não exigindo muitos cuidados com tratamentos culturais, apenas necessitando de um solo bem drenado [8]. As lavandas contam com cerca de 25 a 30 espécies de plantas com flores na família das mentas, *Lamiaceae*, nativas da região mediterrânea ao sul da África tropical e de muitas regiões da Ásia. Estas podem ser plantas anuais, herbáceas e pequenos arbustos [39].

Atualmente, o OE de lavanda é produzido principalmente a partir de flores de lavanda por métodos convencionais de extração, ou seja, destilação por arrastamento de vapor e hidrodestilação. O rendimento, a composição química e as atividades biológicas do OE, bem como as suas atividades antioxidante e antimicrobiana, podem ser afetadas por diferentes métodos de extração. Entre esses métodos, a hidrodestilação é o preferencial porque é o que tem menor influencia sobre a composição química e as atividades biológicas do OE [40].

Apesar de grande parte das espécies de lavanda tolerarem certos stresses climáticos, como por exemplo, calor, seca, vento e geada, práticas agronômicas como fertilizantes, poda, controlo de ervas daninhas e outros, são necessárias para o estabelecimento e produção comercial. As populações selvagens da mesma espécie de *Lavandula* podem apresentar variações no fenótipo e na composição e produção do OE devido a várias razões, como a variação sazonal e o estado de crescimento. Todas as espécies de *Lavandula* acumulam também ácidos fenólicos, que contribuem para a bioatividade dos extratos aquosos de lavanda. Os compostos fenólicos da

lavanda foram investigados principalmente pelos seus efeitos antioxidantes, demonstrando uma correlação positiva do conteúdo de ácidos fenólicos com os níveis de antioxidantes [37].

A espécie *Lavandula hybrida* (lavandim), é uma variedade de lavanda que resulta do cruzamento entre a alfazema (*Lavandula officinalis*, mais conhecida como *Lavandula angustifolia*) e a lavanda aspic (*Lavandula latifolia*). Este híbrido tem a vantagem de possuir uma concentração muito elevada de OE que atua como antioxidante, possuindo ainda propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, analgésicas, antifúngicas e bactericidas por ser rico em terpenos [35]. As propriedades aromáticas e medicinais deste OE são semelhantes às do OE de lavanda, mas têm efeitos mais rápidos e mais intensos, contendo um aroma mais penetrante [41]. O OE de lavandim é caracterizado por um conteúdo elevado de terpenos como o linalool, acetato de linalilo, borneol, cânfora, β -pineno, α -pineno e 1,8-cineol. Entre estes, o linalool e o acetato de linalilo são os principais determinantes da qualidade e ação terapêutica deste OE [8].

Os OEs são produtos do metabolismo secundário de plantas e são conhecidos por possuírem propriedades biológicas diferentes. São extratos naturais, concentrados, mostrando-se como boas fontes de compostos bioativos com diversas propriedades farmacológicas, como, por exemplo, antimicrobianas e antioxidantes [8].

2.3.1.1 Propriedades antioxidantes

Os OEs têm recebido muita atenção devido às suas notáveis atividades biológicas e benefícios para a saúde, mas são facilmente oxidados e quimicamente instáveis, pois têm baixa resistência a stresses ambientais como luz, oxigênio e temperatura. Além disso, as suas propriedades físico-químicas podem limitar a sua aplicação como compostos ativos em alimentos e produtos farmacêuticos devido a algumas restrições, como fraca solubilidade, baixa biodisponibilidade e liberação rápida. As técnicas de encapsulação podem ser usadas para o aprisionamento de OEs para manter as suas características originais durante o processamento e melhorar as suas propriedades físico-químicas [42].

Um antioxidante é uma substância que inibe os efeitos oxidativos da atmosfera, reagindo com os radicais livres para formar um produto mais estável. Os antioxidantes derivados de produtos naturais têm tido grande interesse pois são considerados mais seguros em comparação com os antioxidantes sintéticos disponíveis no mercado. Os ácidos fenólicos, abundantes em plantas, exibem inúmeras atividades antioxidantes devido ao seu alto potencial redox. As propriedades antioxidantes dos extratos de lavanda são atribuídas principalmente ao conteúdo de compostos fenólicos e a certos isoprenooides. No entanto, os principais compostos fenólicos presentes na lavanda são os ácidos rosmarínico e cafeico, ambos presentes em baixas concentrações. Os resíduos aquosos da destilação de OEs, conhecidos como hidrolatos também se têm mostrado ricos em fitoquímicos e possuem atividade biológica. No entanto, estudos recentes demonstraram que a atividade antioxidante dos hidrolatos de *L. angustifolia* é significativamente menor do que a do OE, devido ao baixo teor de compostos orgânicos voláteis no hidrolato. Ainda assim, está

claro que os hidrolatos de lavanda gerados pela indústria de destilação poderiam ser valorizados e utilizados como fonte natural de agentes antioxidantes [37].

2.3.1.2 Propriedades antimicrobianas

Os OEs são uma mistura de vários compostos orgânicos ativos, dos quais 20 a 60 são componentes abundantes em diversos OEs e contribuem para as suas propriedades organolépticas, como o odor e sabor [34]. O OE de lavandim é aplicado no processamento de alimentos, não apenas, como um ingrediente aromatizante, mas também, como um antimicrobiano para proteger os produtos alimentares de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos, particularmente *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No entanto, fatores como ar, luz, humidade e temperatura afetam a sua estabilidade e, além disso, também existem dificuldades envolvidas no armazenamento e transporte do OE devido à sua baixa estabilidade. Portanto, é essencial encontrar um método para melhorar a sua estabilidade [40].

O calor pode aumentar as propriedades antimicrobianas dos terpenos dos OEs, pois melhora a permeabilidade celular, permitindo que os constituintes do OE entrem na célula bacteriana e interrompam o crescimento mais facilmente [37]. A estabilidade dos OEs pode ser aumentada com o seu encapsulamento, que aumenta, também, a sua atividade antimicrobiana [43].

2.4 Técnicas de encapsulamento

Apesar de todas as vantagens que os OEs e os seus compostos bioativos possuem, a sua aplicação ainda é limitada devido a desvantagens como hidrofobicidade, volatilidade e instabilidade. Uma estratégia possível para combater estas desvantagens é o encapsulamento de OEs utilizando diferentes sistemas, que podem não só superar as desvantagens, como também ampliar as funcionalidades dos OEs [34]. Os compostos ativos dos OEs apresentam grande potencial como agentes bactericidas em embalagens ativas. O encapsulamento em redes poliméricas promove a sua proteção contra agentes externos e adicionalmente, permite uma libertação controlada [44].

A incorporação de OEs nas soluções filmogénicas tem vários desafios, nomeadamente, a sua fraca miscibilidade e separação de fases durante o processo de formação do filme, efeito adverso na transparência do filme e sensibilidade de compostos bioativos contra diversos fatores ambientais (por exemplo, temperatura, humidade e pH). Outro problema das embalagens ativas contendo OEs livres é a rápida migração dos compostos ativos e, conseqüentemente, a diminuição da atividade do filme durante o tempo de prateleira dos alimentos. O encapsulamento de OEs é um método alternativo para superar os problemas relacionados com a aplicação direta de OEs em alimentos e/ou embalagens ativas [25].

O encapsulamento é a técnica pela qual um material é aprisionado dentro de um veículo de tamanho micro ou nanométrico, de modo a que exista uma libertação controlada. Este tipo de libertação permite controlar a duração da eficiência máxima terapêutica, ao contrário do que acontece com princípios ativos não encapsulados. A micro ou nanoencapsulação pode levar a

inúmeras novas formulações com melhor afinidade com a água e capacidade de proteger substâncias ativas encapsuladas contra mecanismos de inativação ou degradação. Várias técnicas têm sido usadas com sucesso para o encapsulamento de OEs com resultados interessantes. A seleção do método de encapsulação determina as características das partículas, nomeadamente o tamanho, que é fundamental na relação com local de administração terapêutica. Existem diferentes métodos de produção de cápsulas consoante o princípio activo seja hidrofóbico ou hidrofílico. Os que têm sido mais divulgados na literatura da especialidade são o método da emulsão e evaporação do solvente, da nanoprecipitação, da salificação e da emulsão dupla [45].

O maior desafio ao utilizar um determinado método de preparação consiste na formulação adequada, estabelecendo as quantidades ideais de princípio ativo, polímero, solvente e não-solvente que permitam a produção de nanopartículas estáveis, a encapsulação eficiente do princípio ativo e a sua libertação de acordo com o perfil desejado [45].

Para a escolha do material encapsulante, um critério importante é a compatibilidade com o núcleo. Ele não deve reagir com o princípio ativo, sendo capaz de formar uma membrana ao seu redor. A abundância de polímeros, de origem natural ou sintética, aliada às suas características de permeabilidade (permeáveis, semipermeáveis ou impermeáveis) fazem deles importantes candidatos a materiais para as membranas das cápsulas [46].

2.4.1 Emulsão e evaporação do solvente

Este método baseia-se na emulsão de uma solução orgânica, onde estão o polímero e o princípio ativo, numa solução aquosa, onde está dissolvido o tensioativo. A emulsão é geralmente obtida através da utilização de ultrassons. O solvente orgânico difunde-se para a fase aquosa, depois da formação das gotículas, solubilizando-se até se obter a saturação. À medida que se vai evaporando o solvente orgânico, o polímero precipita formando as desejadas partículas. Esta separação das fases pode ser facilitada realizando um processo de centrifugação e, em seguida, o centrifugado é colocado numa estufa, para que ocorra a total evaporação da fase aquosa e seja possível recolher as cápsulas secas [45].

Neste método, as gotículas da emulsão são estabilizadas por um agente tensioativo, adicionado à solução aquosa, que confere às gotículas a estabilidade necessária para efetuar a evaporação do solvente orgânico sem que ocorra coalescência. O método de emulsão e evaporação do solvente é bastante utilizado, pois tem como principais vantagens a sua fácil execução experimental e permite obter uma eficiente encapsulação de numerosos compostos de natureza lipofílica [45].

2.4.2 Nanoprecipitação

De entre as diversas técnicas de encapsulamento, a nanoprecipitação tem-se mostrado bastante promissora em diversos trabalhos. Ainda, a utilização de poliésteres, como o poli(ácido láctico), é vantajosa devido às propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade [46]. A preparação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação baseia-se na precipitação do polímero na

interface de um solvente e de um não-solvente. Esta deposição interfacial, consiste essencialmente na solubilização do polímero e do princípio ativo num solvente (ou mistura de solventes) orgânico, sendo esta solução posteriormente adicionada lentamente a um não solvente. A difusão e a tensão interfacial entre o solvente e a fase aquosa são determinantes neste processo [45].

À semelhança do que acontece no método da emulsão e evaporação do solvente, aqui a encapsulação do princípio ativo também depende da sua solubilidade na fase aquosa ou na orgânica. No método de nanoprecipitação, podem ou não ser usados agentes tensioativos para assegurar a estabilidade das partículas na etapa de precipitação. No entanto, este é pouco eficiente na encapsulação de princípios ativos hidrofílicos, devido à sua elevada solubilidade e difusão na fase aquosa durante a precipitação do polímero. Por outro lado, a solubilidade do princípio ativo pode ser muitas vezes manipulada, e melhorada, através da alteração das condições da reação (como, por exemplo, do pH) aumentando assim a eficiência de encapsulação [45]. Esta técnica permite a obtenção instantânea de cápsulas monodispersas, é reprodutível e pode ser facilmente adaptada à escala industrial [46].

2.4.3 Salificação

O método de salificação baseia-se na separação de fases de uma mistura homogénea (de água e um solvente orgânico) por adição de compostos que promovam essa separação. É, comumente, considerada uma modificação do método de emulsão e evaporação do solvente. O polímero e o princípio ativo são dissolvidos num solvente orgânico, e posteriormente emulsionados numa fase aquosa que contém um agente tensioativo e um agente de salificação. Este último, pode ser um electrólito (como por exemplo o cloreto de magnésio e o cloreto de cálcio) ou não electrólito (como a sacarose). A esta emulsão é adicionada água suficiente para promover o aumento da difusão do solvente orgânico na fase aquosa, induzindo assim a formação das partículas [45].

A seleção do agente de salificação é um dos passos mais importantes deste método, pois a eficiência de encapsulação do princípio ativo depende deste ativo. No final do processo de preparação das partículas, o solvente e o agente de salificação são eliminados por uma filtração de fluxo cruzado. Este método é adequado quando os princípios ativos e polímeros usados para a preparação das nanopartículas são solúveis em solventes polares, como, por exemplo, em acetona ou etanol [45].

2.4.4 Emulsão dupla

Este método baseia-se num processo de emulsão feita em dois passos, permitindo assim, uma diminuição considerável no tamanho das gotículas dispersas. O método de emulsão dupla tem sido aplicado com sucesso na encapsulação de princípios ativos hidrofílicos e, ainda, de proteínas. Neste método, o princípio ativo dissolve-se na fase aquosa e o polímero na fase orgânica, sendo as duas fases emulsionadas através de um sonificador ou por agitação magnética. Em seguida, esta emulsão é adicionada a uma solução aquosa que contém o agente tensioativo e é, mais uma vez,

emulsionada. Após a evaporação do solvente orgânico a pressão reduzida, as partículas precipitam e são separadas da fase aquosa, posteriormente, através de um processo de centrifugação [45].

Com o método de emulsão dupla é possível obter gotículas maiores com gotículas de menor dimensão no seu interior. Estas gotículas têm como vantagens a reduzida viscosidade a concentrações baixas, o que evita o colapso das múltiplas gotículas durante a emulsão dupla, e o facto da tensão interfacial das gotículas grandes ser suficiente para as manter em suspensão [45].

Capítulo 3 - Objetivos

A utilização cada vez maior de plásticos sintéticos em embalagens alimentares, juntamente com o seu descarte inadequado, tem levantado sérias preocupações ambientais. Nesse sentido, o desenvolvimento de filmes a partir de biopolímeros, contendo compostos ativos, surge como uma alternativa sustentável às embalagens de plástico, contribuindo para o aumento do tempo de prateleira dos produtos e reduzindo o desperdício alimentar. Assim, o principal objetivo do trabalho experimental desta dissertação foi a encapsulação do OE de lavandim e sua incorporação em filmes de pululana, conferindo-lhes propriedades bioativas, para aplicação na indústria alimentar. Para isso, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

1. Desenvolver um método de encapsulamento do OE de lavandim em matrizes poliméricas, utilizando técnicas de emulsificação e/ou coacervação;
2. Observar e caracterizar a estrutura das cápsulas por microscopia eletrónica de varrimento, e avaliar as suas propriedades bioativas (antioxidante e antimicrobiana);
3. Produzir filmes de pululana incorporando o OE de lavandim previamente encapsulado;
4. Avaliar as propriedades físicas dos filmes obtidos, incluindo as suas propriedades óticas, mecânicas e de barreira;
5. Avaliar a atividade antioxidante e testar a eficácia dos filmes bioativos contendo o OE de lavandim como agente antimicrobiano, avaliando a sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogénicos.

Capítulo 4 - Materiais e métodos

4.1 Reagentes

O PLA (CAS: 26100-51-6), $[(C_3H_4O_2)_n]$ foi adquirido na MiniFIBERS, Inc. (Jonhson City, TN, EUA). O clorofórmio (CAS: 67-66-3), com massa molar de 119,38 g/mol ($CHCl_3$), o PVA (CAS: 9002-89-5), $[(C_2H_4O)_n]$ e o glicerol (anidro extra puro) (CAS: 56-81-5) com massa molar de 92,09 g/mol ($C_3H_8O_3$) foram adquiridos na Merck (Darmstadt, Alemanha). A pululana (CAS: 9010-66-6), com massa molar de 574,57 g/mol ($[C_{23}H_{42}O_{16}]_n$), foi adquirida na TCI Europe (Zwijndrecht, Bélgica). O OE de lavandim foi adquirido numa empresa produtora de OEs biológicos (Herdade de Vale Côvo, Mértola, Portugal).

4.2 Métodos

4.2.1 Óleo essencial de lavandim: extração e análise da composição química

O OE foi extraído a partir das flores da planta, provenientes de agricultura biológica, com origem no sul de França (Vaucluse), através de um processo de destilação por arrastamento de vapor utilizando um alambique tradicional [41].

A empresa CHROMESENCE realizou a análise da composição química do OE de acordo com a norma ISO 7609. Para esta análise, foram utilizadas as técnicas de cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), no modo *total ion chromatogram* (TIC). Os compostos foram identificados por GC-MS, processado no modo espectro completo e quantificados por GC-FID, utilizando a percentagem de área relativa. O equipamento utilizado foi o GC-FID Agilent Technologies 7820A/MS 5977B, com uma coluna DB-WAX UI 60 m × 0,25 mm × 0,5 μm. Como gás de arraste utilizou-se o hélio à pressão de 33 Psi no FID e 25,5 Psi no detetor MS (MSD) e injeção de 0,1 μL (MSD) em modo *split* [7]. Foi utilizado o seguinte programa de temperatura: 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 240°C, 10 min a 240°C.

4.2.1.1 Avaliação da atividade antioxidante

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

Ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH

Inicialmente, prepararam-se seis soluções com diferentes concentrações de OE em metanol (Tabela 1). De seguida, adicionaram-se 0,1 mL dessas amostras a 3,9 mL de três soluções metanólicas de DPPH (0,20; 0,12 e 0,08 mM).

Tabela 1-Diluições metanólicas do OE.

% (v/v)	V _{OE} (μL)	V _{Metanol} (μL)
100	1000	-
75	750	250
50	500	500
25	250	750
10	100	900
5	50	950

Foram escolhidas estas concentrações de DPPH devido à faixa de linearidade das soluções do composto, uma vez que concentrações acima de 0,2 mM podem resultar em desvios da lei de Lambert-Beer, enquanto concentrações abaixo de 0,05 mM produzem uma cor pouco intensa com uma faixa de leitura de absorvência limitada. O controlo negativo consistiu em 0,1 mL de metanol e 3,9 mL de cada solução de DPPH. As misturas reacionais foram incubadas durante 1,5 h à temperatura ambiente e na ausência de luz. Mediu-se a absorvência a 517 nm usando o espectrofotómetro Helios-Omega, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação (1).

