

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

CLEONICE GONÇALVES DA ROSA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ZEÍNA CARREGADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS PARA
APLICAÇÃO EM FILMES NANOCOMPÓSITOS DE POLI
(ÓXIDO ETILENO)**

**FLORIANÓPOLIS
2016**

CLEONICE GONÇALVES DA ROSA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ZEÍNA CARREGADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS PARA
APLICAÇÃO EM FILMES NANOCOMPÓSITOS DE POLI
(ÓXIDO ETILENO).**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Coorientador: Dr. Fabiano Cléber Bertoldi

**FLORIANÓPOLIS
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

da Rosa, Cleonice Gonçalves

Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Zeína Carregadas com Óleos Essenciais para Aplicação em Filmes Nanocompósitos de Poli (Óxido Etileno) Cleonice Gonçalves da Rosa; orientador, Pedro Luiz Manique Barreto; coorientador, Fabiano Cléber Bertoldi. – Florianópolis, SC, 2015

132 p.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos.

Inclui referência

1. Ciência dos Alimentos. 2. Embalagens ativas. 3. Óleos essenciais. 4. Nanopartículas. 5. Filmes nanocompósitos. I. Manique Barreto, Pedro Luiz. II. Bertoldi, Cleber Fabiano. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

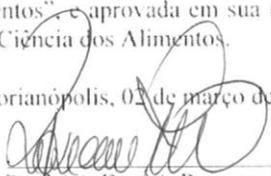
**SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ZEÍNA CARREGADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS PARA
APLICAÇÃO EM FILMES NANOCOMPÓSITOS DE POLI (ÓXIDO
ETILENO)**

Por

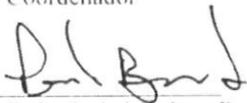
Cleonice Gonçalves da Rosa

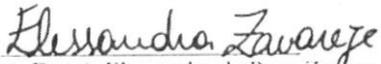
Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

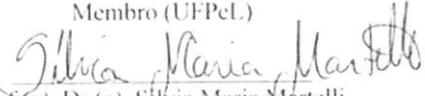
Florianópolis, 02 de março de 2016.

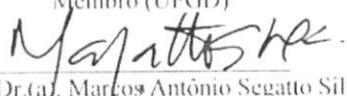

Prof. (a). Dr. (a). Roseane Fett
Coordenador

Banca Examinadora:


Prof.(a). Dr.(a). Pedro Luiz Manique Barreto,
Orientador (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Elessandra da Rosa Zavareze,
Membro (UFPEL)


Prof.(a). Dr.(a). Sílvia Maria Martelli,
Membro (UFGD)


Prof.(a). Dr.(a). Marcos Antônio Segatto Silva,
Membro (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Edna Regina Amante,
Membro (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Vildes Maria Scussel,
Membro (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre presente em minha vida.

Ao meu companheiro Michael, por todo companheirismo, amor, amizade, dedicação e parceria em todos esses anos.

A minha família pela educação e respeito, sempre mostrando o caminho certo a ser seguido.

Ao professor Pedro Luiz Manique Barreto, por todos os ensinamentos, confiança e amizade durante esses anos.

Ao Dr. Fabiano Cleber Bertoldi (Estação Experimental de Itajaí/SC/Epagri) pela orientação e colaboração.

Aos amigos e colegas de laboratório de Reologia e Polímeros Naturais: Matheus, Carolina, Bruna, Ana Paula, Gabriela, Amanda, Jefferson, Sabrina, Aline, Micheli, Bianca e Daniele, pela amizade, companheirismo e aprendizado.

Aos amigos do PGCAL.

A professora Silvia Martelli pelos ensinamentos, amizade e dedicação.

Ao professor Marcos Villetti pela disponibilidade de seu laboratório para a realização de algumas análises desse trabalho.

Ao professor Marcos Segatto, por colocar a disposição a estrutura do seu laboratório para a realização de parte das caracterizações desse trabalho.

Ao centro de microscopia da UFSC, LACBIO e POLIMAT pelo aporte.

Aos membros da banca pela disposição.

A todos os professores e funcionários do PGCAL.

Ao Projeto Fapesc 14845/2011-8 entre Epagri/Ufsc/Fapesc.

A UFSC, CNPQ, Capes e FAPESC.

A todos muito Obrigada.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi desenvolver nanopartículas de zeína carregadas com os óleos essenciais de orégano e tomilho e seus respectivos componentes majoritários timol e carvacrol, e suas aplicações em filmes. As nanopartículas estudadas revelaram estabilidade no armazenamento, (4 °C e 20 °C) durante 90 dias quanto à atividade antioxidante, eficiência de encapsulação, índice de polidispersão e potencial zeta; atividade antimicrobiana frente às bactérias *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 2593, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica subsp. enterica serovar. Typhimurium* e liberação controlada ao longo do tempo. As nanopartículas carregadas apresentaram características distintas aos óleos essenciais e aos compostos puros não encapsulados, sendo comprovada pelas técnicas estudadas. Com intuito de desenvolver um filme nanocompósito com propriedades bioativas, dispersões de nanopartículas de zeína carregadas com timol e carvacrol foram incorporadas nas concentrações de 30, 50 e 70 % (v/v) na solução filmogênica de poli (óxido de etileno) (PEO) a 3 % (m/v). A interação entre as nanopartículas e o PEO foi confirmada pelas técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Microscopia Eletrônica de Varredura. Análises reológicas das soluções filmogênicas indicaram um aumento do índice de consistência com comportamento não-newtoniano com o incremento das concentrações de nanopartículas. Com a incorporação das nanopartículas foram observadas melhorias nas propriedades térmicas e manutenção da plasticidade dos filmes, acréscimo na atividade antioxidante, aumento da hidrofobicidade, manutenção da luminosidade dos filmes de PEO e aumento da coloração e opacidade dos filmes.