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_c - A_a}{A_c} \times 100 \quad (1)$$

Onde a absorvência do controlo negativo é representada por A_c e a absorvência das amostras contendo o OE por A_a .

A IC_{50} , concentração que promove 50% de inibição, foi obtida a partir de uma curva de calibração, onde se representou graficamente a concentração do OE e a percentagem de inibição correspondente. A atividade antioxidante foi quantificada como o Índice de Atividade Antioxidante (IAA) e determinada utilizando a equação (2).

$$IAA = \frac{\text{Concentração final do DPPH no controlo negativo}}{IC_{50}} \quad (2)$$

O cálculo do valor do IAA leva em consideração a massa do DPPH e do OE, resultando numa constante independente da concentração tanto do DPPH quanto da amostra em análise. Com base neste valor, é possível classificar a atividade antioxidante do OE como: pobre ($IAA \leq 0,5$), moderada ($0,5 < IAA \leq 1,0$), forte ($1,0 < IAA < 2,0$) ou muito forte ($IAA \geq 2,0$) [47]. Os ensaios foram realizados em duplicado e as soluções de DPPH prepararam-se diariamente.

Teste de branqueamento do β -caroteno

O ensaio de branqueamento do β -caroteno avalia o poder de inibição da peroxidação lipídica. Depois da preparação da solução-mãe de β -caroteno (100 mg/mL em clorofórmio), adicionaram-se 100 μ L ao ácido linoleico (160 μ L), Tween 40 (1600 μ L) e clorofórmio (4 mL). Esta mistura foi evaporada a 45°C por 5 min num evaporador rotativo para a remoção do clorofórmio e imediatamente diluída com água destilada saturada com oxigénio (400 mL). A água foi adicionada lentamente efetuando uma agitação vigorosa até se formar uma emulsão. Como branco, utilizou-se uma emulsão preparada de modo similar à anterior substituindo a solução de β -caroteno por clorofórmio, incluindo 40 μ L de ácido linoleico, 400 μ L de Tween 40, 1 mL de clorofórmio e 100 mL de água destilada saturada com oxigénio. Seguidamente, adicionaram-se 5 mL da emulsão contendo β -caroteno a 300 μ L de diferentes diluições metanólicas do OE, conforme reportado na Tabela 1. O controlo negativo foi preparado com 5 mL da emulsão e 300 μ L de metanol [48].

Finalmente, os tubos foram agitados num vórtex e colocados em banho-maria a 50°C por 2 horas, sendo então as absorvências das amostras medidas num espectrofotómetro a 470 nm. Todas as medições foram realizadas em triplicado e para os controlos as medições foram feitas tanto no tempo inicial (t=0h) como no final (t=2h).

A atividade antioxidante do OE foi quantificada como a percentagem de inibição da oxidação do β -caroteno (% de Inibição) usando a equação (3).

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_a^{t=2h} - A_c^{t=2h}}{A_c^{t=0h} - A_c^{t=2h}} \times 100 \quad (3)$$

$A^{t=2h}$ representa a absorvência das amostras ou do controlo após a incubação e $A^{t=0h}$ a absorvência inicial do controlo [48].

4.2.1.2 Avaliação das propriedades antimicrobianas

As propriedades antimicrobianas do OE foram avaliadas contra seis espécies de microrganismos conservados a -80°C em meio Brain Heart Infusion (BHI) com 20% (v/v) de glicerol: três bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* LMG 16779 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e três Gram-negativas (*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Escherichia coli* ATCC 25922) [48].

Ensaio de difusão em disco

Inicialmente foi realizada uma repicagem das estirpes microbianas em meio BHI com 20 g/L de agar para promover a sua adaptação devido ao seu estado de criopreservação. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa a 37°C para serem posteriormente utilizadas no ensaio. Após a adaptação das culturas de microrganismos, o estudo foi conduzido seguindo a norma M2-A8

estabelecida pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003). Para o ensaio, discos de celulose com diâmetro de 6 mm foram impregnados com 15 µL do OE [48].

Preparou-se o inóculo através de uma suspensão direta de colónias isoladas selecionadas numa placa de agar, usando uma solução salina estéril (NaCl 0,85% m/v). Esta suspensão foi ajustada para uma turbidez de 0,5 McFarland equivalente a cerca de $1-2 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colónias (UFC)/mL. Para a inoculação das placas de teste, uma zaragatoa estéril foi mergulhada na suspensão microbiana e o excesso de líquido foi removido, girando a zaragatoa contra as paredes do tubo de Falcon. Seguidamente, o inóculo foi espalhado na superfície das placas de Petri contendo meio BHI, para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Listeria monocytogenes*, e Müeller-Hinton Agar (MHA), para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

As placas foram inoculadas esfregando a zaragatoa em toda a superfície, realizando três rotações da placa em aproximadamente 60°, garantindo uma disseminação tripla do inóculo, a zaragatoa foi ainda passada pela extremidade da caixa de Petri. Os discos impregnados com 15 µL de OE foram colocados uniformemente na superfície das placas de agar inoculadas. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa a 37°C por 24 horas. Decorrido este período, a área sem crescimento visível a olho nu foi considerada como inibição e os halos de inibição foram medidos em milímetros (mm) utilizando um paquímetro digital [49]. Este ensaio foi realizado de forma independente e em triplicado.

No final do ensaio de difusão em disco, as placas inoculadas foram observadas por microscopia ótica para verificar a inibição do crescimento microbiano após o período de incubação.

Determinação dos valores de concentração mínima inibitória: método da resazurina

Inicialmente, foram efetuadas diluições sucessivas do OE (de 32 a 0,25 µL/mL) numa placa de 96 poços (50 µL/poço), usando uma pipeta multicanal e Müeller-Hinton Broth (MHB) como meio de cultura. Para aumentar a solubilidade do OE, foi mantida a concentração máxima de dimetilsulfóxido (DMSO) em 2% (v/v). Seguidamente, adicionaram-se 10 µL da solução indicadora de resazurina (0,1%, m/v) diluída em MHB em cada poço, seguido de 30 µL de MHB. Por fim, adicionaram-se 10 µL da suspensão bacteriana (acertada para 0,5 McFarland) em cada poço. Cada placa continha um conjunto de controlos: uma coluna com todas as soluções sem o composto em estudo (OE), e uma coluna com todas as soluções sem a suspensão bacteriana, tendo sido adicionado o volume correspondente em falta com MHB. As amostras foram preparadas em duplicado e incubadas a 37 °C por 24 horas. A alteração de cor de azul para rosa ou incolor foi examinada visualmente e anotada como crescimento microbiano. O valor de CMI foi determinado como a menor concentração em que não ocorreu mudança de cor [49].

4.2.1.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para determinar os grupos funcionais presentes no OE foram adquiridos espectros de infravermelho com transformadas de *Fourier* (FTIR), utilizando um modelo *Nicolet iS10 smart iTRBasic* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA*). Procedeu-se à análise espectral num espectrómetro com resolução de 4 cm^{-1} , abrangendo uma região de 600 a 4000 cm^{-1} , com 64 varrimentos [50].

4.2.2 Preparação das cápsulas

Para a encapsulação do OE de lavandim, foi adaptado o protocolo de Gomes [45], esquematizado na Figura 2. Foram preparadas duas soluções, uma com 100 mg de PLA e 10 mL de clorofórmio e outra com 8,5 g de PVA em 100 mL de água destilada. À primeira solução foram adicionados 100 μL do OE de lavandim. A massa de PLA foi pesada numa balança analítica com precisão de $\pm 0,001$ g diretamente para um frasco com tampa, ao qual se adicionou o clorofórmio e o OE, fechando imediatamente o frasco para evitar a evaporação. Colocou-se a solução sob agitação lenta constante, cerca de 250 rpm, à temperatura ambiente. Após a dissolução completa do PLA, deixou-se em repouso, pelo menos, 24 horas para relaxação das cadeias do polímero. A segunda solução foi preparada num copo de vidro, num banho de polietilenoglicol, a 90°C e sob agitação. Finalmente adicionou-se a solução orgânica à solução aquosa e a mistura resultante foi sonicada durante 10 minutos a fim de obter uma emulsão.

O recipiente que continha a emulsão foi tapado com parafilm perfurado e colocado à temperatura ambiente numa placa com agitação lenta e constante durante pelo menos 24 horas, de forma a promover a evaporação total do clorofórmio. Decorrido este período obteve-se uma emulsão branca, a qual foi centrifugada durante 20 minutos a 14000 rpm, de forma a separar a fase aquosa das partículas depositadas no fundo do tubo. No final, realizaram-se 3 lavagens com água destilada à mesma velocidade de rotação durante 5 minutos. As partículas foram transferidas do tubo para uma placa de Petri e secas numa estufa à temperatura de 35°C. Após a secagem, as partículas foram moídas, num moinho de bolas, para completa homogeneização.

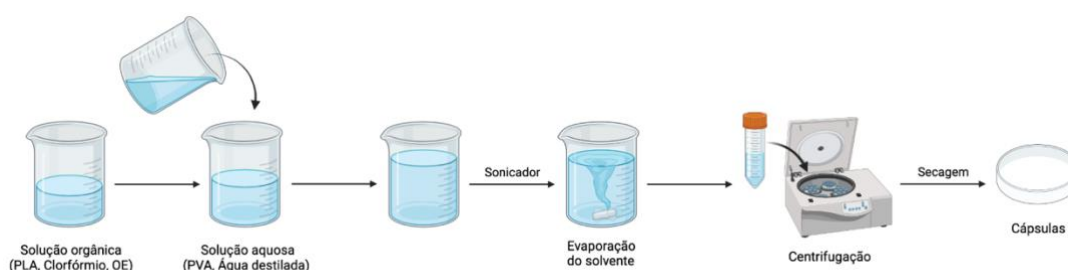


Figura 2-Representação esquemática da metodologia aplicada na preparação das cápsulas.

Além das cápsulas com OE, foram também preparadas cápsulas sem OE, seguindo o mesmo protocolo, no entanto, a solução orgânica continha apenas 100 mg PLA e 10 mL clorofórmio.

4.2.3 Caracterização das cápsulas

4.2.3.1 Análise da microestrutura

Com o objetivo de realizar a caracterização morfológica das cápsulas, recorreu-se à microscopia eletrônica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) com o auxílio do microscópio Hitachi S3400N. As amostras foram fixadas em suportes utilizando fita-cola de carbono de dupla face e, em seguida, foram revestidas com uma camada de ouro aplicada num evaporador de metais (Quorum Q150R ES) [28]. Antes da análise no SEM, as amostras foram secas e mantidas num exsiccador. Para determinar o tamanho médio das cápsulas foi utilizado o programa *ImageJ*.

4.2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana

À semelhança do que foi feito para o OE, foram também utilizadas as técnicas referidas anteriormente para a avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana das cápsulas (ensaio de difusão em disco).

Para avaliar a atividade antioxidante das cápsulas, as diluições do OE foram substituídas por uma solução-mãe de 500 mg/L contendo 1,25 mg de cápsulas (com e sem o OE encapsulado) e 2,50 mL de clorofórmio conforme documentado na Tabela 2.

Tabela 2-Diluições das soluções contendo as cápsulas.

mg /L	V _{solução-mãe} (μL)	V _{clorofórmio} (μL)
250	750	750
200	600	900
150	450	1050
100	300	1200
50	150	1350
25	75	1425

Para avaliar a atividade antimicrobiana das cápsulas, foram colocados pequenos aglomerados de cápsulas, com e sem OE, com um tamanho semelhante ao dos discos.

Depois do ensaio de difusão em disco, as placas inoculadas também foram observadas por microscopia ótica para verificar a inibição do crescimento microbiano pelas cápsulas após o período de incubação.

4.2.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Tal como foi realizado para a caracterização do OE, foi seguido o mesmo procedimento para determinar os grupos funcionais presentes nas cápsulas através de FTIR. Para além das amostras das cápsulas com e sem OE, foram igualmente analisados os seus constituintes, PLA e PVA.

4.2.3.4 Propriedades térmicas

Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

Para avaliar o comportamento térmico das cápsulas, foi efetuada uma análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*). Esta análise foi executada utilizando um calorímetro (Netzsch DSC 204, Selb, Alemanha), seguindo as seguintes configurações: intervalo de temperatura entre 30°C a 400°C, taxa de aquecimento de 10°C/min e atmosfera inerte. [10]. Para cada análise, foi inicialmente estabelecida a respetiva linha de base.

4.2.4 Preparação dos filmes

Filmes de pululana

Inicialmente, foram dissolvidas 3 g de pululana (3%, m/v) em 100 mL de água destilada. Esta mistura foi agitada usando um agitador magnético a 250 rpm durante 5 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, foi incluído na mistura o glicerol, 15% (m/m, relativamente à massa de pululana), como plastificante e a mesma foi agitada por mais 30 minutos à temperatura de 50°C [7].

Os filmes foram obtidos adicionando 16 mL da solução filmogénica em placas de Petri de poliestireno (9 cm de diâmetro), as quais foram posteriormente colocadas numa estufa ventilada a 60°C por um período de 2 a 3 horas. Após o tempo de secagem, os filmes resultantes foram destacados das placas de Petri e mantidos sob condições controladas de humidade relativa (HR) 50 ± 5% e temperatura 23 ± 2 °C.

Filmes de pululana com OE

Para preparar os filmes de pululana contendo o OE de lavandim, seguiu-se o mesmo protocolo com uma pequena diferença: foi adicionado à solução, 15% OE (m/m, relativamente à massa de pululana) sob agitação magnética durante 10 minutos, a 50 °C. No final, esta mistura foi homogeneizada por 5 minutos a 10000 rpm usando um homogeneizador IKA T25 Digital Ultra-Turrax (Staufen, Alemanha) [7].

Filmes de pululana com cápsulas (com e sem OE)

No caso dos filmes com incorporação das cápsulas, com e sem o OE encapsulado, foram adicionados 15% (m/m relativamente à massa de pululana) de cada amostra, sob agitação magnética durante 10 minutos, a 75 °C. De salientar, que para estes filmes as soluções não foram homogeneizadas no Ultra-Turrax para não destruir as cápsulas.

De forma a facilitar a identificação das amostras na apresentação e tratamento dos resultados foi adotada a seguinte terminologia: Filmes de pululana – Pu; Filmes de pululana com o OE – PuOE;

Filmes de pululana com as cápsulas sem o OE encapsulado – Pu+cápsulas s/OE; Filmes de pululana com as cápsulas contendo o OE encapsulado – Pu+cápsulas c/OE.

4.2.5 Caracterização dos filmes

4.2.5.1. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana

Foram utilizadas as mesmas técnicas para a avaliação das atividades antioxidante, substituindo os volumes de OE por 3 discos com de 6 mm de diâmetro, e antimicrobiana pelo ensaio difusão em disco, utilizando um disco de 6 mm de diâmetro.

No ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH, foram misturados os discos dos filmes com a solução metanólica de DPPH 0,1 mM e colocados durante 8 h na ausência de luz. Decorrido este período, foram lidas as absorvências.

No final do ensaio de difusão em disco, à semelhança do que foi feito para o OE e para as cápsulas, as placas inoculadas foram observadas por microscopia ótica para verificar a inibição do crescimento microbiano e a integridade dos filmes após o período de incubação.

4.2.5.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As condições para a obtenção dos espectros de FTIR dos filmes foram semelhantes às utilizadas para as cápsulas e já descritas anteriormente.

4.2.5.3. Propriedades térmicas

Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

À semelhança do que foi feito para as cápsulas, o comportamento térmico dos filmes foi igualmente avaliado por DSC, com o auxílio do mesmo equipamento e seguindo as condições descritas.

4.2.5.4 Propriedades estruturais dos filmes

Gramagem

A gramagem (G) dos filmes foi obtida através do cálculo do quociente entre a massa (g) dos filmes, adquirida numa balança analítica com uma precisão de $\pm 0,001$ g, e a sua área (m²). Este cálculo segue a norma ISO 536:1995 e foi realizada de acordo com a equação (4) [51].

$$G = \frac{\text{massa (g)}}{\text{área (m}^2\text{)}} (4)$$

Espessura

A medição da espessura foi realizada em cinco pontos aleatórios de cada amostra utilizando um micrómetro (AdameLhomargy mi 20), com uma sensibilidade de $\pm 0,001$ mm. Este procedimento seguiu, parcialmente, a norma ISO 534:2011 [51].

Densidade aparente

A densidade aparente, também conhecida por massa volúmica (g/cm^3) consiste no quociente entre a gramagem e espessura média de cada filme, conforme reporta a equação (5), seguindo a norma ISO 534:2011.

$$Densidade\ aparente = \frac{G\ (g/cm^2)}{espessura\ (cm)} \quad (5)$$

4.2.5.5 Propriedades mecânicas

Para a caracterização das propriedades mecânicas dos filmes foram efetuados ensaios de tração, tendo sido avaliada a resistência à tração (N/m^2), alongamento (%), índice de tração ($N.m/g$) e módulo de Young (MPa). Os ensaios foram realizados no equipamento Thwing-Albert Instruments Co., modelo EJA, seguindo a norma ISO 1924/2, com algumas adaptações: distância inicial entre as garras de 5 cm e velocidade de ensaio de 10 mm/min. Os filmes foram previamente cortados, numa guilhotina de dupla lâmina, com dimensões de 7 cm \times 1,5 cm [51]. O valor de cada um dos parâmetros mecânicos avaliados corresponde ao resultado da média de quatro medições para cada filme. Durante o teste, uma carga uniaxial com velocidade constante foi aplicada à amostra, resultando numa curva característica de tensão em função da deformação. [10].

4.2.5.6 Ângulo de contacto e energia livre de superfície

Para analisar a hidrofobicidade da superfície dos filmes, utilizou-se a técnica de medição do ângulo de contato (θ) com água. O ângulo de contato é o ângulo formado entre a superfície de uma gota de líquido e a superfície do sólido no ponto trifásico onde coexistem as 3 fases. Neste ponto existem três forças, a tensão superficial do líquido, a tensão interfacial entre o líquido e o sólido e a tensão superficial do sólido.

A equação de Young (9) é usada para descrever quantitativamente os fenómenos de molhabilidade e relaciona o ângulo de contacto com as três forças envolvidas no ponto trifásico [52].

$$\gamma_{l-v} \times \cos\theta = \gamma_{s-v} - \gamma_{s-l} \quad (9)$$

Onde γ_{s-v} , γ_{l-v} e γ_{s-l} são respetivamente as tensões interfaciais entre o sólido-vapor, líquido-vapor e sólido-líquido [14].