Palavras-chave: Nanopartículas. Zeína. Óleos essenciais. Nanocompósitos.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and apply in films zein nanoparticles loaded with the essential oils of oregano and thyme and their majority components thymol and carvacrol. The studied nanoparticles showed storage stability (4 and 20 ° C) for 90 days of the antioxidant activity, encapsulation efficiency, polydispersity index and zeta potential; antimicrobial activity against bacterias *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 2593, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica subsp.enterica serovar. Typhimurium*, and controlled release over time. The loaded nanoparticles showed distinct characteristics in relation to the essential oils and pure compounds not encapsulated, as proved by the studied techniques. In order to develop a nanocomposite film with bioactive properties, dispersions of zein nanoparticles loaded with thymol and carvacrol were incorporated at concentrations of 30, 50 and 70% (v / v) of the filmogenic solution of poly (ethylene oxide) (PEO) 3% (m / v). The interaction between the nanoparticles and PEO was confirmed by the techniques Calorimetry Exploratória Differential, Infrared Spectroscopy with Fourier Transform and Scanning Electron Microscopy. The Rheological Analysis of the filmogenic solutions indicated an increase in the consistency index with non-Newtonian behavior while increasing concentrations of nanoparticles. By the nanoparticles incorporation, improvements were observed in the thermal properties and maintenance of the plasticity of the film, increasing in the antioxidant activity, increased hydrophobicity, luminosity maintenance of PEO films and increased color and opacity of the films.

Keywords: Nanoparticles. Zein. Essential oils. Nanocomposites.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Estrutura química do carvacrol e timol.....	30
Figura 2 Mecanismos e local de ataque celular dos óleos essenciais frente às bactérias.....	32
Figura 3 Estrutura química do surfactante pluronic.....	35
Figura 4 Mecanismos de liberação de fragmentação, inchamento, erosão e difusão.....	39

CAPÍTULO 2 SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE OREGANO E TOMILHO E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS

Figura 1 Perfil de liberação dos compostos encapsulados.....	70
Figura 2 Transições térmicas referentes a zeína, óleos essenciais (orégano e tomilho), compostos puros (timol e carvacrol), NPT-controle, e nanopartículas carregadas.....	72
Figura 3 Termogramas de Análise Termogravimétrica (TGA) referentes a zeína, óleos essenciais (orégano e tomilho), compostos puros (timol e carvacrol), NPT-controle, e nanopartículas carregadas.....	75
Figura 4 Função de correlação e distribuição do tempo de decaimento das nanopartículas estudadas. a) NPT-orégano; b) NPT-timol; c) NPT-tomilho e d) NPT-carvacrol.....	77
Figura 5 Micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de zeína carregadas com óleos.....	80
Figura 6 Micrografias de Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais e nanopartícula controle.....	82

CAPITULO 3 CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE POLI (ÓXIDO ETILENO) INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADA COM MONOTERPENOS FENÓLICOS.

Figura 1 Espectros de FTIR. a) PEO (controle), PEO/T-NP30, PEO/T-NP50 e PEO/T-NP70. b) PEO/C-NP30, PEO/C-NP50 e PEO/C-NP70.	109
Figura 12 Termogramas de TGA. a) PEO (controle), PEO/T-NP30, PEO/T-NP50 e PEO/T-NP70. b) PEO/C-NP30, PEO/C-NP50 e PEO/C-NP70.....	113

Figura 2 Termogramas de DSC com respectivas curvas de aquecimento e resfriamento. a) PEO (controle), PEO/T-NP30, PEO/T-NP50 e PEO/T-NP50. b) PEO/C-NP30, PEO/C-NP50 e PEO/C-NP70.....	115
Figura 3 Micrografias de MEV representadas na coluna da esquerda pela superfície dos filmes e na coluna da direita pela secção transversal. a) e b) PEO (controle); c) e d) PEO/T-NP30; e) e f) PEO/T-NP50; g) e h) PEO/T-NP70.....	118
Figura 4 Micrografias de MEV representadas na coluna da esquerda pela superfície dos filmes e na coluna da direita pela secção transversal. a) e b) PEO (controle); c) e d) PEO/C-NP30; e) e f) PEO/C-NP50; g) e h) PEO/C-NP70.....	119

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE OREGANO E TOMILHO E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS

Tabela 1 Estudo da estabilidade nas nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais, composto puro e controle.....	61
Tabela 2 Atividade antimicrobiana das nanopartículas carregadas com os óleos essenciais e controle frente a diferentes microrganismos.....	67
Tabela 3 Constantes de velocidade de liberação (K), coeficiente de correlação linear (R) e o mecanismo de liberação (n) referente aos perfis de liberação dos sistemas nanoparticulados.....	69
Tabela 4 Transições térmicas referentes a zeína, óleos essenciais (orégano e tomilho), compostos puros (timol e carvacrol), NPT-controle, e nanopartículas carregadas.....	74

CAPITULO 3 CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE POLI (ÓXIDO ETILENO) INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADA COM MONOTERPENOS FENÓLICOS.

Tabela 1 Ângulo de contato ($^{\circ}$), energia livre superficial (γ) dos filmes incorporados com PEO/T-NP e C-NP para os três diferentes líquidos.....	99
Tabela 2 Medidas de espessura, módulo de Young e Tensão máxima dos filmes de PEO puro e incorporados com diferentes concentrações de nanopartículas.....	101
Tabela 3 Resultados do índice de comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (k), conforme modelo Lei de Potência, para soluções de filmes de PEO com diferentes concentrações de nanopartículas.....	104
Tabela 4 Valores de cor dos filmes de PEO puro e incorporados com as nanopartículas.....	105
Tabela 5 Características de transmissão de luz e opacidade para filmes controle e incorporados com as nanopartículas de timol e carvacrol ..	107
Tabela 6 Transições térmicas dos filmes de PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP.....	112
Tabela 7 Atividade antioxidante para os filmes de PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ζ	Potencial zeta
ΔE_{ab}	Diferença total de cor
AA	Atividade antioxidante
ANOVA	Análise de variância
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i> / Módulo de refletância atenuada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DLS	<i>Dynamic light Scattering</i> / Espalhamento de luz dinâmico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DSC	Differential scanning calorimetry/calorimetria exploratória diferencial
EE	Eficiência de encapsulação
EM	Módulo de elasticidade ou módulo de Young
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> / Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier/
IP	Índice de polidispersão
K	Constantes de velocidade de liberação
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
n	tipo de transporte de liberação
NPT	Nanopartícula
NPT-carvacrol	Nanopartícula carregada com carvacrol
NPT-orégano	Nanopartícula carregada com óleo essencial de orégano
NPT-timol	Nanopartícula carregada com timol
NPT-tomilho	Nanopartícula carregada com óleo essencial de tomilho
NPT-vazia	Nanopartícula controle, sem princípio ativo
O	Opacidade
PEO	Poli (óxido de etileno)
PEO/C-NP	Filmes de PEO incorporado com nanopartículas de carvacrol
PEO/T-NP	Filmes de PEO incorporado com nanopartículas de timol
PI	Porcentagem de inibição
R ²	coeficiente de correlação linear

Rh	Raio hidrodinâmico
TGA	Análise termogravimétrica
TS	Tensão na ruptura
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
Z-ave	<i>Mean particle size</i> /diâmetro médio de partícula
$\dot{\gamma}$:	taxa de deformação
γ_d	Energia livre superficial dispersiva (apolar)
γ_p	Energia livre superficial polar
γ_T	Energia livre superficial total
ζ	<i>Zeta potential</i> /potencial zeta
τ	Tensão de cisalhamento
k :	índice consistência (Pa.s ⁿ)
n :	índice de comportamento do fluxo (adimensional).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 Objetivos.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
CAPÍTULO 1:REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1 Revisão bibliográfica.....	29
1.1 Óleos essenciais.....	29
1.2 Encapsulação.....	33
1.3 Técnicas de caracterização de nanopartículas.....	36
1.4 Embalagens para alimentos.....	40
1.5 Nanocompósitos.....	41
1.6 Referências.....	42
CAPITULO 2: SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE OREGANO E TOMILHO E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS.....	49
1 Introdução.....	52
2 Material e métodos.....	54
2.1 Material.....	54
2.2 Extração e caracterização dos óleos essenciais.....	54
2.3 Identificação e quantificação dos óleos essenciais.....	55
2.4 Preparações das nanopartícula.....	55
2.5 Estudo de estabilidade.....	56
2.5.1 Eficiência de encapsulação (EE).....	56
2.5.2 Determinação da atividade antioxidante (AA).....	56
2.5.3 Determinação do tamanho da partícula (Z-ave), Índice de polidispersão (IP) e Potencial zeta (ζ).....	57
2.6 Determinação da atividade antibacteriana das nanopartículas	57
2.7 Estudos de liberação.....	58
2.8 Determinação do espalhamento de luz dinâmico.....	58
2.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	59
2.10 Análise termogravimétrica (TGA).....	59
2.11 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	60
2.12 Análises estatísticas.....	60
3 Resultados e discussão.....	60

3.1 Estudo de estabilidade.....	60
3.2 Avaliações da atividade antimicrobiana.....	67
2.4 Estudos de liberação.....	68
3.4 Calorimetria diferencial de varredura.....	70
3.5 Análises termogravimétrica (TGA).....	73
3.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	76
3.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	79
3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	81
4 Conclusão.....	83
Referências.....	84
CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE POLI (ÓXIDO ETILENO) INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADA COM MONOTERPENOS FENÓLICOS.....	
1 Introdução.....	90
2 Material e Métodos.....	91
2.1 Material.....	91
2.2 Preparação das nanopartículas de zeína carregadas com timol e carvacrol.....	91
2.3 Preparação dos filmes.....	92
2.4 Medidas de espessura dos filmes.....	92
2.5 Propriedades mecânicas.....	92
2.6 Determinação do ângulo de contato.....	93
2.7 Determinação da energia livre superficial.....	93
2.8 Medidas de cor.....	94
2.9 Transmissão de luz e opacidade.....	94
2.10 Comportamento reológico das soluções filmogênicas.....	94
2.11 Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier	95
2.12 Microscopia eletrônica de varredura.....	95

2.13	Análise termogravimétrica (TGA).....	96
2.14	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	96
2.15	Determinação da atividade antioxidante (AA).....	96
2.16	Análises estatísticas.....	96
3	Resultados e Discussão.....	97
3.1	Determinação do ângulo de contato e da energia livre superficial	97
3.2	Propriedades mecânicas.....	100
3.3	Comportamento reológico das soluções.....	102
3.4	Análises de cor.....	105
3.5	Análises de transmissão de luz e opacidade.....	106
3.6	Análises de FTIR.....	108
3.7	Análises termogravimétricas (TGA).....	111
3.8	Análises de Calorimetria diferencial de varredura.....	113
3.9	Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	117
3.10	Avaliação da atividade antioxidante.....	120
4	Conclusão.....	121
	Referências bibliográfica.....	123
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127
	PERPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTURO.....	129
	ANEXO A- Artigo “Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes” publicado em “Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects”.....	131
	ANEXO B- Artigo “Development of zein nanoparticles loaded with essential oils and stabilized by non-ionic surfactant” em processo de revisão em “Food Science & Nutrition”.....	132