Para analisar a energia de superfície das amostras, foi ainda medido o ângulo de contacto com diiodometano e etilenoglicol. Usou-se o método de Owens, Wendt, Rabel and Kaelble (OWRK) e os valores da tensão superficial dos líquidos foram retirados da biblioteca do software do equipamento, selecionando os valores dos seguintes autores, água e diiodometano - Ström *et al*; etilenoglicol – Erbil [53].

Os ângulos de contacto θ foram medidos no equipamento OCAH 200 DataPhysics pelo método da gota sésil, usando uma seringa Hamilton de 500 μL para cada um dos líquidos. Foi depositada sobre a superfície de cada filme uma gota de 4 μL para a água e etilenoglicol e 2 μL para o diiodometano. Foram efetuadas 6 a 8 medições em cada uma das faces do filme e calculou-se o valor médio [28].

4.2.5.7 Propriedades barreira

Permeabilidade ao vapor de água (WVP)

Foram realizadas as medições da permeabilidade ao vapor de água (WVP, g/(Pa.dia.m)) e da taxa de transmissão de vapor de água (WVTR; g/(m².dia)), seguindo a norma ASTM E96-00 [28].

Colocou-se em cada caixa um meio absorvente, 13 g de cloreto de cálcio anidro (CaCl₂), previamente seco em estufa a 105°C, originando, assim, um nível de 0% de humidade relativa no interior de cada uma. Posteriormente, o filme foi posicionado entre a abertura da caixa e uma moldura, sendo o conjunto selado com a ajuda de seis garras com parafuso. A natureza higroscópica do CaCl₂ permitiu estabelecer um gradiente de absorção de vapor de água através do filme, dependendo da sua permeabilidade [13].

As amostras foram submetidas a condições de temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e humidade relativa de $50 \pm 2\%$ na face superior, com uma área de exposição da amostra de 31 cm².

As variações gravimétricas foram monitorizadas em intervalos de 2 horas durante um período de 48 horas. O gradiente foi obtido a partir do declive de uma regressão linear realizada entre a variação de peso e o tempo. A WVTR foi calculada de acordo com a equação (10).

$$WVTR = \frac{\frac{\Delta m}{\Delta t}}{A} \quad (10)$$

Nesta equação (10), Δm representa a variação da massa das caixas de teste (g), A denota a área de teste (m²), Δt indica a variação no intervalo de tempo de teste (dia), $\Delta m/\Delta t$ corresponde ao declive da reta resultante das 13 medições da massa das caixas, expressa em g/dia. O cálculo da WVP foi realizado de acordo com a equação (11).

$$WVP = \frac{WVTR}{\Delta p} = \frac{WVTR}{p(RH_1 - RH_2)} \times e \quad (11)$$

Na equação (11), p representa a pressão de vapor de água a 23°C (2811 Pa), RH1 indica a umidade relativa na face superior do filme (50 %), RH2 corresponde à umidade relativa na face inferior do filme (0%), e refere-se à espessura (m) das amostras [50]. Cada amostra foi submetida a ensaios em duplicado.

4.2.5.8 Propriedades óticas

A análise da cor e da transparência dos filmes foi realizada recorrendo a um espectrofotômetro Technidyne Color Touch 2 (New Albany, IN, EUA). As leituras foram executadas utilizando o iluminante D65 e com um ângulo de observação de 10°. O sistema de cor selecionado foi o CIE L*a*b*, no qual as coordenadas cromáticas representam: L* (luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco)), a* (varia entre -10 (verde) e +10 (vermelho) e b* (oscila entre -10 (azul) e +10 (amarelo)).

A transparência das amostras foi medida no mesmo equipamento utilizando a equação (12), seguindo a norma ISO 22891 [50].

$$T = \sqrt{(R_w - R_0) \left(\frac{1000}{R_{(w)}} - R_0 \right)} \quad (12)$$

Na equação (12), T corresponde à transparência, R_w à refletância da amostra em % quando colocada sobre um fundo branco, R_0 representa a refletância da amostra em relação a um fundo negro e $R_{(w)} = 90,41$ refere-se à refletância do fundo branco utilizado como referência.

4.2.5.9 Análise de resultados

Os resultados obtidos foram tratados no programa Microsoft Excel e posteriormente apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão (DP). Os resultados foram analisados pelo teste T de Student, assumindo que as variáveis contínuas tinham distribuição normal. As diferenças significativas foram consideradas para as situações em que o valor de p fosse inferior a 0,05 (intervalo de confiança de 95%).

Capítulo 5 - Resultados e discussão

Neste trabalho, foi realizada uma análise da composição química do OE de lavandim, a sua encapsulação e uma análise das suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, tanto do OE como das cápsulas. Adicionalmente, foram realizados diversos testes aos filmes de pululana, filmes de pululana contendo o OE e filmes de pululana com cápsulas (com e sem OE), abordando propriedades físicas, de barreira, óticas e de superfície, bem como as suas atividades antioxidantes e antimicrobianas, possibilitando uma caracterização abrangente dos materiais desenvolvidos.

5.1 Análise química do OE

A análise química do OE de lavandim foi efetuada por GC estando o cromatograma obtido representado na Figura 3.

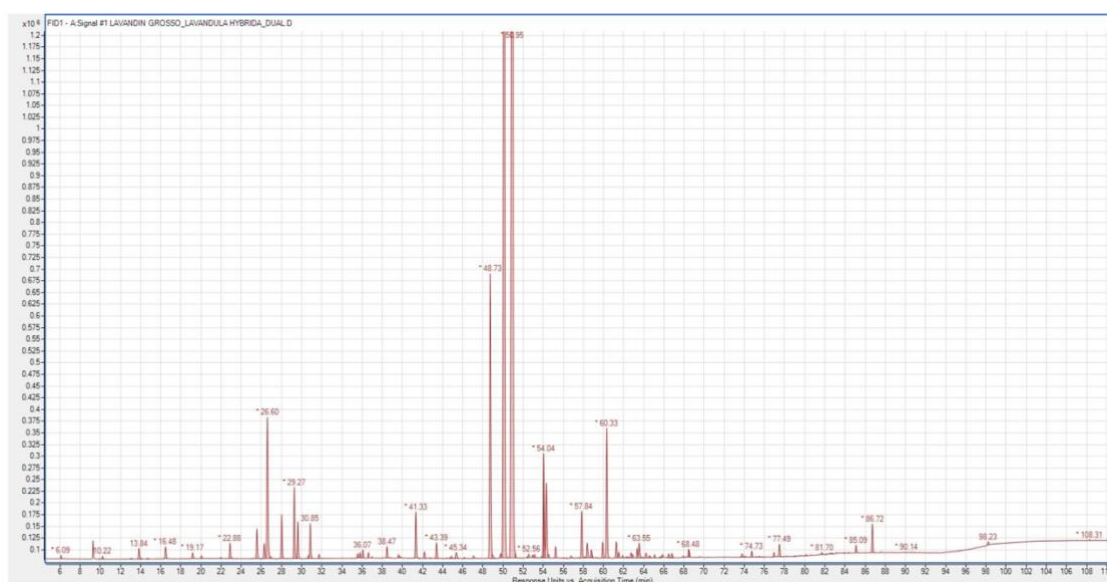


Figura 3-Cromatograma do OE de lavandim.

Os resultados da análise da composição química do OE investigado neste trabalho estão documentados na Tabela 3. Um total de 97 compostos foram identificados no OE, correspondendo a uma taxa de identificação de 99,34% da sua composição química. Entre os compostos identificados, aqueles cuja percentagem relativa excede 1% foram: 1,8-cineol, cânfora, linalool, acetato de linalilo, acetato de lavandulilo, *trans*- β -cariofileno e borneol. Estes resultados são concordantes com os documentadas previamente por outros autores [37]. Na Tabela 3 constam os compostos registados por ordem de eluição.

Tabela 3-Análise da composição química do OE de lavandim.

Tempo de retenção (min)	Compostos	% Relativa	Família química
-------------------------	-----------	------------	-----------------

6,09	Acetona	0,03	Cetona alifática
10,22	Éter metil hexílico	0,04	Éter alifático
13,04	Triciclono	0,02	Monoterpeno
13,84	α -Pinenno	0,19	Monoterpeno
14,04	α -Thujeno	0,01	Monoterpeno
16,48	Canfeno	0,23	Monoterpeno
19,17	β -Pinenno	0,12	Monoterpeno
20,04	Sabineno	0,05	Monoterpeno
21,98	δ -3-Careno	0,02	Monoterpeno
22,88	β -Mirceno	0,26	Monoterpeno
23,07	α -Felandreno	0,01	Monoterpeno
25,18	2,3-Desidro-1,8-cineol	0,01	Monoterpeno
25,55	Limoneno	0,52	Éter monoterpénico
26,28	β -Felandreno	0,27	Monoterpeno
26,60	1,8-Cineol	2,75	Éter monoterpénico
26,93	Butirato de butilo	0,04	Éster alifático
28,02	<i>cis</i> - β -Ocimeno	0,74	Monoterpeno
29,27	<i>trans</i>-β-Ocimeno	1,17	Monoterpeno
29,62	3-Octanona	0,59	Cetona alifática
30,48	<i>m</i> -Cymeno	0,01	Monoterpeno
30,69	<i>p</i> -Cymeno	0,05	Monoterpeno
30,85	Hexil acetato	0,58	Éster alifático
31,72	α -Terpinoleno	0,07	Monoterpeno
35,56	6-Metil-5-Hepten-2-ona	0,08	Cetona alifática
35,79	Hexil propanoato	0,09	Éster alifático
36,07	Hexil isobutirato	0,14	Éster alifático
36,63	<i>n</i> -Hexanol	0,08	Álcool alifático
37,00	Epóxido de α -pineno	0,02	Éter monoterpénico
38,07	Aloocimeno	0,01	Monoterpeno
38,47	Acetato de 1-Octen-3-il	0,19	Éster alifático
38,78	<i>cis</i> -3-Hexenol	0,01	Álcool alifático
39,63	3-Octanol	0,06	Álcool alifático
39,97	Rosefurano	0,01	Éter monoterpénico
41,33	Hexil butirato	0,76	Éster alifático
42,19	Hexil 2-metil butirato	0,11	Éster alifático
43,39	Óxido de <i>cis</i> -linalool (Furanoide) + 1-Octen-3-ol	0,2	Óxido monoterpénico
44,71	Miróxido	0,01	Éter monoterpénico
44,88	Hidrato <i>trans</i> -sabineno	0,03	Álcool monoterpénico
45,34	Óxido de <i>trans</i> -linalool (Furanoide)	0,14	Óxido monoterpénico
47,08	Dauceno	0,05	Sesquiterpeno
48,73	Cânfora	5,35	Cetona monoterpénica
48,93	β -Bourbonene	0,07	Sesquiterpeno
49,76	Sesquithujeno	0,09	Sesquiterpeno
50,12	Linalool	32,18	Álcool monoterpénico
50,61	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	0,01	Álcool monoterpénico
50,95	Acetato de linalilo	41,48	Éster monoterpénico
51,18	7-epi-Sesquithujene	0,07	Sesquiterpeno
51,58	<i>trans-p</i> -Ment-2-en-1-ol	0,01	Álcool monoterpénico
52,46	α -Santalene	0,02	Sesquiterpeno
52,56	Formato de bornilo	0,07	Éster monoterpénico

52,96	Acetato de bornilo	0,05	Éster monoterpénico
53,14	<i>trans-α</i> -bergamota	0,07	Sesquiterpeno
53,82	Hidrato de canfeno	0,02	Álcool monoterpénico
54,04	Acetato de lavandulilo	1,62	Éster monoterpénico
54,07	Terpinen-4-ol	0,22	Álcool monoterpénico
54,30	<i>trans-β</i>-Cariofileno	1,38	Sesquiterpeno
54,30	Hexil caproato	0,06	Éster
54,52	Hexil tiglato	0,19	Éster alifático
55,23	Isogermacreno D	0,04	Sesquiterpeno
56,79	<i>trans</i> -Pinocarveol	0,02	Álcool monoterpénico
57,44	<i>trans-β</i> -Farneseno	0,78	Sesquiterpeno
57,84	Lavanda lactona	0,03	Éster
58,15	Lavandulol	0,28	Álcool monoterpénico
58,39	Criptona	0,13	Cetona
58,80	<i>α</i> -Humuleno	0,05	Sesquiterpeno
59,49	<i>cis-β</i> -Farnesene	0,01	Sesquiterpeno
59,93	<i>α</i> -Terpineol	0,26	Álcool monoterpénico
60,33	Borneol	2,27	Álcool monoterpénico
61,27	Germacreno D	0,31	Sesquiterpeno
61,52	Acetato de nerilo	0,1	Éster monoterpénico
61,91	<i>β</i> -Bisaboleno	0,05	Sesquiterpeno
62,30	Óxido <i>cis</i> -linalool (Piranoide)	0,03	Óxido monoterpénico
62,74	Butirato de geranilo	0,09	Éster monoterpénico
62,90	Biciclogermacreno	0,06	Sesquiterpeno
63,35	Acetato de geranilo	0,16	Éster monoterpénico
63,55	Lavandulil isovalerato	0,28	Éster
63,72	Isodauceno	0,01	Sesquiterpeno
63,93	<i>δ</i> -Cadinene	0,02	Sesquiterpeno
64,24	<i>γ</i> -Cadineno	0,09	Sesquiterpeno
64,57	<i>β</i> -Sesquiphellandrene	0,03	Sesquiterpeno
64,64	<i>trans-α</i> -Bisaboleno	0,01	Sesquiterpeno
65,09	Cuminaldeído	0,05	Aldeído monoterpénico
65,87	Nerol	0,05	Álcool monoterpénico
66,85	2,6-Dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol	0,02	Álcool
67,94	<i>trans</i> -Carveol	0,02	Álcool monoterpénico
68,21	<i>m</i> -Cymen-8-ol	0,01	Éster monoterpénico
68,48	Geraniol	0,13	Álcool monoterpénico
68,53	<i>p</i> -Cymen-8-ol	0,05	Álcool monoterpénico
74,73	<i>cis</i> -8-Hidroxilinalool	0,1	Álcool
76,94	Óxido de cariofileno (Isómero I)	0,08	Epóxido sesquiterpénico
77,49	Óxido de cariofileno (Isómero II)	0,23	Epóxido sesquiterpénico
79,03	<i>trans</i> -Nerolidol	0,01	Álcool sesquiterpénico
80,62	1,10-Di-epi-cubenol	0,01	Álcool sesquiterpénico
81,70	<i>p</i> -Cymen-7-ol	0,04	Álcool monoterpénico
85,09	<i>τ</i> -Cadinol	0,13	Álcool sesquiterpénico
86,72	<i>α</i> -Bisabolol	0,45	Álcool sesquiterpénico
98,23	Cumarina	0,06	Cetona

Pela análise do cromatograma, e da tabela, concluiu-se que os compostos maioritários do OE de lavandim são o linalool com uma percentagem relativa de 32, 18 %, e o acetato de linalilo com uma percentagem relativa de 41,48 % cuja estrutura química está documentada na Figura 4 e Figura 5.

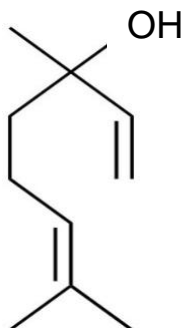


Figura 4-Estrutura química do linalool.

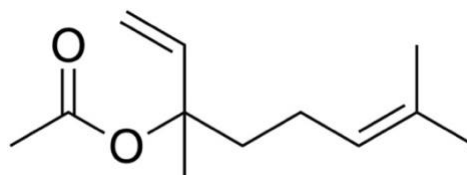


Figura 5-Estrutura química do acetato de linalilo.

O OE de lavandim, cujos principais constituintes são o linalool e acetato de linalilo, tem sido relatado como tendo atividades antimicrobianas e antioxidantes. Estes são os principais componentes de muitos OEs conhecidos por possuírem várias atividades biológicas, atribuíveis a esses compostos monoterpênicos [40]. Segundo Carrasco *et al.* [54], os OEs de lavandim apresentam boas propriedades antioxidantes, principalmente devido ao linalool e ao acetato de linalilo [55].

Como a relação entre concentração de OE de lavandim e inibição de microrganismos patogêneos por vezes não é clara, esta pode ser relacionada com a concentração de linalool, conhecido por possuir atividade antimicrobiana [56]. A inibição aumenta com a concentração de linalool. No entanto, é possível que a atividade dos componentes principais varie por outros constituintes menores por meio de um efeito sinérgico, o que pode explicar variações da inibição com a concentração do OE de lavandim [16].

5.1.1 Avaliação da atividade antioxidante

Um antioxidante é caracterizado como uma substância que impede ou retarda a oxidação lipídica, que constitui uma das principais razões para a deterioração dos alimentos, evitando o desenvolvimento de ranço, a perda de nutrientes e a formação de substâncias nocivas [57]. Com o propósito de avaliar as propriedades antioxidantes do OE, foram aplicados dois métodos *in vitro*.

Ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH

No método do DPPH, foi analisada a capacidade do OE em atuar como doador de átomos de hidrogénio ou eletrões na conversão do DPPH na sua forma reduzida, DPPH-H. O OE apresentou capacidade de sequestração dos radicais livres do DPPH, resultando na mudança de coloração da

solução de roxo para amarelo, indicando uma atividade antioxidante muito forte ($IC_{50} = 1,84 \pm 0,24$ (% v/v), $AAI = 2,68 \pm 0,41$). Os óleos essenciais de *Lavandula* são reconhecidos por serem ricos em terpenóides oxigenados, principalmente monoterpenos, que têm uma capacidade significativa de neutralizar os radicais livres [58].

Teste de branqueamento do β -caroteno

Procedeu-se também ao ensaio de branqueamento do β -caroteno, com o propósito de analisar a capacidade do OE em impedir a peroxidação lipídica, resultando num valor de $IC_{50} = 44,85 \pm 2,55$ (%v/v) e revelando boas propriedades antioxidantes quando comparado com outros OEs [7]. Este teste trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno e mede a inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. Antioxidantes eficazes reduzem a descoloração da emulsão, causada pela oxidação do ácido linoleico, que ataca o β -caroteno, resultando na perda de sua cor alaranjada. A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoleico, prolongando o período de formação dos radicais [59]. De acordo com a literatura, *L. angustifolia* possui uma alta atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica [37].