1 INTRODUÇÃO

Uma das alternativas mais eficazes para melhorar as propriedades de filmes poliméricos para a aplicação em alimentos é a formação de nanocompósitos. Nanocompósitos poliméricos são materiais formados por uma matriz polimérica reforçada com uma pequena quantidade, em geral abaixo de 5 % em massa de uma carga nanométrica. Devido ao reforço fornecido pelas partículas nanométricas dispersas no material polimérico, ocorre uma alteração nas propriedades das embalagens, em comparação com o polímero puro, como poli (óxido de etileno) devido às suas características de alta solubilidade em água, fato que limita suas aplicações em embalagens de alimentos (ZHANG et al., 2003).

Os sistemas nanoparticulados apresentam vantagens quando comparados aos carreadores micrométricos convencionais, podendo melhorar propriedades como reatividade, propriedades mecânicas, características elétricas e comportamento *in vivo*. À medida que o tamanho das partículas diminui, uma maior proporção de moléculas é encontrada na superfície da partícula em relação ao interior, dessa forma uma nanopartícula tem uma área muito maior por unidade de massa em comparação com uma partícula maior, levando a uma maior reatividade (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007)

Além disso, os ingredientes biologicamente ativos, como óleos essenciais, presentes nas nanopartículas, conferem propriedades funcionais desejadas para os materiais de embalagem (PEREIRA et al., 2011). O timol (5-metil-2-(1-metiletil) fenol) e o carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil) fenol) são monoterpenos presentes em várias espécies de óleos essenciais, como o orégano e tomilho, ou obtido via síntese química. As propriedades funcionais desses óleos são de responsabilidade dos monoterpenos fenólicos (BAKKALI et al., 2008).

Timol e carvacrol apresentam propriedades antimicrobianas (DEL NOBILE et al., 2008; GUARDA et al. 2011), antioxidantes (FASSEAS et al., 2007; CAMO et al., 2011;), antiinflamatórias (RIELLA et al., 2012) e as suas aplicações em produtos alimentares estão sendo cada vez mais difundidas como alternativa aos aditivos sintéticos (GOVARIS et al., 2010; MASTROMATTEO et al., 2010; RAMOS et al., 2012).

No entanto, a eficácia desses compostos, depende da sua preservação e biodisponibilidade, sendo este o grande obstáculo, já que

estes compostos são suscetíveis à degradação, durante o processamento dos alimentos. Isto é devido às suas características de alta volatilidade e instabilidade química quando submetidos a diferentes condições de temperatura, luz e oxigênio. Além disto, uma pequena proporção dos compostos permanece disponível após a administração oral, devido a baixa solubilidade nas condições encontradas no trato gastro-intestinal (pH, enzimas, presença de outros nutrientes) (BOROSKI et al., 2011).

Uma alternativa para prolongar e preservar suas características intrínsecas é a encapsulação, ou seja é o carregamento desses compostos em matrizes poliméricas, preservando sua estabilidade química e promovendo sua liberação no momento e na taxa desejado. A eficiência de encapsulação vai depender do método utilizado, do material de parede, e do tamanho da partícula, o qual pode ser ajustado dependendo dos parâmetros de processo tais como o tipo de surfactante utilizado (NEDOVIC et al., 2011).

Dessa forma, o intuito deste trabalho é desenvolver filmes poliméricos biodegradáveis nanoestruturados pela inclusão de nanopartículas carregadas com óleos essenciais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obtenção e caracterização de nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais e aplicação em filmes nanocompositos de poli-óxido etileno.

2.2 Objetivos específicos

- a) Extração de óleos essenciais de orégano e tomilho por arraste de vapor e caracterização quanto ao conteúdo de timol e carvacrol, respectivamente.
- b) Obtenção de nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais de orégano, de tomilho, e com o composto timol e carvacrol e comparadas com nanopartículas controle (vazias).
- c) Avaliar a estabilidade no armazenamento por 90 dias quanto a atividade antioxidante, eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade.
- d) Avaliar a liberação controlada do princípio ativo encapsulado e a atividade antimicrobiana das nanopartículas.
- e) Avaliar as características morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) e espalhamento de luz dinâmico (DLS).
- f) Incorporar as nanopartículas de timol e carvacrol em filmes nanocompositos de poli (óxido etileno) (PEO).
- g) Caracterizar os filmes de PEO incorporados com as nanopartículas com relação às propriedades físico-químicas, mecânicas, óticas, reológicas, molhabilidade, térmicas, estruturais, morfológicas e atividade antioxidante.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Revisão bibliográfica

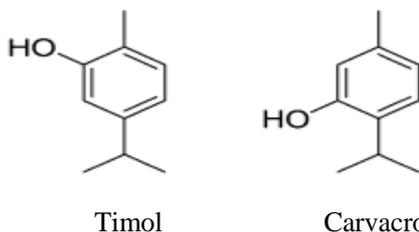
1.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos naturais oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas, podendo ser sintetizados em todos os órgãos da planta tais como as folhas, flores, caules, sementes, frutos e raízes. São compostos por moléculas complexas, com odor forte e fisicamente apresenta-se na forma líquida, límpida e solúvel em solventes orgânicos, com uma densidade inferior a da água. A composição química dos óleos essenciais é complexa, pois são misturas de compostos naturais que podem conter cerca de 20-60 % de componentes em concentrações diferentes e podem ser originados a partir de vias biossintéticas distintas (BURT, 2004; TUREK; STINTZING, 2013).