5.1.2 Avaliação das propriedades antimicrobianas

Foram realizados diversos ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana do OE, incluindo o teste de difusão em disco.

Ensaio de difusão em disco

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4, evidenciando a atividade antimicrobiana do OE contra todas as bactérias examinadas. Em testes de difusão em agar, as bactérias Gram-negativas são menos suscetíveis que as Gram-positivas, exibindo halos de inibição de menor diâmetro. A literatura menciona que a resistência das bactérias Gram-negativas resulta das propriedades da membrana externa desses microrganismos, que conferem uma hidrofobicidade acentuada à sua superfície bacteriana, funcionando como uma forte barreira.

Tabela 4-Resultados do ensaio de difusão em disco para o OE de lavandim (média \pm DP).

Diâmetro dos halos de inibição (mm)	Gram-positivas	<i>E. fecalis</i> ATCC 29212	9,69 \pm 0,13
		<i>L. monocytogenes</i> LMG16779	10,51 \pm 1,65
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18,67 \pm 1,00
	Gram-negativas	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	9,46 \pm 0,72
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8,15 \pm 0,70
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,24 \pm 0,88

A atividade antibacteriana do OE destaca-se pela formação de halos de inibição tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas. O maior halo de inibição foi observado contra *S. aureus* ATCC 25923 apresentando um diâmetro de 18,67 mm, enquanto o menor corresponde a

P. aeruginosa ATCC 27853 com 8,15 mm. Adicionalmente, o OE revelou halos de inibição consideráveis nas bactérias Gram-negativas, demonstrando uma atividade antimicrobiana eficaz.

Os OEs de *Lavandula* provaram ser um eficaz e económico agente antimicrobiano sendo uma potencial alternativa aos medicamentos convencionais. Vários estudos mostraram os efeitos antimicrobianos dos OEs de *L. angustifolia* e *L. hybrida*, tendo sido verificados efeitos mais significativos para bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, em relação a bactérias Gram-negativas, como *E. coli* [16]. Apesar dessa tendência, outras espécies de *Lavandula* demonstraram efeitos antibacterianos significativos em relação a bactérias gram-negativas, como *S. Typhimurium* [60].

Determinação dos valores de concentração mínima inibitória: método da resazurina

A capacidade antimicrobiana de um composto pode ser medida com base na menor concentração desse composto que consegue inibir completamente o crescimento de um microrganismo específico, sendo designada por Concentração Mínima Inibitória (CMI). Podemos observar os valores de CMI determinados para o OE na Tabela 5. Estes valores foram obtidos através do ensaio de microdiluição, utilizando como indicador de crescimento a resazurina. Esta, inicialmente apresenta uma cor azul, e ao ser reduzida, adquire uma tonalidade mais rosada ou, passado mais algum tempo, incolor.

Tabela 5-Resultados da CMI ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de OE de lavandim (valores modais).

CMI ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Gram-positivas	<i>E. fecalis</i> ATCC 29212	> 32
		<i>L. monocytogenes</i> LMG16779	> 32
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	32
	Gram-negativas	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	> 32
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	32
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	32

O OE inibiu, apesar de pouco, todos os microrganismos testados. Os microrganismos mais sensíveis ao OE foram: *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922, com um valor de CMI de 32 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Segundo Pljevljakušić *et al.* [58], a variação na inibição pode ser atribuída aos constituintes da membrana celular das bactérias. As bactérias gram-positivas têm uma parede celular, composta principalmente por uma camada de peptidoglicano, mais suscetível a agentes antimicrobianos, enquanto as gram-negativas possuem uma parede celular mais fina, que é envolvida por uma membrana externa que age como uma barreira adicional, que os torna mais resistentes à penetração de tais agentes. Os óleos essenciais funcionam como agentes antibacterianos devido à presença de componentes hidrofóbicos que lhes permitem acumular-se nas membranas celulares das bactérias, perturbando as suas estruturas e

aumentando a permeabilidade das membranas, o que, por sua vez, resulta na desestabilização e morte das bactérias.

5.1.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

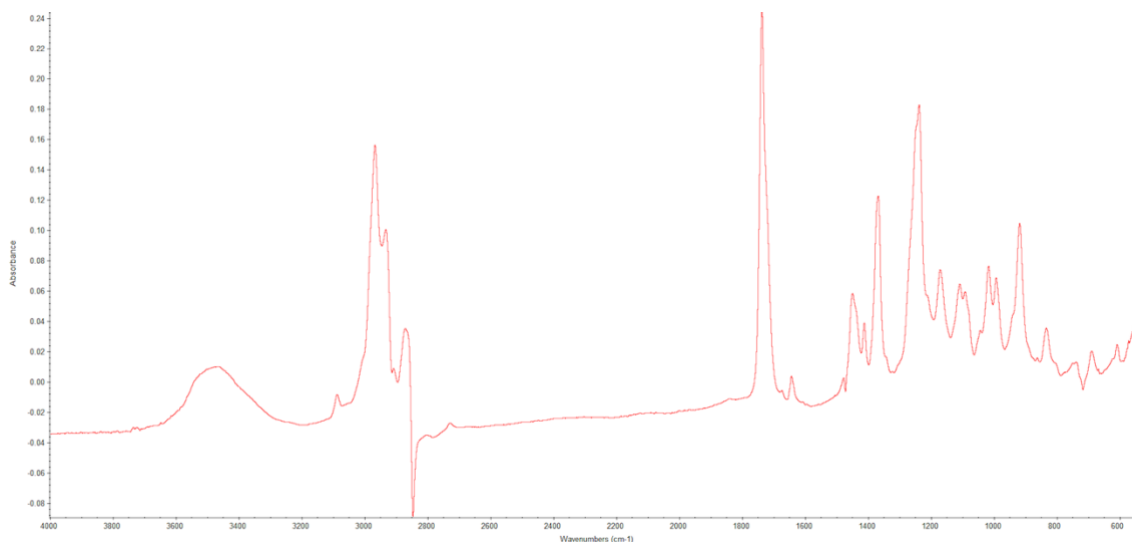


Figura -Espectro de FTIR do OE de lavandim.

A banda identificada a 3500 cm^{-1} está associada ao alongamento das ligações O-H do grupo hidroxilo, um pico típico dos álcoois, na região dos 2900 cm^{-1} observam-se as bandas atribuídas à vibração de alongamento das ligações C-H dos constituintes do OE. A banda identificada a 1750 cm^{-1} diz respeito à ligação C=O, confirmando a existência de um dos compostos maioritários, acetato de linalilo. Na região de 1700 e 1500 cm^{-1} surgem os picos atribuídos à vibração de alongamento das ligações C=C presente em ambos os compostos maioritários (Figura 4 e Figura 5). Os picos situados a 1300 cm^{-1} e entre 1200 e 850 cm^{-1} correspondem às vibrações de alongamento e flexão das ligações -CH₂, -CH, -OH e CO. Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados publicados por Chaar [61] e Rodríguez-López *et al.*[62] relativamente ao acetato de linalilo e ao linalool.

5.2 Análise das cápsulas

5.2.1 Análise da microestrutura

Para analisar as cápsulas, começou-se por uma caracterização da sua estrutura por SEM. As imagens de SEM das cápsulas, apresentadas na Figura 6, permitem uma fácil identificação da sua estrutura. Através do *software ImageJ*, foi possível determinar o tamanho médio das cápsulas. Para as amostras sem OE, obtiveram-se cápsulas esféricas com $0,585 \pm 0,067\ \mu\text{m}$ e para as amostras com OE, obtiveram-se esferas maiores (Figura 6), com $1,242 \pm 0,138\ \mu\text{m}$.

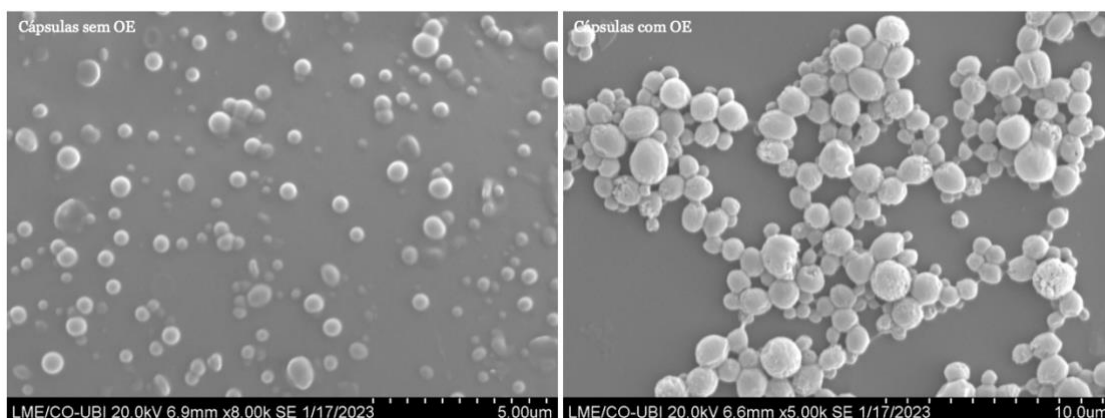


Figura 6-Imagens SEM das cápsulas obtidas.

5.2.2 Avaliação da atividade antioxidante

No ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH, as cápsulas sem OE não apresentaram atividade antioxidante, pois não têm o composto ativo. As cápsulas com o OE encapsulado apresentaram uma fraca atividade antioxidante, $IC_{50}=265,30 \pm 39,50\%$, m/v e $AAI=0,15 \pm 0,01$. A atividade antioxidante diminuiu, comparativamente à do OE livre, o que seria de esperar visto que um dos motivos para se efetuar o seu encapsulamento é o de obter uma libertação mais gradual e controlada do OE. No teste de branqueamento do β -caroteno, nenhuma das cápsulas apresentou atividade antioxidante.

5.2.3 Avaliação das propriedades antimicrobianas

Para as cápsulas, foram ainda avaliadas as suas propriedades antimicrobianas com o ensaio de difusão em disco. Não foi possível determinar o valor de CMI uma vez que as cápsulas não solubilizam em DMSO.

Ensaio de difusão em disco

Um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver embalagens ativas, com propriedades antimicrobianas, encapsulando um composto ativo, neste caso, o OE de lavandim. Pelos resultados apresentados na Tabela 6, pode constatar-se que as cápsulas apenas inibiram, por contacto, o crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Verificou-se uma fraca atividade antimicrobiana das cápsulas. Rosa *et al.* [44] verificaram que, apesar de as cápsulas de linalool e PLA apresentarem alguma atividade antimicrobiana, esta é baixa. Nesse trabalho, as cápsulas foram perdendo a capacidade antimicrobiana. No entanto, após 28 dias de armazenamento, as cápsulas apresentaram inibição contra algumas bactérias (*E. coli*), indicando que a libertação do princípio ativo ocorre em duas etapas, provavelmente devido à morfologia interna das partículas formadas ser capaz de acomodar o princípio ativo, enquanto uma quantidade provavelmente ficou fora das cápsulas, promovendo a atividade antimicrobiana durante os primeiros sete dias de testes.

Tabela 6- Resultados do ensaio de difusão em disco para as cápsulas (média \pm DP).

Diâmetro dos halos de inibição (mm)			Cápsulas sem OE	Cápsulas com OE
Gram-positivas		<i>E. fecalis</i> ATCC 29212	0 \pm 0	0 \pm 0
		<i>L. monocytogenes</i> LMG16779	0 \pm 0	0 \pm 0
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0 \pm 0	0 \pm 0
Gram-negativas		<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	0 \pm 0	0 \pm 0
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6 ⁺ \pm 0	6 ^a \pm 0
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	0 \pm 0	0 \pm 0

⁺ Inibição por contacto.

5.2.3 Espetroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros das cápsulas foram analisados para entender as interações entre o composto ativo e o PLA, onde este está encapsulado. Para uma melhor caracterização das cápsulas obtidas, analisaram-se os espectros de FTIR dos compostos que as constituem: PLA e PVA.

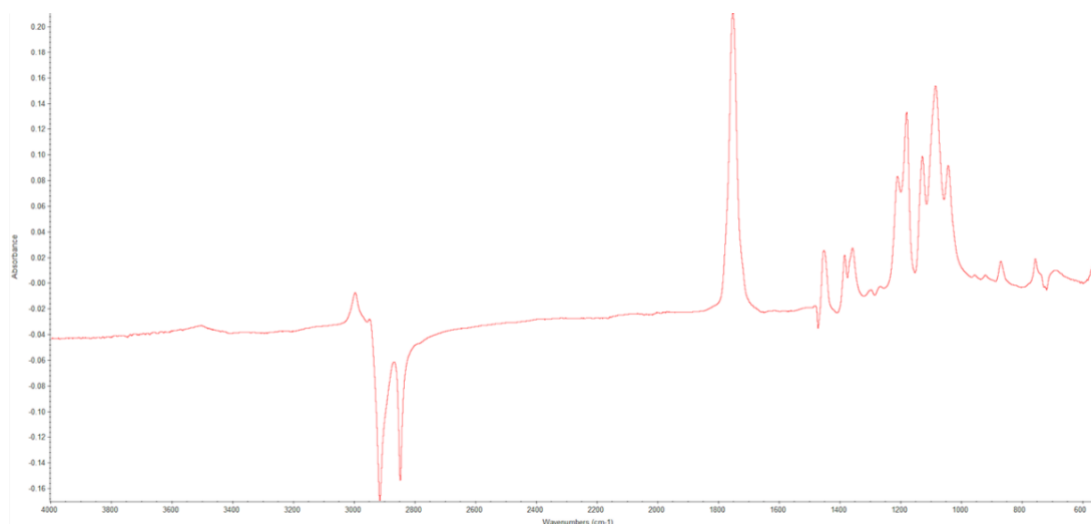


Figura 7-Espectro de FTIR do PLA.

Para o espectro do PLA, o pico mais intenso, detetado a 1750 cm^{-1} , corresponde à ligação C=O. A 1400 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} surgem a bandas correspondentes à vibração de flexão C-H e CH₃, respetivamente. A banda observada a 1150 cm^{-1} diz respeito a ligações CO, o que está coincidente com a estrutura do PLA (Figura 8) e com os resultados obtidos por Liu [63].

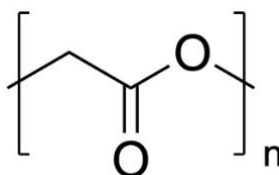


Figura 8-Estrutura química do PLA.

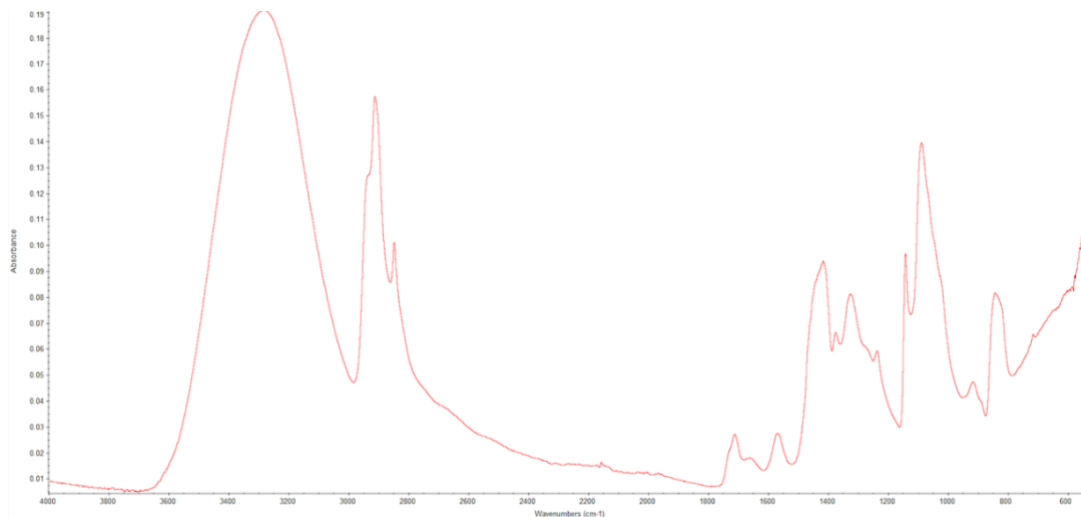


Figura 9-Espectro de FTIR do PVA.

Para o espectro do PVA, a banda identificada a 3350 cm^{-1} é representativa do alongamento das ligações O-H do grupo hidroxilo, uma característica intrínseca a todos os álcoois, aos 2900 cm^{-1} a banda está associada à vibração de alongamento das ligações C-H de todos os constituintes do hidrocarboneto, enquanto a banda de 1100 cm^{-1} representa ligações C-O, o que está coincidente com a estrutura do PVA (Figura 10) e com o estudo publicado por Fathi *et al.* [64].

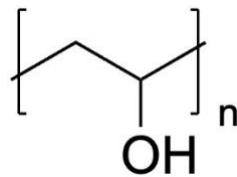


Figura 10-Estrutura química do PVA.

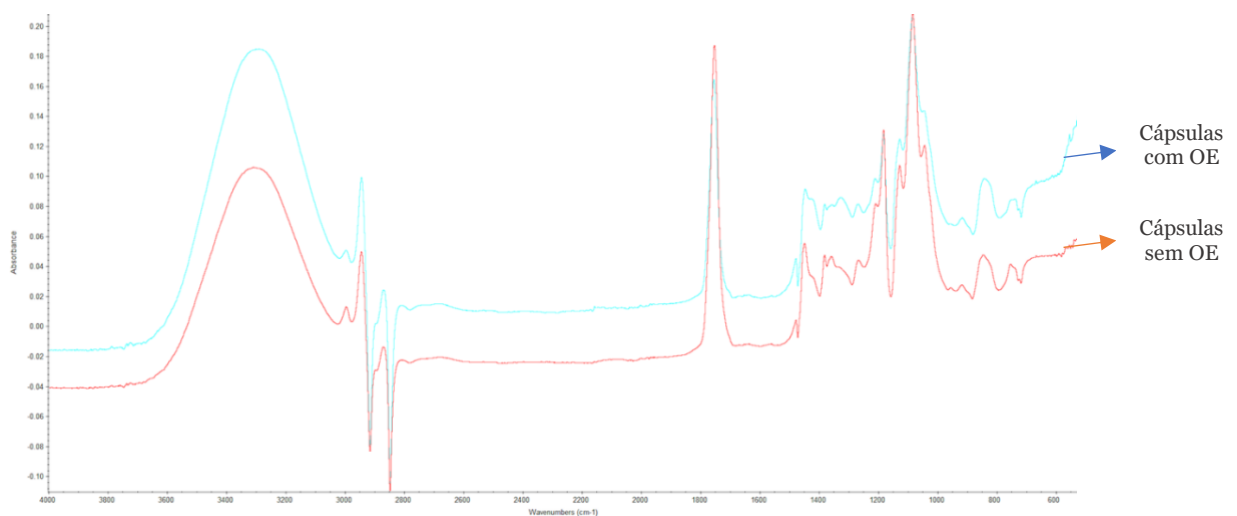


Figura 11-Espectro de FTIR das cápsulas, com e sem OE de lavandim.

Na região de 3350 cm^{-1} pode observar-se, em ambos os espectros, uma banda larga, característica dos álcoois. No espectro das cápsulas com OE esta é mais intensa devido à sua composição documentada na Tabela 3. Na região dos 2900 cm^{-1} observam-se as bandas atribuídas à vibração de alongamento das ligações C-H. O pico a 1750 cm^{-1} , mais intenso no espectro das cápsulas sem OE, corresponde à ligação C=O. A banda observada a 1425 cm^{-1} corresponde a ligações H-C-H e O-C-H, os picos entre 1300 cm^{-1} e 800 cm^{-1} correspondem às vibrações de alongamento e flexão das ligações -CH₂, -CH, -OH e CO.

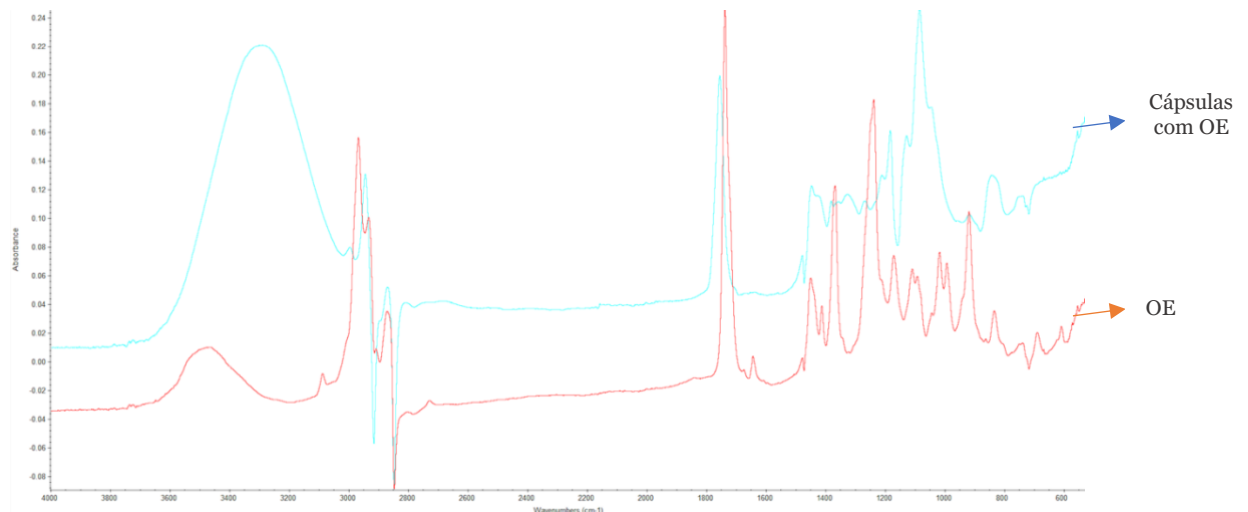


Figura 12-Espectro de FTIR do OE de lavandim + cápsulas com OE de lavandim.

Comparando o espectro de FTIR do OE analisado anteriormente com o das cápsulas com o OE encapsulado, têm picos semelhantes: a banda a 2900 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongamento das ligações C-H, a banda observada a 1700 cm^{-1} corresponde à ligação C=O do grupo carbonilo, a banda observada a cerca de 1400 cm^{-1} corresponde à vibração de alongamento das ligações C=C presente em ambos os compostos maioritários e as bandas entre 1300 cm^{-1} e 800 cm^{-1} correspondem às vibrações de alongamento e flexão das ligações -CH₂, -CH, -OH e CO. No entanto, no espectro das cápsulas pode observar-se a banda característica dos álcoois, coincidindo com o PVA.

Conclui-se, então, que os espectros das cápsulas apresentam picos característicos do agente ativo, do PLA e do PVA, Isto ocorreu, possivelmente, devido à interação entre o OE e o PLA [44]. As cápsulas que têm o OE encapsulado apresentam mais insaturações (o que coincide com a estrutura dos compostos maioritários do OE).

5.2.5 Avaliação das propriedades térmicas

Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

O perfil térmico das cápsulas de PLA, com e sem OE, foi analisado por DSC. A temperatura de transição vítrea (T_g , do inglês *glass transition temperature*) corresponde à temperatura em que

um material passa por uma alteração estrutural de um estado sólido amorfo (vítreo) para um estado mais viscoso [7]. A Tg do PLA ronda os 60°C [63], [65].

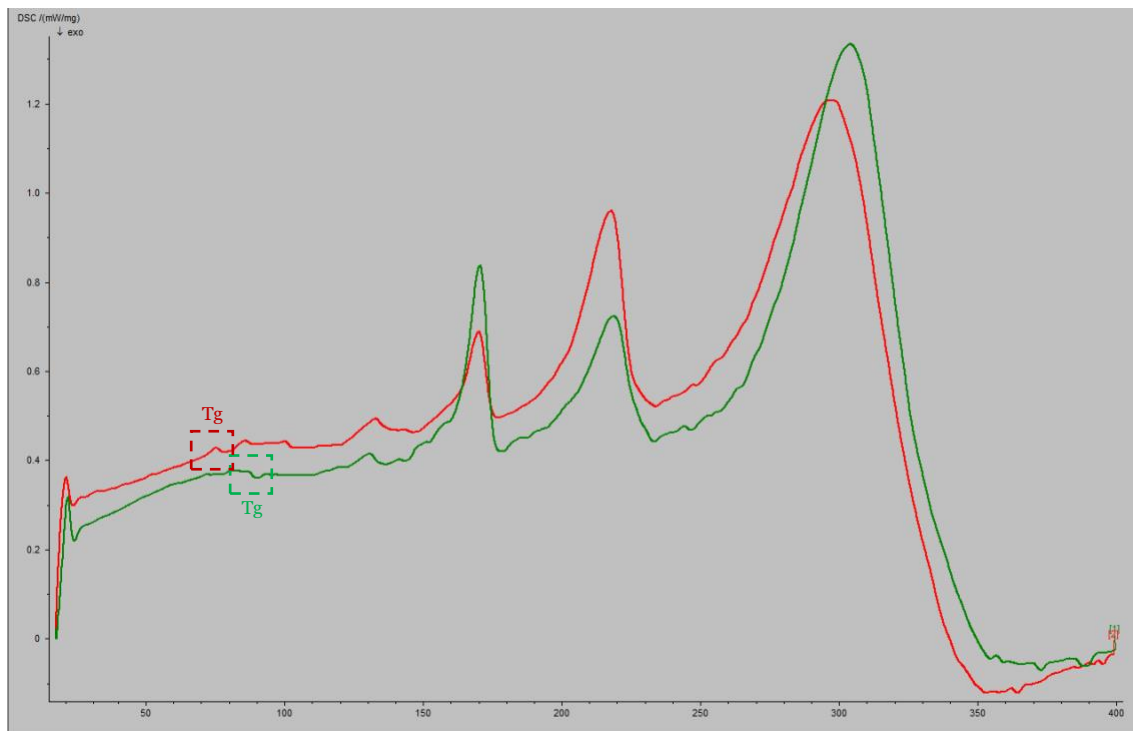


Figura 13-Termogramas de DSC das cápsulas com e sem OE de lavandim (a verde e vermelho, respetivamente).

Pela observação do termograma (Figura 13) conclui-se que a Tg das cápsulas sem OE (a vermelho) é de 74°C e das cápsulas com OE (a verde) é de 89°C. Estas diferenças comparativamente à Tg do PLA podem dever-se à presença de vestígios de PVA (cuja Tg é cerca de 73°C) [66].

A presença do OE influencia o comportamento térmico do material. Um estudo de Severo [67] revelou que a temperaturas superiores a 152°C os compostos presentes em cápsulas de lavanda se evaporam ou degradam. O ponto de ebulição dos compostos maioritários do OE de lavandim é cerca de 199°C para o linalool e de 221°C para o acetato de linalilo [61].

Conclui-se então que a incorporação do OE aumenta a Tg das cápsulas, estes resultados estão de acordo com Hazra *et al.* onde a Tg do linalool é de 160°C e a do acetato de linalilo é de 186°C [68].

5.3 Análise dos filmes

É possível observar a olho nu diferenças consideráveis nos filmes com e sem cápsulas (Figura 14). Os filmes de pululana são transparentes e os de pululana com OE também, tendo uma tonalidade mais amarelada. Os filmes pululana + cápsulas sem OE apresentam uma rugosidade na face superior, devido à presença das cápsulas e à sua difícil homogeneização. Por último, os de

pululana + cápsulas com OE apresentam uma rugosidade ainda maior pois as cápsulas contendo o OE também são maiores.

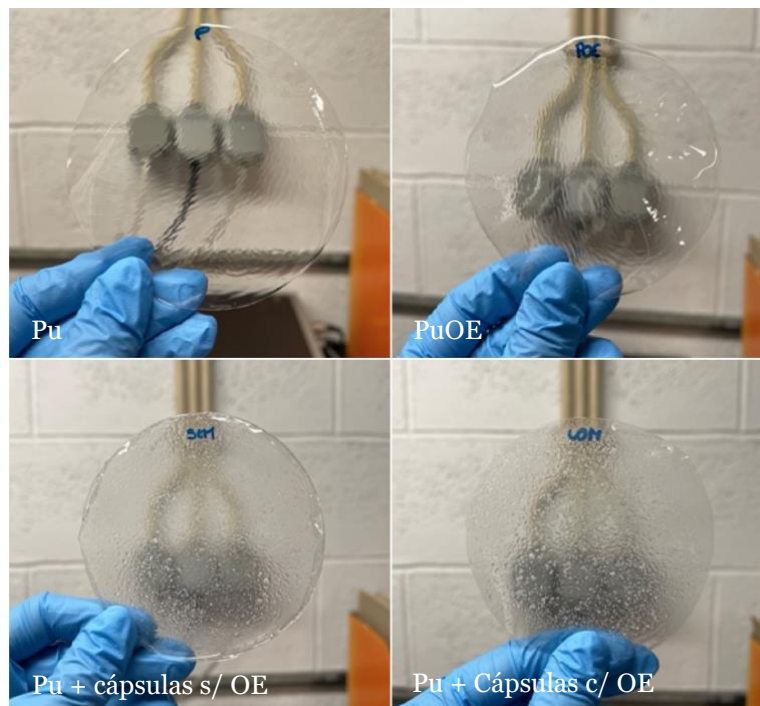


Figura 14-Aparência dos filmes produzidos.

5.3.1 Avaliação da atividade antioxidante

Os produtos alimentares são frequentemente deteriorados pela oxidação mediada por radicais livres de lípidos insaturados durante o seu armazenamento, levando a rancidez,, decréscimo nutricional e geração de compostos tóxicos [7]. Para isso, avaliou-se a atividade antioxidante dos filmes produzidos.

Ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos com o ensaio de sequestração de radicais livres DPPH.

Tabela 7- Resultados do teste de sequestração dos radicais livres de DPPH para os filmes de PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).

	% Inibição	<i>p-value</i>
PuOE^a	51,63 \pm 0,81	
Pu + cápsulas s/ OE	Não tem a. a.	0,711 ^{ab}
Pu + cápsulas c/ OE^b	50,74 \pm 2,57	

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^a^b indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Como o OE de lavandim apresentou uma alta atividade antioxidante e as cápsulas contendo o OE também apresentaram propriedades antioxidantes, embora mais baixas, estes resultados estão

concordantes com os obtidos anteriormente. Os filmes de PuOE e de pululana + cápsulas c/ OE apresentaram uma percentagem de inibição de cerca de 51 %, não se tendo verificado diferenças significativas entres estes ($p\text{-value} > 0,05$).

Teste de branqueamento do β -caroteno

Pelos resultados obtidos para o OE, este possui uma alta atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica [37] e pela Tabela 8 verifica-se que, para os filmes de PuOE, as propriedades antioxidantes melhoraram significativamente ($p\text{-value} < 0,05$) em relação aos de pululana. Embora as cápsulas não tivessem apresentado atividade antioxidante, observou-se que a sua incorporação nos filmes resulta numa melhoria significativa ($p\text{-value} < 0,05$) na capacidade de inibição da peroxidação lipídica nos dois tipos de filmes (pululana + cápsulas com e sem OE). Isto deve-se, possivelmente, ao facto de a pululana também ter propriedades antioxidantes [27].

Tabela 8- Resultados do teste de branqueamento do β -caroteno para os filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).

	Pu^a	PuOE^b	Pu + cápsulas s/ OE^c	Pu + cápsulas c/ OE^d	p-value
% Inibição	20,69 \pm 0,15	32,74 \pm 2,45	26,39 \pm 1,39	43,51 \pm 3,96	0,013* ^{ab} 0,018* ^{ac} 0,009* ^{ad}

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Pode concluir-se que os filmes de pululana + cápsulas com OE obtiveram uma maior percentagem de inibição do que os de PuOE, confirmando-se o potencial da aplicação dos filmes contendo o OE encapsulado como materiais inovadores para embalagens alimentares. Devido à sua capacidade de prevenir e/ou inibir a oxidação e peroxidação lipídica, estes filmes poderão contribuir para o aumento do tempo de prateleira dos produtos embalados.

5.3.2 Avaliação das propriedades antimicrobianas

Ensaio de difusão em disco

Na Tabela 9 estão representados os resultados obtidos para o ensaio de difusão em disco para todas os tipos de filmes produzidos. Nos resultados deste estudo, constatou-se que a inibição do crescimento bacteriano por contacto ocorreu somente nos filmes de pululana e nos filmes de pululana com OE, especificamente nas bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*). Ainda que as bactérias Gram-negativas apresentem, por natureza, uma maior resistência devido à sua membrana externa, registaram-se ainda inibições por contacto para os filmes de pululana com OE (*E. coli*) e de pululana + cápsulas com OE (*P. aeruginosa*). A possível presença do OE por

fora das cápsulas, ou a destruição de algumas delas durante o processo de produção dos filmes, pode explicar este resultado.

Tabela 9- Resultados do ensaio de difusão em disco para os filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).

		Pu ^a	PuOE ^b	Pu + cápsulas s/ OE ^c	Pu + cápsulas c/ OE ^d	<i>p-value</i>	
Diâmetro dos halos de inibição (mm)	Gram-positivas	<i>E. fecalis</i> ATCC 29212	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0,423 ^{ab} >0,05 ^{ac} >0,05 ^{ad} >0,05 ^{ab}
		<i>L. monocytogenes</i> LMG16779	6 ⁺ \pm 0	6 ⁺ \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0,183 ^{ac} 0,183 ^{ad}
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0 \pm 0	6 ⁺ \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	>0,05 ^{ab} >0,05 ^{ac} >0,05 ^{ad}
	Gram-negativas	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0,423 ^{ab} >0,05 ^{ac} >0,05 ^{ad}
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	6 ⁺ \pm 0	>0,05 ^{ab} >0,05 ^{ac} 0,423 ^{ad}
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	0 \pm 0	6 ⁺ \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	>0,05 ^{ab} >0,05 ^{ac} >0,05 ^{ad}

⁺ Inibição por contacto.

* indica diferenças com significado estatístico (*p-value*<0,05); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Todos os resultados dos testes de difusão em disco foram ainda confirmados através da observação das placas de Petri por microscopia ótica. As imagens correspondentes podem ser observadas na Figura 16. As áreas mais escuras, delineadas por traços lilás, correspondem às cápsulas e aos discos, enquanto as regiões mais claras indicam ausência de crescimento microbiano.