O perfil dos compostos presentes nos óleos essenciais pode variar em relação ao órgão da planta a ser extraída, época da colheita, condições climáticas e solo. Normalmente o grupo principal é composto de terpenos e terpenóides e outro grupo de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por moléculas de baixa massa molecular (BAKKALI et al., 2008).

O principal produto extraído do orégano (*Origanum vulgare* Linneus) e do tomilho (*Thymus vulgaris*) é o seu óleo essencial, de cor amarelo limão, estando presente na planta fresca em torno de 0,15 a 0,40 % (m/m). A composição química desses óleos é basicamente de compostos fenólicos timol e carvacrol, sendo esta bastante variável. Esses compostos são muito semelhantes estruturalmente, sendo isômeros de posição em relação ao grupo hidroxila (Figura 1) (EL-NEKEETY et al., 2011; BONFANTI et al., 2012).

Figura 1 Estrutura química do carvacrol e timol



Fonte: Adaptada de Amorati, Foti e Valgimigli (2013).

El-Nekeety (2011) e seus colaboradores avaliaram a composição química do óleo essencial de tomilho encontrando o carvacrol (45 mg/g), como composto majoritário seguido do timol (24,7 mg/g). Rota et al. (2008) ao analisar a concentração relativa dos compostos voláteis presentes em 3 cultivares de tomilho obtiveram variação nos resultados em relação a espécie estudada: *T. hyemalis* (40,1 % carvacrol e 2,9 % timol); *T. zygis* (68,1 % e 3,5 % respectivamente para timol e carvacrol) e em cultivares *T. vulgaris* (57,7 % timol e 2,8 % carvacrol).

Bonfanti et al. (2012) compararam a composição química do óleo de orégano de quatro diferentes plantas cultivadas na Sicília (Itália) com uma amostra comercial. As plantas nativas variaram entre 27 a 37 % de sua composição majoritária como timol, já a amostra comercial expressou 77,7 % dos seus compostos majoritários em carvacrol.

Alguns estudos ainda classificam cultivares de orégano relacionando à composição química com seu local de origem, como orégano quimiotipo timol, cultivado na Itália (RUSSO et al., 1998; NAPOLI; CURCURUTO; RUBERTO, 2009), e orégano quimiotipo carvacrol para espécies cultivadas na Grécia (SIVROPOULOU et al., 1996) e Alemanha (AZIZI; YAN; HONERMEIER, 2009).

Os óleos essenciais têm sido utilizados há milênios devido aos benefícios que podem proporcionar a saúde devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, e também na proteção dos alimentos contra deteriorações (BURT, 2004).

A proteção antioxidante pode ser conseguida pela adição direta do óleo essencial na matéria-prima. Fasseas (2007) e seus colaboradores

estudaram a estabilidade ao armazenamento de carnes bovinas tratadas com óleo de orégano como antioxidantes, e observaram que a adição do mesmo foi capaz de proteger a carne da oxidação.

Botsoglou et al. (2001) obtiveram resultados satisfatórios, ao estudar o efeito da suplementação com óleo essencial de orégano na dieta de frangos de corte, seu efeito sobre a oxidação lipídica do músculo do peito de frango e a estabilidade durante o armazenamento refrigerado e congelado. Dal Bosco et al. (2014) estudaram o efeito da adição de óleo de tomilho na dieta de coelhos sob a oxidação lipídica da carne, revelando-o como um importante antioxidante comparado a outros antioxidantes naturais como α -tocoferol.

Essas propriedades antioxidantes dos óleos essenciais são atribuídas a alguns de seus compostos, particularmente os fenóis, que apresentam capacidade de retardar ou desacelerar a oxidação de um material oxidável, podendo estar incluídos lipídeos, carboidratos, proteínas e outras moléculas orgânicas que compõem os tecidos de origem animal ou vegetal.

Um sistema de oxidação de forma geral, é iniciado por algumas espécies de radicais que independente de sua origem ou estrutura, podem reagir com o substrato lipídico RH (pela abstração do átomo de H), para formar um radical alquil ($R\bullet$), o qual pode reagir com o oxigênio e formar um radical peroxil ($ROO\bullet$). O radical peroxil ($ROO\bullet$), em uma reação em cadeia, ataca uma outra molécula de substrato formando um hidroperóxido ($ROOH$), e outro radical. A reação em cadeia continua ocorrendo por muitos ciclos até que duas espécies radiculares acidentalmente se encontrem, chamada de etapa de terminação (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001).

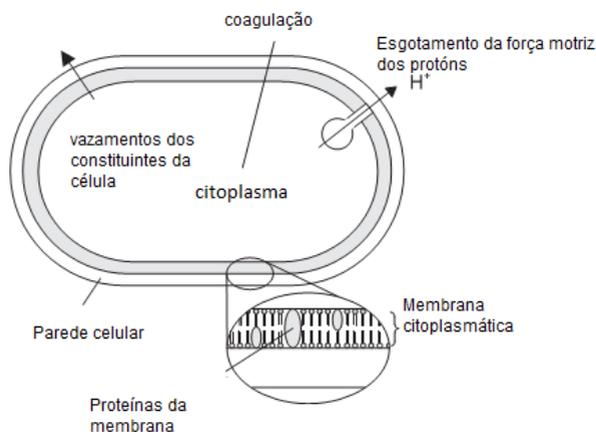
Compostos capazes de emparelhar os radicais dessa reação em cadeia são chamados de antioxidantes, e podem ser classificados, de acordo com seu mecanismo de ação, em antioxidantes primários, os quais podem inibir ou interromper a reação em cadeia da oxidação pela doação de elétrons ou átomo de hidrogênio aos radicais livres, produzindo produtos estáveis; e antioxidantes secundários, os quais retardam o processo de oxidação por mecanismos diversos (MOZAFARI et al., 2006).