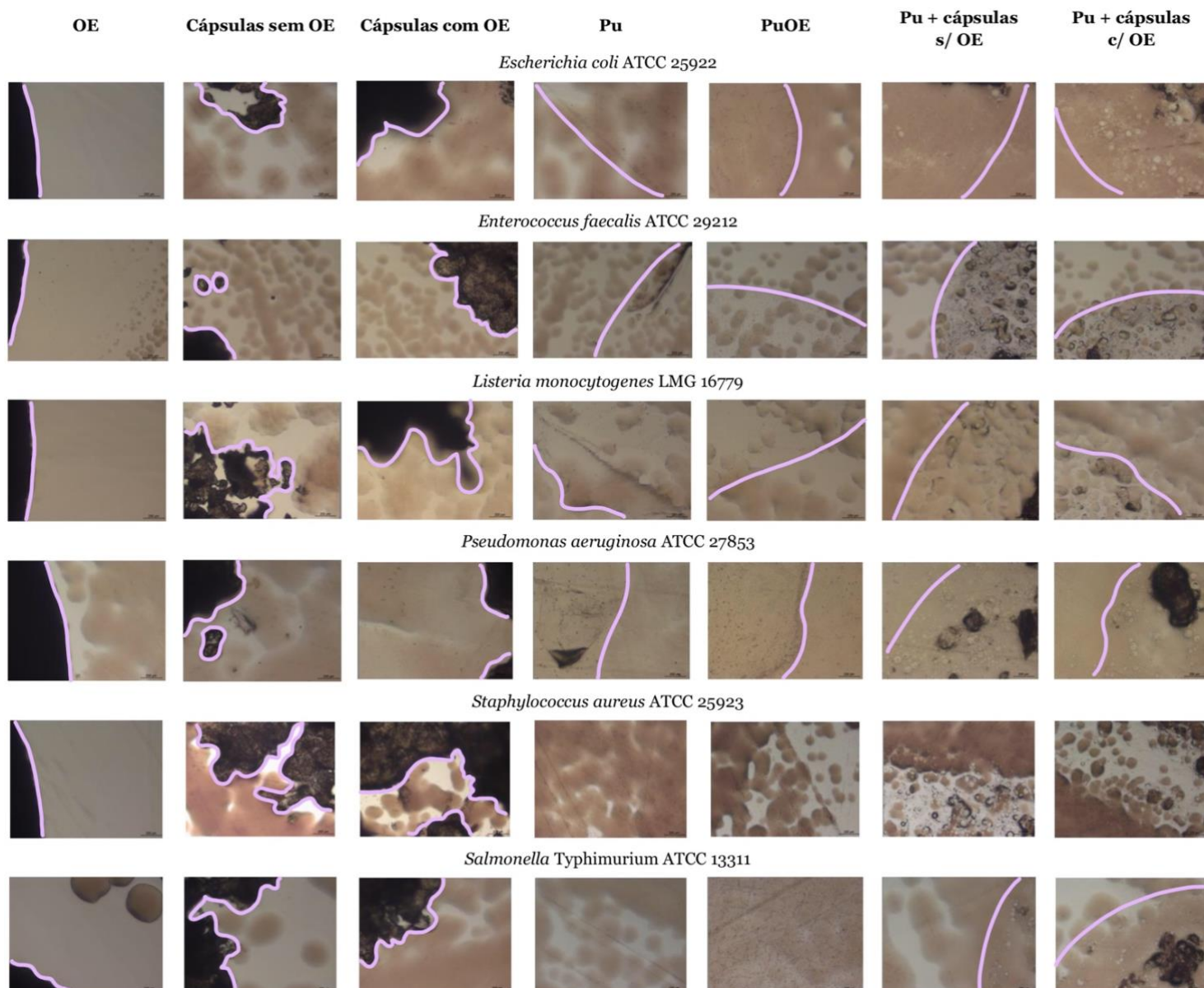


Figura 15-Imagens de microscopia ótica da atividade antimicrobiana (Ampliação: 100x).

5.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

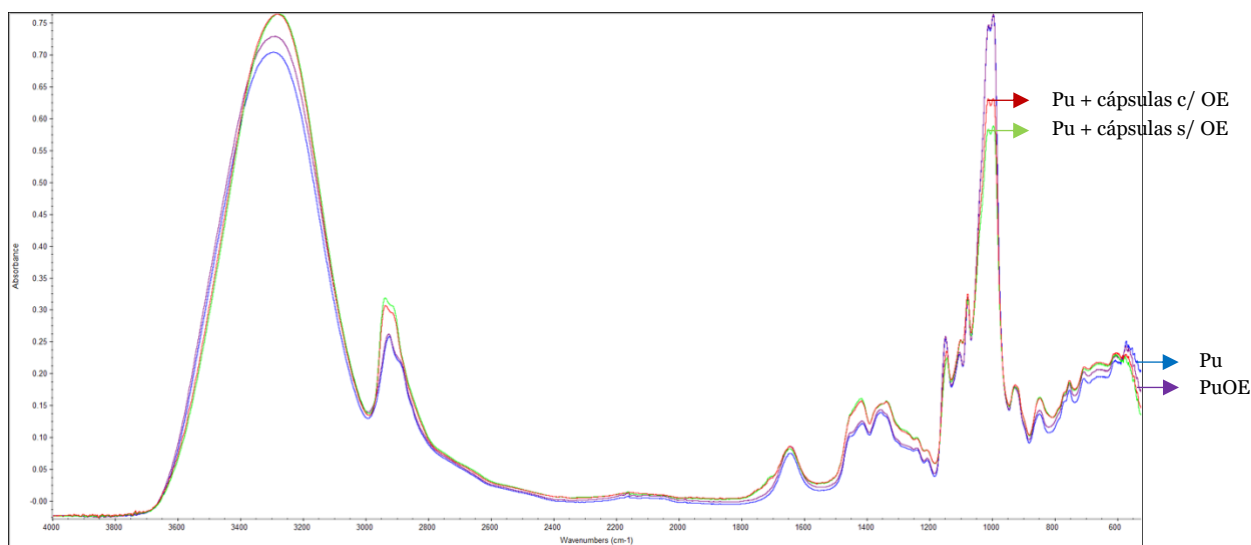


Figura 16-Espetros de FTIR dos filmes Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (a azul, roxo, verde e vermelho, respetivamente).

Os espectros de FTIR obtidos para os filmes são semelhantes e estão basicamente sobrepostos. Foram identificados picos a 3450 cm⁻¹ relacionados com o alongamento dos grupos hidroxilo da pululana, sendo este um pico característico dos polissacáridos. O alongamento das ligações C–H é observado a 2950 cm⁻¹, tendo sido ligeiramente mais intenso para os filmes de pululana com as cápsulas, assim como na banda anterior. Como foi analisado em cima, a banda que surge na região dos 1400 cm⁻¹ está relacionada com a presença das cápsulas nos filmes. Já os picos intensos observados a 1100 cm⁻¹ estão associados à vibração de alongamento dos grupos C–O, sendo, neste caso mais intensos para os filmes de pululana e de pululana com OE. As bandas de tensão do grupo alilo (C=C) refletem-se num pico que aparece a 1644 cm⁻¹, que se deve à presença do OE uma vez que é um dos picos característicos do linalool. O espectro de FTIR permitiu identificar a banda de deformação das ligações CH₃ a 1350 cm⁻¹, resultados que estão de acordo com os obtidos por Hernandez-Tenorio e Giraldo-Estrada [69].

No estudo realizado por Luís *et al.* [7], onde se produziram filmes de pululana com incorporação de um OE, os espectros FTIR obtidos mostraram-se idênticos aos analisados, tendo se observado também a sobreposição dos picos, das amostras com e sem OE.

5.3.4 Avaliação das propriedades térmicas

Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

Segundo a literatura, a pululana exibe uma T_g de 240°C [70] e a sua temperatura de fusão (T_m) é observada a cerca de 248°C [71]. Enquanto que, o glicerol puro é caracterizado por um único evento que representa sua pirólise, correspondendo a uma faixa de temperatura entre 290 e 330

°C. É importante notar que o ponto de ebulição do glicerol é obtido na temperatura de 290 °C, marcando o início do processo de evaporação, que é seguido pelo de degradação, ambos caracterizados como processos endotérmicos [28].

No termograma da Figura 17 dos filmes de pululana (a verde), foi detetado um pico entre 200 e 220°C, possivelmente relacionado com a sua Tg, bem como um pico a 277°C, que corresponde à Tm. Enquanto que, os termogramas dos filmes de pululana com cápsulas, com e sem OE (a vermelho e a azul, respetivamente) são similares, sendo detetado um pico entre 170°C e 200°C, podendo este representar a Tg destes filmes, bem como um pico entre 290°C a 300°C, representando a Tm destes filmes. Tendo em conta o efeito plastificante do OE, assim como o plastificante utilizado na produção dos filmes, o glicerol, a Tg dos filmes resultantes é inferior à observada nos seus componentes individuais [10].

Comparando os termogramas dos filmes com cápsulas, pode observar-se que os que têm cápsulas sem OE apresentam picos mais energéticos comparativamente aos com o OE encapsulado, revelando uma maior estabilidade e um comportamento térmico semelhante ao das cápsulas analisado anteriormente.

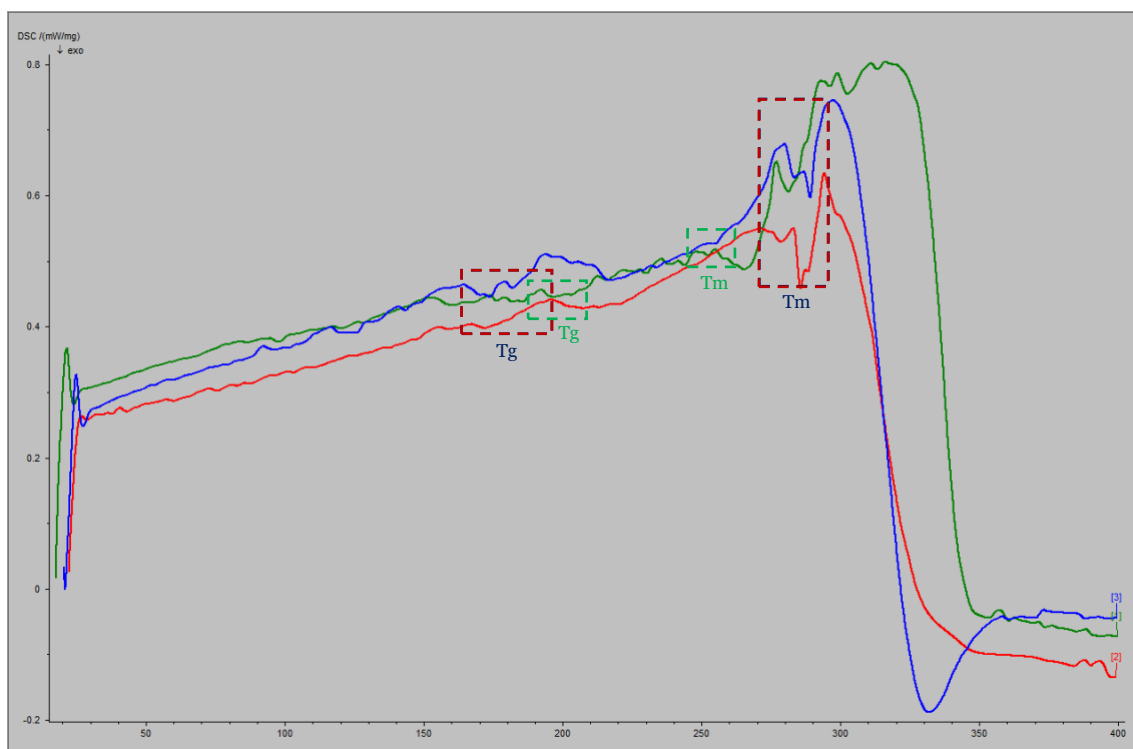


Figura 17-Termogramas de DSC dos filmes de de Pu, Pu+cápsulas c/OE e Pu+cápsulas s/OE (verde, vermelho e azul, respetivamente).

5.3.5 Avaliação das propriedades estruturais

Gramagem, espessura e densidade aparente

A gramagem e a espessura dos materiais estão intrinsecamente ligadas às propriedades funcionais, abrangendo tanto as propriedades mecânicas quanto as de barreira. Regra geral, baixas espessuras correspondem propriedades mecânicas e de barreira mais limitadas, contudo, grandes espessuras podem prejudicar a flexibilidade do material [72]. A densidade aparente de uma substância é determinada no ar, sem referenciar as flutuações do mesmo e a densidade real é medida no vácuo [73].

De acordo com a Tabela 10 incorporação do OE não afetou significativamente as propriedades estruturais dos filmes (p -value > 0,05). Relativamente aos filmes de pululana com cápsulas, estas não afetaram significativamente a gramagem dos filmes, no entanto, houve um aumento de espessura e uma diminuição significativa (p -value < 0,05) da densidade aparente destes materiais, consequências da maior rugosidade dos filmes, causada pela difícil homogeneização e distribuição na placa de Petri [72].

Tabela 10-Propriedades estruturais dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).

	Pu^a	PuOE^b	Pu + cápsulas s/ OE^c	Pu + Cápsulas c/ OE^d	<i>p</i>-value
Gramagem (g/m²)	96,84 \pm 2,81	84,20 \pm 2,83	96,82 \pm 2,95	98,05 \pm 5,88	<0,001* ab
					0,991 ac
					0,688 ad
Espessura (μm)	60,84 \pm 9,01	55,86 \pm 9,01	225,87 \pm 40,15	232,56 \pm 41,43	0,056 ab
					<0,001* ac
					<0,001* ad
Densidade aparente (g/cm³)	1,42 \pm 0,312	1,51 \pm 0,312	0,43 \pm 0,073	0,42 \pm 0,142	0,739 ab
					0,027* ac
					0,017* ad

* indica diferenças com significado estatístico (p -value<0,05); a b c d indicam os pares de amostras em comparação estatística.

5.3.6 Avaliação das propriedades mecânicas

Um dos principais propósitos da embalagem alimentar reside em salvaguardar o produto contra influências mecânicas externas, incluindo impactos e forças de compressão, então, é de extrema importância que o material produzido tenha boas propriedades mecânicas [10].

Tabela 11-Propriedades mecânicas dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).

	Pu^a	PuOE^b	Pu + cápsulas s/ OE^c	Pu + Cápsulas c/ OE^d	p-value
Resistência à tração (10⁶) (N/m²)	31,72 \pm 19,00	30,24 \pm 8,98	8,46 \pm 5,00	9,12 \pm 2,38	0,911 ^{ab} 0,161 ^{ac} 0,174 ^{ad} 0,006* ^{ab}
Alongamento (%)	1,00 \pm 0,05	1,24 \pm 0,08	1,12 \pm 0,10	1,13 \pm 0,05	0,173 ^{ac} 0,021* ^{ad}
Índice de tração (N.m/g)	19,93 \pm 1,77	19,25 \pm 0,07	19,70 \pm 2,07	21,65 \pm 0,97	0,924 ^{ab} 0,889 ^{ac} 0,229 ^{ad} 0,026* ^{ab}
Módulo de Young (MPa)	4046,39 \pm 238,32	3352,77 \pm 226,81	1048,09 \pm 58,85	1194,78 \pm 51,61	0,001* ^{ac} 0,002* ^{ad}

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Em relação à resistência e ao índice de tração, estes não apresentam diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} > 0,05$), no entanto, pode observar-se uma diminuição com a adição do OE, possivelmente, devido ao estabelecimento de interações polímero-OE que são mais fracas que as polímero-polímero, o que pode enfraquecer a estrutura da matriz dos filmes em termos de ligações intermoleculares, estes resultados estão documentados na Tabela 11 [28].

A incorporação do OE livre e encapsulado resulta num aumento significativo na percentagem de alongamento ($p\text{-value} < 0,05$) o que significa que o material possui maior ductilidade, ou seja, é capaz de sofrer uma maior deformação plástica antes de se romper. A adição de cápsulas sem OE não apresenta diferença com significado estatístico, embora também se verifique um aumento neste parâmetro.

Comparando o módulo de elasticidade de todos os filmes com os filmes controlo (Pu), observa-se uma diminuição significativa ($p\text{-value} < 0,05$) desta propriedade, que mede a resistência intrínseca do material e está igualmente associada com a sua rigidez, ou seja, a capacidade de retomar a sua forma original após a aplicação de uma força, sem causar deformação permanente. Esta diminuição resulta em filmes menos rígidos [10].

O tamanho das cápsulas também pode influenciar as propriedades mecânicas dos filme, uma vez que cápsulas maiores podem criar desigualdades na matriz do filme, afetando sua uniformidade e aumentando a possibilidade de fragilidade em áreas com maior concentração de cápsulas. Isso

pode resultar em filmes menos flexíveis e com menor resistência mecânica em comparação com filmes que contêm cápsulas de tamanho menor ou uniformemente distribuídas.

5.3.7 Ângulo de contacto e energia livre de superfície

Ângulos de contacto

Para avaliar a hidrofobicidade dos filmes produzidos, foram efetuadas 6 medições em cada face, inferior (FI) e superior (FS) dos mesmos. A medida do ângulo de contacto, em ambas as faces dos filmes, fornece uma informação mais completa sobre as suas propriedades de superfície, nomeadamente, a molhabilidade e a energia de superfície, principalmente quando o filme apresenta assimetria nas faces. Esta abordagem ajuda a identificar diferenças na energia de superfície ou rugosidade entre as faces do filme, sendo as variações nos valores do ângulo de contato indicativas de potenciais imperfeições ou irregularidades. Neste caso, os filmes de pululana com cápsulas, apresentaram diferente rugosidade entre faces.

Tabela 12-Ângulos de contacto dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).

		Ângulo de contacto (°)		
		Água	Diiodometano	Etilenoglicol
	Pu - FI^a	67,70 \pm 2,86	34,54 \pm 1,55	54,65 \pm 1,11
	Pu - FS^b	58,42 \pm 3,37	39,73 \pm 1,40	53,99 \pm 1,80
	PuOE - FI^c	97,95 \pm 3,16	34,36 \pm 2,02	55,89 \pm 2,38
	PuOE - FS^d	70,29 \pm 2,93	35,55 \pm 1,20	62,17 \pm 3,78
	Pu + cápsulas s/ OE - FI^e	70,90 \pm 2,64	29,17 \pm 1,52	54,77 \pm 1,22
	Pu + cápsulas s/ OE - FS^f	60,11 \pm 2,10	33,88 \pm 2,49	52,18 \pm 1,85
	Pu + cápsulas c/ OE - FI^g	51,82 \pm 1,46	34,78 \pm 1,88	55,82 \pm 1,13
	Pu + cápsulas c/ OE - FS^h	53,65 \pm 3,43	32,97 \pm 1,82	54,68 \pm 0,84
p-value	FI	<0,001* ac	0,393 ac	0,886 ac
		0,599 ae	0,874 ae	0,002* ae
	FS	<0,001* ag	0,110 ag	0,841 ag
		<0,001* bd	<0,001* bd	<0,001* bd
		0,237 bf	0,172 bf	0,011* bf
		0,024* bh	0,517 bh	<0,001* bh

* indica diferenças com significado estatístico (p -value<0,05); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Uma superfície é considerada hidrofóbica quando apresenta um ângulo de contacto com a água maior que 90°, indicando que a água tende a formar gotas na superfície. Em contrapartida, um ângulo de contacto com água inferior a 90° é característico de uma superfície hidrofílica. Publicações científicas mostraram que a incorporação de OEs na formulação dos filmes aumenta o ângulo de contacto com água das superfícies devido à sua hidrofobicidade [10].

A Tabela 12 apresenta os valores médios dos ângulos de contacto medidos nas duas faces dos filmes. O ângulo de contacto com água aumentou substancialmente para os filmes de PuOE comparativamente aos filmes de pululana, indicando que se está perante uma superfície hidrofóbica, no entanto apenas se verificou um ligeiro aumento para os filmes de Pu + cápsulas s/ OE em ambas as faces. A diferença obtida nos valores dos ângulos das duas faces deve-se à orientação preferencial dos diferentes constituintes na matriz do filme. No entanto, este resultado não se verifica para os filmes de Pu + cápsulas c/ OE. A divergência dos ângulos de contacto dos filmes com cápsulas pode resultar de diversos fatores, nomeadamente, a rugosidade e heterogeneidade da superfície, uma vez que os filmes são compostos por diversos materiais [52]. Segundo Wenzel, o ângulo de contacto é influenciado pela rugosidade, propondo a equação 13 para colmatar a influência deste parâmetro no valor do ângulo de contacto medido:

$$\cos\theta_w = R_w(\cos\theta) \quad (13)$$

Onde θ_w é o ângulo de contacto aparente, ou ângulo de Wenzel e R_w é o quociente entre a área da superfície real e a área geométrica. Como o fator R_w é sempre maior ou igual a 1, a rugosidade da superfície diminui o ângulo de contacto para $\theta < 90^\circ$, enquanto para superfícies hidrofóbicas ($\theta > 90^\circ$) o ângulo de contacto aumenta. Se uma superfície molecularmente hidrofóbica é áspera, a aparência é de uma superfície ainda mais hidrofóbica. Se uma superfície hidrofílica é rugosa, torna-se mais hidrofílica [52]. Estudos anteriores verificaram que a rugosidade das superfícies está relacionada com o aumento do ângulo de contacto com água, o chamado “efeito lótus” [50]. Isto verifica-se nos filmes das cápsulas sem OE e para os filmes com cápsulas com o OE encapsulado verifica-se um pequeno aumento na FS.

Nos filmes onde o ângulo de contacto é inferior a 90°, se se tiver em conta a rugosidade, o ângulo de contacto aparente vai diminuir, o que explica os valores mais baixos nos filmes contendo as cápsulas [52]. Nos filmes contendo o OE encapsulado este fenómeno torna-se ainda mais acentuado, principalmente na FS, devido à presença de cápsulas maiores (Figura 14), as quais aumentam consideravelmente a rugosidade.

Outro fator que pode ter contribuído para estes resultados é o facto do PLA, presente nas cápsulas, ser higroscópico [74]. Trabalhos publicados mostram que a absorção de água pode quebrar as cadeias do polímero de PLA, fazendo com que o ângulo de contacto com a água diminua de 77° para 24° [75].

Energias livre de superfície (ELS)

Utilizando os valores dos ângulos de contato medidos com os três líquidos de referência, foi determinada a energia de superfície dos filmes utilizando o método OWRK [10] e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13-Energias de superfície dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).

Amostras	ELS (mN/m)			ELS _D /ELS _P
	Total	Dispersiva	Polar	
Pu - FI^a	42,28 \pm 0,73	41,61 \pm 0,7	0,87 \pm 0,19	47,83 \pm 3,68
Pu - FS^b	42,13 \pm 0,83	38,84 \pm 0,69	3,29 \pm 0,47	11,81 \pm 1,47
PuOE - FI^c	42,63 \pm 0,93	42,45 \pm 0,92	0,18 \pm 0,16	235,83 \pm 5,75
PuOE - FS^d	44,05 \pm 0,86	41,57 \pm 0,56	2,48 \pm 0,66	16,76 \pm 0,85
Pu + cápsulas s/ OE - FI^e	44,64 \pm 0,63	44,10 \pm 0,61	0,54 \pm 0,15	81,67 \pm 4,07
Pu + cápsulas s/ OE - FS^f	43,62 \pm 0,12	40,26 \pm 1,07	3,36 \pm 0,53	11,98 \pm 2,02
Pu + cápsulas c/ OE - FI^g	41,63 \pm 0,89	38,98 \pm 0,81	2,65 \pm 0,35	14,71 \pm 2,31
Pu + cápsulas c/ OE - FS^h	42,57 \pm 0,82	41,81 \pm 0,8	0,76 \pm 0,17	55,01 \pm 4,71
	0,636 ^{ac}	0,281 ^{ac}	0,009* ^{ac}	
FI	0,014* ^{ae}	0,010* ^{ae}	0,081 ^{ae}	
	0,385 ^{ag}	0,004* ^{ag}	0,004* ^{ag}	
p-value	0,050 ^{bd}	0,007* ^{bd}	0,166 ^{bd}	
FS	0,086 ^{bf}	0,138 ^{bf}	0,873 ^{bf}	
	0,550 ^{bh}	0,007* ^{bh}	0,006* ^{bh}	

* indica diferenças com significado estatístico (p -value < 0,05); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Na face superior, registaram-se diferenças significativas (p -value < 0,05) nos filmes com OE, livre e encapsulado, em ambas as componentes, dispersiva e polar. Na face inferior, a incorporação das cápsulas afetou significativamente (p -value < 0,05) a energia de superfície total, bem como a componente dispersiva. Nos filmes de pululana com o OE, verificou-se uma diminuição nos valores da componente polar, devido à natureza hidrofóbica do OE, diminuindo a adesão dos líquidos à superfície.

Como os valores de ELS são semelhantes entre si, efetuou-se o rácio entre as componentes dispersiva e polar (ELS_D/ELS_P). Comparativamente à FS, o parâmetro ELS_D/ELS_P apresenta-se, para a FI, substancialmente mais alto, exceto para os filmes de pululana + cápsulas c/ OE. Dado que a FS tem valores menores, pressupõe-se que vá proporcionar maior interações entre fases (líquido-sólido), principalmente com líquidos polares como a água, e isso é corroborado pelos ângulos de contacto com água menores (Tabela 12). Assim, de uma maneira geral, estes materiais revelaram uma fraca hidrofobicidade, resultando numa elevada molhabilidade, à exceção da face inferior dos filmes de PuOE, uma vez que esta é a única hidrofóbica (ângulo de contato com a água

superior a 90°) [52]. Possivelmente, a interação do OE com o poliestireno das placas de Petri faz com que este migre para a face inferior [28].

5.3.8 Avaliação das propriedades de barreira

Permeabilidade ao vapor de água (WVP)

As propriedades de barreira estão relacionadas com a capacidade de estabelecer uma atmosfera protetora que assegure a preservação dos alimentos desde a sua manipulação até ao consumo final [72].

Tabela 14-Propriedades de barreira dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média \pm DP).

	Pu^a	PuOE^b	Pu + cápsulas s/ OE^c	Pu + Cápsulas c/ OE^d	p-value
WVTR (g/m².dia)	46,50 \pm 0,56	44,23 \pm 1,84	24,05 \pm 4,79	24,26 \pm 1,67	0,312 ^{ab}
					0,091 ^{ac}
					0,020* ^{ad}
WVP (g/Pa.dia.m)	2,14E-06 \pm 2,59E-08	1,87E-06 \pm 7,76E-08	4,11E-06 \pm 8,18E-07	4,27E-06 \pm 2,94E-07	0,100 ^{ab}
					0,181 ^{ac}
					0,060 ^{ad}

* indica diferenças com significado estatístico (p -value < 0,05); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Em relação à WVTR, com a incorporação do OE não se registaram diferenças significativas, no entanto, observou-se uma diminuição no valor, possivelmente devido ao carácter hidrofóbico do OE que pode levar a uma diminuição da passagem de vapor de água. Já com a adição do OE encapsulado a WVTR diminuiu significativamente (p -value < 0,05), uma vez que estas cápsulas também têm algum carácter hidrofóbico. Como a WVTR mede a capacidade dos filmes resistirem à transmissão da humidade, quanto menor este valor, maior a resistência ao vapor de água [7], [10], [76].

Em relação à WVP, não se registaram diferenças significativas (p -value > 0,05). No entanto, a adição do OE, resultou na diminuição da permeabilidade ao vapor de água dos filmes. Quanto menor este valor, menos permeável é o material, resultando em boas propriedades contra a humidade. A incorporação das cápsulas aumenta a permeabilidade ao vapor de água, pois o fator da espessura, conforme mencionado anteriormente, aumenta o nível de permeabilidade deste material, como demonstrado por Luís *et al.* [72].

Cápsulas maiores podem originar lacunas maiores na matriz do filme, o que pode afetar a barreira de humidade. Isto pode influenciar a taxa de transferência de humidade para dentro e para fora da embalagem, afetando a qualidade e o tempo de conservação dos alimentos embalados.

5.3.9 Avaliação das propriedades óticas

As propriedades óticas de uma embalagem alimentar desempenham um papel na formulação de um material com esse propósito, dado que a embalagem é o elemento inicialmente percebido pelo consumidor, permitindo, preferencialmente visualizar o alimento.

Cor

Em relação à cor dos filmes, observou-se que quando o OE foi incorporado, houve um aumento nas coordenadas de cor L* e b*, que é consistente com sua tonalidade mais amarelada (coordenada b*) do OE [10]. Adicionalmente, a espessura influencia significativamente estas propriedades. A luminosidade (coordenada L*) dos filmes aumentou significativamente (*p-value* < 0,05) com incorporação do OE. Como este é o filme menos espesso, é o que apresenta uma maior luminosidade.

As coordenadas de cor a* e b* foram significativamente afetadas (*p-value* < 0,05) pela adição das cápsulas sem OE aos filmes (Tabela 15) verificando-se uma diminuição geral nas coordenadas da cor, o que resulta numa aparência mais escura. Já os filmes de pululana com as cápsulas c/ OE, apresentaram uma menor luminosidade, consequência destes serem os filmes mais espessos.

Tabela 15-Cor dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média ± DP).

	Pu^a	PuOE^b	Pu + cápsulas s/ OE^c	Pu + Cápsulas c/ OE^d	<i>p-value</i>
L*	93,13 ± 0,149	94,04 ± 0,4	92,55 ± 0,519	92,68 ± 0,436	0,045* ^{ab} 0,186 ^{ac} 0,209 ^{ad}
a*	1,92 ± 0,019	1,75 ± 0,026	1,55 ± 0,11	1,62 ± 0,07	0,001* ^{ab} 0,025* ^{ac} 0,013* ^{ad}
b*	-8,03 ± 0,048	-7,47 ± 0,113	-5,01 ± 1,104	-5,47 ± 0,773	0,006* ^{ab} 0,043* ^{ac} 0,029* ^{ad}

* indica diferenças com significado estatístico (*p-value*<0,05); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Transparência

A transparência de uma embalagem é importante porque permite que o consumidor veja o produto antes de o comprar, facilita a visualização de informações relevantes e proporciona confiança aos consumidores.

Tabela 16-Transparência dos filmes de Pu, PuOE, Pu+cápsulas s/OE e Pu+cápsulas c/OE (média ± DP).

Transparência (%)				
Pu^a	PuOE^b	Pu + cápsulas s/ OE^c	Pu + cápsulas c/ OE^d	<i>p-value</i>
				0,005* ^{ab}
96,05 ± 0,241	94,5 ± 0,352	90,74 ± 1,386	91,04 ± 1,437	0,019* ^{ac}
				0,024* ^{ad}

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Como esperado, os filmes de pululana são os mais transparentes (Figura 14), o que coincide com a literatura existente [72]. A transparência não variou muito dos filmes com cápsulas sem OE para os com o OE encapsulado, mas, em relação aos do OE sem estar encapsulado diminuiu significativamente ($p\text{-value} < 0,05$), isto deve-se, mais uma vez, à difícil homogeneização e distribuição dos filmes com as cápsulas nas placas de Petri. Como quanto maior a espessura, maior a opacidade dos filmes, os filmes que contém as cápsulas são os que apresentam uma menor transparência. Este resultado pode ser benéfico, dependendo do alimento a ser embalado.

Capítulo 6 - Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

Este trabalho teve como principal objetivo encapsulação do OE de lavandim e sua incorporação em filmes de pululana para aplicação na indústria alimentar e assim contribuir para a substituição as tradicionais embalagens de polímeros sintéticos, as quais têm um impacto negativo no meio ambiente.

De maneira a conferir propriedades bioativas aos filmes, foi selecionado o OE de lavandim para ser encapsulado e incorporado nestes. A composição química do OE de lavandim revelou que é composto maioritariamente por monoterpenos, que são compostos aromáticos. Após a análise à composição química do OE, foram também estudadas as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. O ensaio de sequestração dos radicais livres de DPPH revelou uma atividade antioxidante muito forte, $IC_{50} = 1,84 \pm 0,24\%$, v/v e $AAI = 2,68 \pm 0,41$, e o teste de branqueamento do β -caroteno, com o propósito de analisar a capacidade do OE em impedir a peroxidação lipídica, resultou num valor de $IC_{50} = 44,85 \pm 2,55$ (% v/v). Já na atividade antimicrobiana, no ensaio de difusão em disco, o OE apresentou halos de inibição para todos os microrganismos testados, e no ensaio de microdiluição, utilizando como indicador de crescimento a resazurina, obtiveram-se valores de CMI elevados, apesar de o OE ter inibido todos os microrganismos testados.

Para se atingir o principal objetivo deste trabalho, encapsulou-se o OE de lavandim pelo método da emulsão e da evaporação do solvente. Foram produzidas cápsulas com e sem OE. O ensaio de SEM permitiu visualizar a estrutura das cápsulas e a incorporação do OE foi confirmada através de FTIR e DSC, tanto para as cápsulas, como para os filmes. Através do *software ImageJ*, determinou-se o tamanho médio das cápsulas. Para as amostras sem OE, obtiveram-se cápsulas com $0,585 \pm 0,067$ μm , enquanto para as amostras com OE, obtiveram-se cápsulas maiores com $1,242 \pm 0,138$ μm . As cápsulas não apresentaram propriedades antioxidantes e revelaram uma fraca atividade antimicrobiana.

Foram então produzidos quatro tipos de filmes biodegradáveis: filmes de pululana, de pululana com OE de lavandim e de pululana + cápsulas, com e sem OE. Os filmes de pululana + cápsulas apresentaram elevadas rugosidades devido às dimensões das cápsulas.

Ao analisar as propriedades bioativas dos filmes, estes revelaram-se potenciais materiais para embalagens alimentares inibindo a oxidação e peroxidação lipídica. Os filmes de PuOE e de pululana + cápsulas c/ OE apresentaram ainda uma percentagem de inibição de cerca de 51 % no ensaio de sequestração de radicais livres DPPH. Já no ensaio de difusão em disco, constatou-se que a inibição do crescimento bacteriano por contato ocorreu somente nos filmes de pululana e nos filmes de pululana com OE, especificamente nas bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*). Ainda que as bactérias Gram-negativas apresentem uma maior resistência devido à

sua membrana externa, registaram-se ainda inibições por contacto para os filmes de pululana com OE (*E. coli*) e de pululana + cápsulas com OE (*P. aeruginosa*).

Quanto às propriedades estruturais, os filmes de pululana com cápsulas, principalmente os que contêm o OE encapsulado, apresentaram uma maior gramagem e espessura, consequência da maior rugosidade dos filmes, causada pela difícil homogeneização e distribuição na placa de Petri. Após a análise das propriedades mecânicas concluiu-se que a incorporação do OE, livre e encapsulado, resulta em materiais mais dúcteis e menos rígidos.

Em relação às propriedades de superfície, a incorporação das cápsulas aumentou consideravelmente a rugosidade dos filmes, diminuindo o ângulo de contacto com a água e a hidrofobicidade dos filmes. Quanto aos resultados obtidos para a energia de superfície dos filmes, na face inferior, a componente dispersiva aumentou para todos os filmes, à exceção dos filmes de pululana com as cápsulas contendo o OE encapsulado e para a componente polar, aconteceu o inverso. Na face superior, a componente dispersiva aumentou e a componente polar diminuiu para todos os filmes. Já nos filmes de pululana com o OE, verificou-se uma diminuição nos valores da componente polar, devido à natureza hidrofóbica do OE.

Quanto às propriedades de barreira, a adição de cápsulas aos filmes de pululana resultou num aumento da permeabilidade ao vapor de água, uma vez que a resistência dos filmes ao vapor de água diminuiu com o aumento da espessura.

Em relação às propriedades óticas, a cor amarela (coordenada b^*) aumentou devido à ligeira coloração amarelada do OE e, no caso dos filmes de pululana com cápsulas, verificou-se que houve uma diminuição geral nas coordenadas da cor, uma vez que estes ficaram mais opacos. Relativamente a estes últimos, a transparência diminuiu, mais uma vez, devido à difícil homogeneização e distribuição das cápsulas nos filmes nas placas de Petri.

Com base nos resultados promissores deste estudo, é possível prever várias perspectivas de trabalho futuro para o desenvolvimento de embalagens alimentares mais sustentáveis e seguras, tais como, estudar a eficácia dos filmes em diferentes condições de armazenamento, explorar outras substâncias naturais como agentes antimicrobianos, investigar outras técnicas de encapsulamento para melhorar a estabilidade e a eficácia dos compostos bioativos em embalagens alimentares, desenvolver embalagens bioativas para aplicações específicas (por exemplo, embalagens para produtos frescos, carnes ou laticínios podem ter requisitos diferentes) e, ainda, considerar os aspetos económicos e de segurança alimentar na produção em larga escala dessas embalagens.

Em suma, a incorporação de OEs encapsulados em filmes poliméricos pode ser uma alternativa viável para o desenvolvimento de embalagens alimentares mais sustentáveis e seguras. No entanto, é importante realizar mais estudos para avaliar a eficácia desses filmes bioativos em diferentes condições de armazenamento e em contacto com diferentes tipos de alimentos, bem

como considerar os aspetos económicos e de segurança alimentar na produção em larga escala dessas embalagens bioativas.