Os antioxidantes primários incluem compostos fenólicos, tais como os tocoferóis, butilhidroxitolueno (BHT); butilhidroxianisol (BHA); galato de propila, de octila e de dodecila; *t*-butilhidroquinona

(TBHQ). Os antioxidantes secundários atuam por uma variedade de mecanismos, tais como agentes quelantes de metais (ácidos cítrico, málico e tartárico), removedores de oxigênio (ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo), conversão de hidroperóxidos em espécies não radicais (fosfolipídeos), absorção por radiação UV ou desativação do oxigênio singlete (carotenóides) (SHAHIDI; ZHONG 2010).

Além de importante ação antioxidante esses compostos também apresentam ação antimicrobiana. A ação antimicrobiana (Figura 2) dos óleos essenciais é atribuída ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática bacteriana, permitindo a penetração do material antimicrobiano para o interior da célula, interagindo no metabolismo celular pela coagulação do citoplasma, perda de constituintes celulares para o meio externo e esgotamento da força motriz de prótons (BURT, 2004).

Figura 2 Mecanismos e local de ataque celular dos óleos essenciais frente às bactérias.



Fonte: Adaptado de Burt (2004).

Estudos relatam que bactérias gram-positivas são mais sensíveis do que bactérias gram-negativas aos compostos ativos. Guarda et al. (2011); Marino, Bersani e Comi (2001) estudaram o efeito bacteriostático do óleo de orégano sobre bactérias gram-positivas e

gram-negativas, e relataram que o efeito é maior contra as cepas de bactérias gram-positivas. Guarda (2011) e seus colaboradores avaliaram a atividade antimicrobiana de filmes plásticos flexíveis adicionados dos agentes antimicrobianos timol e carvacrol microencapsulados frente aos microrganismos *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* (bactéria gram-positiva) e *Escherichia coli* (bactéria gram-negativa), sendo mais efetiva a inibição contra as bactérias gram-positivas.

A menor sensibilidade para bactérias gram-negativas frente ao antimicrobiano pode ser explicada pelo fato desses microrganismos apresentarem na sua membrana, uma camada externa lipopolissacarídica (LPS) limitando a difusão dos compostos hidrofóbicos, dessa forma é necessário uma maior concentração de agente antimicrobiano para obter o mesmo efeito do que nas bactérias gram-positivas. O timol e o carvacrol apresentam capacidade de desintegrar essa membrana externa da bactéria gram-negativa, liberando o LPS, e assim aumentando a permeabilidade da adenosina trifosfato (ATP), na membrana citoplasmática, alterando a permeabilidade passiva da célula (SMITH-PALMER et al., 1997).

1.2 Encapsulação

Os óleos essenciais apresentam em sua composição uma variedade de compostos químicos antioxidantes e antimicrobianos, contribuindo para aumentar a estabilidade dos alimentos. Uma alternativa na indústria de alimentos é a substituição dos aditivos sintéticos, por compostos naturais extraídos de vegetais.

O maior desafio para a utilização dos óleos essenciais em sua forma convencional está em suas características de alta volatilidade e instabilidade química frente às condições adversas do processamento e armazenamento de alimentos (BOROSKI et al., 2011). A manutenção das propriedades benéficas desses compostos até que sejam liberados nos sítios onde a absorção é desejada pode ser obtida através da encapsulação.

A tecnologia de encapsulação consiste no carregamento desses compostos em matrizes poliméricas, mantendo sua estabilidade química e promovendo a liberação no momento e na taxa desejados. A eficiência de encapsulação vai depender do método utilizado, do material de parede, e do tamanho da partícula, o qual pode ser ajustado

dependendo dos parâmetros de processo tais como o tipo de surfactante utilizado (NEDOVIC et al., 2011).

O método de nanoprecipitação, patenteado por Fessi (1989) e seus colaboradores, apresenta inúmeras vantagens quando comparado aos demais sistemas de encapsulação, como rapidez, fácil utilização e simplicidade, além de permitir a produção de nanopartículas (100-300 nm) com distribuição estreita e unimodal. Esse sistema consiste em duas fases: fase solvente e fase não-solvente. A fase solvente é composta pelo material de revestimento utilizado, e do composto ativo. A fase não-solvente consiste de água e um surfactante hidrofílico (BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005).

A formação das nanopartículas é instantânea, e todo procedimento é realizado em uma única etapa. Resumidamente, dois solventes que são miscíveis, tanto o polímero quanto o composto ativo devem dissolver-se no primeiro (o veículo), mas não no segundo sistema (o não-solvente). A nanoprecipitação vai ocorrer por uma rápida dessolvatação do polímero, quando a solução do mesmo for adicionada ao não-solvente. No momento em que a solução com o polímero entra em contato com o meio dispersante aquoso o polímero precipita, encapsulando imediatamente o composto ativo (ZHONG; JIN, 2009).

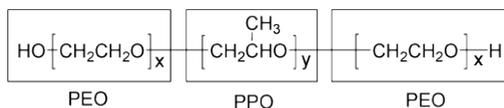
A zeína é uma prolamina do milho, rica nos aminoácidos prolina, leucina, glutamina e alanina, e devido ao caráter hidrofóbico destes aminoácidos, a zeína é solúvel em etanol em concentrações acima de 70 % (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). Essas características de hidrofobicidade, conferem a zeína a capacidade de promover auto-associação na presença de solventes polares como água (JOYE; MCCLEMENTS, 2013). Esta associação da zeína já foi utilizada para encapsular óleos essenciais como orégano e tomilho (PARRIS et al., 2005) e também timol e carvacrol (WU; LU; WANG, 2012). Porém inexistem estudos sobre a estabilização de nanopartículas carregadas com óleos essenciais com surfactantes não-iônicos e também sobre o armazenamento das nanopartículas em solução.

Surfactantes são amplamente empregados no estudo de estabilização de partículas e emulsões. Esses compostos são divididos em iônicos que possuem um grupo hidrofílico iônico (catiônico ou aniônico) ligados a uma cauda hidrofóbica; surfactantes zwitteriônicos (cargas positiva e negativa, na parte hidrofílica); surfactantes anfóteros (podem ser catiônicos, aniônicos ou zwitteriônicos,

dependendo do pH) e surfactantes não iônicos (grupo hidrofílico é geralmente uma cadeia poliéter, podendo ser também uma cadeia poli-hidroxílica) (RHEIN et al., 2007).

Surfactantes não-iônicos são responsáveis por conferir a estabilidade estérica em sistemas coloidais em meio aquoso, proveniente dos grupos hidrofílicos localizados na superfície das partículas ou pela cadeia alquílica (média ou longa em número de carbonos), como resultado da atração da água ao redor da partícula, criando assim uma barreira protetora que previne a coagulação. O Pluronic é um nome genérico comercial para uma série de copolímeros triblocos poli (PEO-PPO-PEO), onde os blocos de poli(óxido etileno) (PEO) são hidrofílicos e o bloco central de poli(óxido propileno) (PPO) é hidrofóbico (Figura 3). O Pluronic F-68 é um tribloco simétrico, com estrutura poli (EO₈₀-PO₃₀-EO₈₀). Quando adsorvido na região interfacial do coacervato, os blocos de PEO (com 80 monômeros cada) são projetados para a fase aquosa e o bloco de PPO é ancorado na superfície (DUMORTIER et al., 2006).

Figura 3 Estrutura química do surfactante pluronic.



Fonte: Sun et al. (2011).

Devido à estabilização proporcionada pelos surfactantes, pode-se chegar ao tamanho de partículas muito pequeno, inclusive em escala nanométrica. Os sistemas nanoparticulados apresentam vantagens quando comparados aos carreadores micrométricos convencionais, podendo melhorar propriedades como reatividade, força, características elétricas e comportamento in vivo. A medida que o tamanho das partículas diminui, uma maior proporção de moléculas é encontrada na superfície da partícula em relação ao interior, dessa forma uma nanopartícula tem uma superfície muito maior por unidade de massa em comparação com uma partícula maior, levando a uma maior reatividade (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

1.3 Técnicas de caracterização de nanopartículas

A caracterização apropriada das nanopartículas se torna necessária para controlar a estabilidade das partículas, avaliando o comportamento em relação ao seu tamanho, potencial zeta, índice de polidispersão, liberação da droga, eficiência de encapsulação e comportamento referente à estabilidade térmica.

A eficiência de encapsulação pelo método de nanoprecipitação depende de alguns fatores determinantes como: tipo de revestimento utilizado, da interação deste com o composto ativo, natureza química do composto ativo e sua polaridade. Desta forma a eficiência de encapsulação em compostos hidrofílicos pode atingir valores máximos de 100 %, e em casos de compostos lipofílicos esses resultados podem ser superiores a 70 %. As técnicas utilizadas para determinar a eficiência de encapsulação podem ser técnicas analíticas de separação, identificação e quantificação como cromatografia de alta eficiência eficiência (CLAE) ou técnicas de identificação e quantificação por espectroscopia do UV-visível (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011).

O tamanho de partícula depende de fatores como: natureza e concentração do polímero e do surfactante na fase orgânica, polaridade dos solventes, natureza e proporção de fases interno-externas. Esses parâmetros podem ser avaliados por espalhamento luz dinâmico (DLS), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (SUNDAR; KUNDU; KUNDU, 2006).

O espalhamento de luz é um método eficaz para caracterização estrutural de polímeros e nanopartículas em solução, pois a intensidade e a distribuição angular da luz espalhada dependem do tamanho e da forma das partículas que provocam o espalhamento em solução. A técnica de espalhamento de luz estático, mede a intensidade média da luz espalhada por um conjunto de partículas, na prática mede-se o número de fótons que chegam a um detector posicionando em cada ângulo e em um determinado intervalo de tempo. No caso do espalhamento dinâmico, mede-se as flutuações da intensidade do espalhamento em função do tempo, acessando o movimento Browniano das moléculas e relacionando-o ao tamanho de partículas. Isso é realizado através da incidência de um laser sobre a amostra e análise da flutuação da intensidade de luz espalhada (WRIEDT, 2012).

A espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também denominada como espalhamento de luz dinâmico, mede a flutuação de intensidade do espalhamento de luz causado pelo movimento das partículas em um ângulo fixo $\Theta=173^\circ$, entretanto, não é capaz de medir a dependência angular, e utiliza uma aproximação conhecida como “*back scattering*”. Esta aproximação é parcialmente válida para sistemas monodispersos e, em sistemas polidispersos, tende a superestimar o valor do raio hidrodinâmico, dada a maior contribuição de partículas grandes na intensidade de espalhamento neste ângulo (SCHÄRTELL, 2007).

A análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) é empregada com o objetivo de adquirir informações sobre o tamanho, dispersão e forma dos sistemas nanoparticulados em solução, sendo possível algumas vezes a diferenciação entre nanocápsula e nanoesfera. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) oferece dados sobre a morfologia da amostra como diferença estrutural, propriedades da superfície e porosidade. Pode se correlacionar os resultados de espalhamento de luz e fator- ρ com as imagens e a distribuição de tamanho obtido por microscopia (TIEDE et al., 2008).