Referências bibliográficas

- [1] V. M. P. Lopes, «Produção e caracterização de filmes bioativos à base de nanocelulose por incorporação de óleo essencial de cravinho-da-Índia e eugenol», dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2018. Acedido: 6 de março de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/6994>
- [2] A. Trajkovska Petkoska, D. Daniloski, N. M. D’Cunha, N. Naumovski, e A. T. Broach, «Edible packaging: Sustainable solutions and novel trends in food packaging», *Food Res. Int.*, vol. 140, p. 109981, fev. 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109981.
- [3] Regulamento (CE) n.º 450/2009 da Comissão, de 29 de Maio de 2009, relativo aos materiais e objectos activos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos.
- [4] B. A. Araújo, L. S. de Freitas, K. K. F. Sarmiento, V. R. Bezerra, C. A. P. de Lima, e K. M. de Medeiros, «A aplicação de polímeros biodegradáveis como uma alternativa sustentável», *Res. Soc. Dev.*, vol. 10, n.º 9, Art. n.º 9, jul. 2021, doi: 10.33448/rsd-v10i9.18248.
- [5] M. G. P. Leão e N. A. Vitale, «Estudo de substituição alternativa de polímeros petroquímicos», dez. 2021, Acedido: 12 de junho de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://dspace.mackenzie.br/handle/10899/29078>
- [6] «Tecnologías para el desarrollo de biopolímeros, como una alternativa en la sustitución del plástico (PET) | Alimentos Ciencia e Ingeniería», out. 2022, Acedido: 12 de junho de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/aci/article/view/1034>
- [7] Â. Luís, A. Ramos, e F. Domingues, «Pullulan Films Containing Rockrose Essential Oil for Potential Food Packaging Applications», *Antibiotics*, vol. 9, n.º 10, Art. n.º 10, out. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9100681.
- [8] L. Gomes, «Potencial Antimicrobiano e Antiaderente do Óleo Essencial de Lavandula Hybrida Grosso contra Cepas de Staphylococcus aureus (Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia)», Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2021.
- [9] M. Carpena, B. Nuñez-Estevez, A. Soria-Lopez, P. Garcia-Oliveira, e M. A. Prieto, «Essential Oils and Their Application on Active Packaging Systems: A

Review», *Resources*, vol. 10, n.º 1, Art. n.º 1, jan. 2021, doi: 10.3390/resources10010007.

[10] M. Bilohan, «Desenvolvimento de trilaminados de pululana/celulose/zeína para embalagem alimentar», dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2021. Acedido: 6 de março de 2023. [Em linha]. Disponível em:

<https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/11268>

[11] A. L. L. Fortuna, «Impactos ambientais dos plásticos: biopolímeros como alternativa para a redução do acúmulo de embalagens flexíveis de polipropileno no meio ambiente», fev. 2020, Acedido: 12 de junho de 2023. [Em linha].

Disponível em: <http://pantheon.ufrj.br/handle/11422/12581>

[12] «European Green Deal: Putting an end to wasteful packaging», European Commission - European Commission. Acedido: 22 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em:

https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip_22_7155

[13] L. da C. C. Queirós, «Utilização de Xilanas no Fabrico de Filmes/Revestimentos Para o Setor Alimentar», dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2015. Acedido: 6 de março de 2023. [Em linha]. Disponível em:

<https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/6102>

[14] Â. M. L. da Silva, «Desenvolvimento de filmes antimicrobianos para aplicação na indústria alimentar», dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2015. Acedido: 6 de março de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/5999>

[15] L. E. Hill, C. Gomes, e T. M. Taylor, «Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications», *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 51, n.º 1, pp. 86–93, abr. 2013, doi: 10.1016/j.lwt.2012.11.011.

[16] S. Varona *et al.*, «Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria», *Ind. Crops Prod.*, vol. 42, pp. 243–250, mar. 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.05.020.

[17] J. H. Khitam, J. A. A. S. Shahlah, R. A. Kaskoos, J. Ahamad, M. Jameel, e S. R. Mir, «ESSENTIAL OIL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

- OF LAVANDULA ANGUSTIFOLIA FROM IRAQ», *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 4, n.º 4, pp. 117–120, nov. 2016, doi: 10.7897/2230-8407.04421.
- [18] C. H. Barbosa, M. A. Andrade, F. Vilarinho, A. L. Fernando, e A. S. Silva, «Active Edible Packaging», *Encyclopedia*, vol. 1, n.º 2, Art. n.º 2, jun. 2021, doi: 10.3390/encyclopedia1020030.
- [19] A. Dirpan, A. F. Ainani, e M. Djalal, «A bibliometrics visualization analysis of active packaging system for food packaging», *Heliyon*, vol. 9, n.º 8, p. e18457, ago. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18457.
- [20] S. Pirsá, «Nanocomposite base on carboxymethylcellulose hydrogel: Simultaneous absorbent of ethylene and humidity to increase the shelf life of banana fruit», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 193, pp. 300–310, dez. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.075.
- [21] M. T. Awulachew, «A Review of Food Packaging Materials and Active Packaging System», *Int. J. Health Policy Plan.*, vol. 1, n.º 1, jun. 2022, doi: 10.33140/IJHPP.01.01.03.
- [22] S. Pandey, K. Sharma, e V. Gundabala, «Antimicrobial bio-inspired active packaging materials for shelf life and safety development: A review», *Food Biosci.*, vol. 48, p. 101730, ago. 2022, doi: 10.1016/j.fbio.2022.101730.
- [23] A. Istiqomah, W. E. Prasetyo, M. Firdaus, e T. Kusumaningsih, «Valorisation of lemongrass essential oils onto chitosan-starch film for sustainable active packaging: Greatly enhanced antibacterial and antioxidant activity», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 210, pp. 669–681, jun. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.223.
- [24] T. Song, *et al.*, «Recent Advances in Bio-Based Smart Active Packaging Materials», *Foods*, vol. 11, n.º 15, p. 2228, jul. 2022, doi: 10.3390/foods11152228.
- [25] H. Almasi, S. Azizi, e S. Amjadi, «Development and characterization of pectin films activated by nanoemulsion and Pickering emulsion stabilized marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil», *Food Hydrocoll.*, vol. 99, p. 105338, fev. 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105338.
- [26] J.-W. Rhim, H.-M. Park, e C.-S. Ha, «Bio-nanocomposites for food packaging applications», *Prog. Polym. Sci.*, vol. 38, n.º 10–11, pp. 1629–1652, out. 2013, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008.
- [27] S. Farris, I. U. Unalan, L. Introzzi, J. M. Fuentes-Alventosa, e C. A.

- Cozzolino, «Pullulan-based films and coatings for food packaging: Present applications, emerging opportunities, and future challenges», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, n.º 13, 2014, doi: 10.1002/app.40539.
- [28] M. Â. L. Pinto, «Desenvolvimento de laminados de celulose/zeína para embalagem alimentar», dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2020. Acedido: 6 de março de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/10542>
- [29] Y. Chu *et al.*, «Fabrication, structure and properties of pullulan-based active films incorporated with ultrasound-assisted cinnamon essential oil nanoemulsions», *Food Packag. Shelf Life*, vol. 25, p. 100547, set. 2020, doi: 10.1016/j.fpsl.2020.100547.
- [30] R. S. Singh, G. K. Saini, e J. F. Kennedy, «Pullulan: Microbial sources, production and applications», *Carbohydr. Polym.*, vol. 73, n.º 4, pp. 515–531, set. 2008, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.01.003.
- [31] M. Gniewosz e A. Synowiec, «Antibacterial activity of pullulan films containing thymol: Antibacterial activity of pullulan films with thymol», *Flavour Fragr. J.*, vol. 26, n.º 6, pp. 389–395, nov. 2011, doi: 10.1002/ffj.2063.
- [32] V. Trinetta, C. N. Cutter, e J. D. Floros, «Effects of ingredient composition on optical and mechanical properties of pullulan film for food-packaging applications», *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, n.º 10, pp. 2296–2301, dez. 2011, doi: 10.1016/j.lwt.2011.07.015.
- [33] S. Wu e J. Chen, «Using pullulan-based edible coatings to extend shelf-life of fresh-cut ‘Fuji’ apples», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 55, pp. 254–257, abr. 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.01.012.
- [34] Y. Zhu, C. Li, H. Cui e L. Lin, «Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system», *Food Control*, vol. 123, mai. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107856>.
- [35] C. Slimani, *et al.*, «Chemical composition and evaluation of biological effects of essential oil and aqueous extract of *Lavandula angustifolia* L.», *Not. Sci. Biol.*, vol. 14, n.º 1, 2022, doi: <https://doi.org/10.15835/nsb14111172>.
- [36] S. Garzoli, *et al.*, «*Lavandula x intermedia* essential oil and hydrolate: Evaluation of chemical composition and antibacterial activity before and after formulation in nanoemulsion», *Ind. Crops Prod.*, vol. 145, mar. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112068>.

- [37] R. Wells, F. Truong, A. M. Adal, L. S. Sarker e S. Mahmoud, «Lavandula Essential Oils: A Current Review of Applications in Medicinal, Food, and Cosmetic Industries of Lavender», *Nat. Prod. Commun.*, vol. 13, n.º 10, pp. 1403–1417, out. 2018, doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X1801301038>.
- [38] C. Slimani *et al.*, «Chemical composition and evaluation of biological effects of essential oil and aqueous extract of *Lavandula angustifolia* L.», *Not. Sci. Biol.*, vol. 14, n.º 1, p. 11172, mar. 2022, doi: [10.15835/nsb14111172](https://doi.org/10.15835/nsb14111172).
- [39] L. Hui, L. He, L. Huan, L. XiaoLan e Z. AiGuo, «Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis-related bacteria», *Afr. J. Microbiol. Res.*, vol. 4, n.º 4, pp. 309–313, fev. 2010.
- [40] C. Yuan, Y. Wang, Y. Liu e B. Cui, «Physicochemical characterization and antibacterial activity assessment of lavender essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin», *Ind. Crops Prod.*, vol. 130, pp. 104–110, abr. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.067>.
- [41] Herdade de Vale Côvo, «Óleo Essencial Lavandim». Acedido: 8 de março. [Em linha]. Disponível em: <https://www.herdade-valecovo.com/pt/produto/oleo-essencial-lavandim/>
- [42] A. Rehman, *et al.*, «Development of active food packaging via incorporation of biopolymeric nanocarriers containing essential oils», *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 101, pp. 106–121, jul. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.001>.
- [43] V. C. Badgajar, A. J. Shinde, J.Y. Nehete e R. S. Bhambar, «Strategies to Improve Stability of Essential Oils», *J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 13, n.º 7, pp. 416–425, jul. 2021.
- [44] P. A. L. Campini *et al.*, «Assessing the efficiency of essential oil and active compounds/poly (lactic acid) microcapsules against common foodborne pathogens», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 186, pp. 702–713, jul. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.071>.
- [45] V. M. A. Gomes, «Encapsulação de ciprofloxacina em nanopartículas de poli(ácido láctico)», dissertação de mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2009. Acedido: 14 de abril de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://ria.ua.pt/handle/10773/3094>
- [46] G. Antonioli, «Desenvolvimento de nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo óleo essencial de capim-limão e avaliação contra fungos

fitopatogênicos», Instituto de Biotecnologia - Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, 2019.

[47] R. Scherer e H. T. Godoy, «Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method», *Food Chem.*, vol. 112, n.º 3, pp. 654–658, fev. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.026.

[48] Â. Luís, L. Pereira, F. Domingues, e A. Ramos, «Development of a carboxymethyl xylan film containing licorice essential oil with antioxidant properties to inhibit the growth of foodborne pathogens», *LWT*, vol. 111, pp. 218–225, ago. 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.05.040.

[49] Â. Luís, D. Neiva, H. Pereira, J. Gominho, F. Domingues, e A. Duarte, «Stumps of *Eucalyptus globulus* as a Source of Antioxidant and Antimicrobial Polyphenols», *Molecules*, vol. 19, n.º 10, pp. 16428–16446, out. 2014, doi: 10.3390/molecules191016428.

[50] Luís, Domingues, e Ramos, «Production of Hydrophobic Zein-Based Films Bioinspired by The Lotus Leaf Surface: Characterization and Bioactive Properties», *Microorganisms*, vol. 7, n.º 8, p. 267, ago. 2019, doi: 10.3390/microorganisms7080267.

[51] L. C. C. Queirós, S. C. L. Sousa, A. F. S. Duarte, F. C. Domingues, e A. M. M. Ramos, «Development of carboxymethyl xylan films with functional properties», *J. Food Sci. Technol.*, vol. 54, n.º 1, pp. 9–17, jan. 2017, doi: 10.1007/s13197-016-2389-3.

[52] H. Butt, K. Graf, e M. Kappl, *Physics and Chemistry of Interfaces*, 1.^a ed. Wiley, 2003. doi: 10.1002/3527602313.

[53] C. M. Noronha, S. M. de Carvalho, R. C. Lino, e P. L. M. Barreto, «Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules», *Food Chem.*, vol. 159, pp. 529–535, set. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.159.

[54] A. Carrasco, R. Martinez-Gutierrez, V. Tomas, e J. Tudela, «Lavandin (*Lavandula × intermedia* Emeric ex Loiseleur) essential oil from Spain: determination of aromatic profile by gas chromatography–mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities», *Nat. Prod. Res.*, vol. 30, n.º 10, pp. 1123–1130, mai. 2016, doi: 10.1080/14786419.2015.1043632.

[55] Ş. Kıvrak, «Essential oil composition and antioxidant activities of eight cultivars of Lavender and Lavandin from western Anatolia», *Ind. Crops Prod.*,

- vol. 117, pp. 88–96, jul. 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.02.089.
- [56] G. P. P. Kamatou e A. M. Viljoen, «Linalool – a Review of a Biologically Active Compound of Commercial Importance», *Nat. Prod. Commun.*, vol. 3, n.º 7, p. 1934578X0800300, jul. 2008, doi: 10.1177/1934578X0800300727.
- [57] R. Domínguez *et al.*, «Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review», *Food Res. Int.*, vol. 113, pp. 93–101, nov. 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.073.
- [58] D. Pljevljakusic, S. K. Velickovska, L. Mihajlov e A. Cherepnalkoski, «Chemical composition and biological activity of lavandin and lavender essential oils.», vol. 100, n.º 2, pp. 91–103.
- [59] N. R. Sucupira, A. B. da Silva, G. Pereira e J. N. da Costa, «Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos», *J Health Scie*, vol. 14, n.º 4, 2015, [Em linha]. Disponível em:
<https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/885>
- [60] I. Dadalıoğlu e G. A. Evrendilek, «Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, n.º 26, pp. 8255–8260, dez. 2004, doi: 10.1021/jf049033e.
- [61] J. S. Chaar, «Estudos Analíticos e Modificação Química por Acetilação do Linalol Contido no Óleo Essencial da Espécie *Aniba duckei* Kostermans», tese de doutoramento, Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, Brasil, 2000.
- [62] M. I. Rodríguez-López *et al.*, «Comprehensive Characterization of Linalool-HP-β-Cyclodextrin Inclusion Complexes», *Mol. Basel Switz.*, vol. 25, n.º 21, p. 5069, nov. 2020, doi: 10.3390/molecules25215069.
- [63] H. Liu, S. Wang, e N. Qi, «Controllable structure, properties, and degradation of the electrospun PLGA/PLA-blended nanofibrous scaffolds», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 125, n.º S2, pp. E468–E476, set. 2012, doi: 10.1002/app.36757.
- [64] E. Fathi, N. Atyabi, M. Imani, e Z. Alinejad, «Physically crosslinked polyvinyl alcohol–dextran blend xerogels: Morphology and thermal behavior», *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, n.º 1, pp. 145–152, fev. 2011, doi:

10.1016/j.carbpol.2010.11.018.

- [65] M. A. Cuiffo, J. Snyder, A. M. Elliott, N. Romero, S. Kannan, e G. P. Halada, «Impact of the Fused Deposition (FDM) Printing Process on Polylactic Acid (PLA) Chemistry and Structure», *Appl. Sci.*, vol. 7, n.º 6, p. 579, jun. 2017, doi: 10.3390/app7060579.
- [66] F. Luzi *et al.*, «Gallic Acid and Quercetin as Intelligent and Active Ingredients in Poly(vinyl alcohol) Films for Food Packaging», *Polymers*, vol. 11, n.º 12, p. 1999, dez. 2019, doi: 10.3390/polym11121999.
- [67] S. A. R. Severo, «Produção de Fibras Têxteis com Libertação Controlada de Odores», CeNTI – Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes, FEUP, Porto, 2016. [Em linha]. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/88693/2/116634.pdf>
- [68] A. Hazra, K. Alexander, D. Dollimore, e A. Riga, «Characterization of some essential oils and their key components», *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 75, n.º 1, pp. 317–330, 2004, doi: 10.1023/B:JTAN.0000017352.86803.6d.
- [69] F. Hernandez-Tenorio e C. Giraldo-Estrada, «Characterization and chemical modification of pullulan produced from a submerged culture of *Aureobasidium pullulans* ATCC 15233», *Polym. Test.*, vol. 114, p. 107686, out. 2022, doi: 10.1016/j.polymertesting.2022.107686.
- [70] L. T. Carvalho, «Modificação química de pululana e seu uso na produção de partículas para sistemas de liberação controlada de Indometacina», Escola de Engenharia de Lorena, São Paulo, Brasil, 2019.
- [71] «Pullulan | 9057-02-7», ChemicalBook. Acedido: 2 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8141488.htm
- [72] Â. Luís, A. Ramos, e F. Domingues, «Pullulan–Apple Fiber Biocomposite Films: Optical, Mechanical, Barrier, Antioxidant and Antibacterial Properties», *Polymers*, vol. 13, n.º 6, p. 870, mar. 2021, doi: 10.3390/polym13060870.
- [73] J. A. Sampaio, «*Tratamento de Minérios: Práticas Laboratoriais*». Rio de Janeiro, Brasil: CETEM/MCT, 2007, cap. 2, sec.1, p. 38.
- [74] M. Dwamena, «Filament Moisture Guide: Which Filament Absorbs Water? How to Fix It – 3D Printerly». Acedido: 10 de maio de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://3dprinterly.com/filament-moisture-guide-which->

filament-absorbs-

water/?fbclid=IwAR22nSm9s_oCczyypCs52G5u4VoHsaS9L7Bw8ZiifeoS2XtUCawFq9YCWyo

[75] O. Laput, et al., «Low-temperature plasma treatment of polylactic acid and PLA/HA composite material», *J. Mater. Sci.*, vol. 54, n.o 17, pp. 11726–11738, set. 2019, doi: 10.1007/s10853-019-03693-4.

[76] J. Liu, Y. Liu, S. Shao, X. Zheng, e K. Tang, «Soluble soybean polysaccharide/carboxymethyl chitosan coatings incorporated with lavender essential oil: Structure, properties and application in fruit preservation», *Prog. Org. Coat.*, vol. 173, p. 107178, dez. 2022, doi: 10.1016/j.porgcoat.2022.107178.