Medidas de potencial zeta, dependem principalmente da natureza química do polímero, do agente estabilizante e do pH do meio (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011). De uma forma geral, o potencial zeta avalia a estabilidade das dispersões coloidais em suspensão seguindo a regra de que os valores de potencial zeta maiores do que ± 30 mV indicam partículas altamente carregadas (negativa ou positivamente), proporcionando dispersões fisicamente estáveis devido à repulsão eletrostática imposta pelas cargas (MEHNERT; MÄDER, 2012).

O termo análise térmica abrange um grupo de técnicas na qual uma propriedade física da substância é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um sistema controlado de aquecimento ou de resfriamento. As técnicas termoanalíticas mais utilizadas para avaliar a formação das cápsulas são a calorimetria diferencial de varredura (DSC) e a análise termogravimétrica (TGA).

A análise termogravimétrica é utilizada para avaliar a estabilidade e propriedades térmicas dos polímeros. O parâmetro medido por essa técnica é o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função da temperatura ou do tempo a uma temperatura

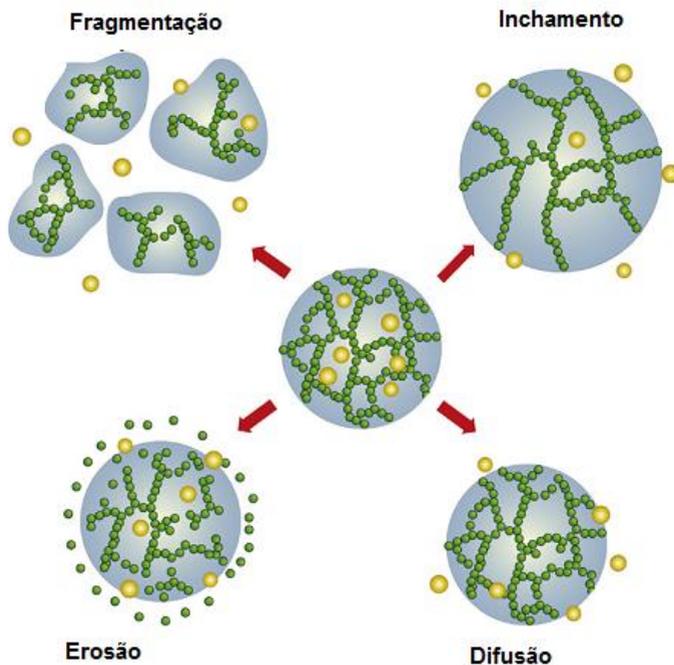
constante. Os polímeros apresentam uma diminuição na sua massa molar que pode ser justificada por mudanças estruturais que ocorrem quando são submetidos a um tratamento térmico. Essas mudanças estruturais são caracterizadas pela ruptura de ligações químicas nas cadeias principais e laterais produzindo novas estruturas (HATAKEYAMA; QUINN, 1999).

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica de análise térmica na qual se mede a diferença de energia fornecida à amostra e a um material de referência, em função da temperatura, enquanto a substância e o material são submetidos a uma variação controlada de temperatura (BROWN, 1998).

A velocidade de liberação de princípios ativos a partir de sistemas nanoparticulados pode ser influenciada pela combinação de diversos fatores, tais como características da matriz polimérica (espessura, porosidade, capacidade de intumescimento e combinação de duas matrizes), tamanho das nanopartículas, localização e concentração do composto ativo no interior das partículas, das propriedades físico-químicas do composto ativo e do polímero (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011).

Na literatura são encontrados quatro mecanismos de liberação propostos por Matalanis, Jones e McClements (2011): difusão, erosão, fragmentação e inchamento, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 Mecanismos de liberação do princípio ativo através de fragmentação, inchamento, erosão e difusão.



Fonte: Adaptado de Matalanis, Jones e McClements (2011).

O mecanismo de difusão consiste na passagem do composto ativo para o meio circundante, passando através das partículas do polímero, sendo que este permanece intacto. A passagem do composto ativo através da estrutura do polímero depende da solubilidade do composto na matriz da partícula, do seu coeficiente de difusão através da matriz, do tamanho da malha da rede do biopolímero em comparação com o tamanho do composto ativo e também por forças de atrações eletrostáticas ou hidrofóbicas que possam ocorrer entre o biopolímero e o composto ativo.

No mecanismo de erosão o composto ativo é liberado no meio devido à presença de processos erosivos que ocorrem na camada externa

ou em toda a matriz do biopolímero. Os processos erosivos podem ser originados por processos físicos, químicos ou enzimáticos, como a dissociação de ligações físicas ou quebra de ligações covalentes.

No processo de fragmentação o componente ativo é liberado para o meio devido à ruptura física do encapsulante, o qual é fragmentado ou fraturado, através da aplicação de força de cisalhamento ou compressão. O composto bioativo continua a difundir para fora das partículas, e a taxa de liberação é rápida devido ao aumento da superfície de contato e diminuição do espaço para a difusão.

No processo de inchamento ocorre a liberação do núcleo provocada pela absorção de solvente pelas partículas do polímero, fazendo com que as partículas sofram uma expansão, aumentando o seu tamanho original.

1.4 Embalagens para alimentos

Plásticos convencionais utilizados em embalagens para alimentos como polietileno, polipropileno, policloreto de vinila, polietileno tereftalato são derivados do petróleo, e implicam em sérias preocupações ambientais. Polímeros biodegradáveis como poli (óxido de etileno) (PEO) representam uma alternativa interessante frente os materiais plásticos convencionais, podendo ser aplicados na indústria de alimentos (ATARES; CHIRALT, 2016).

O poli(óxido de etileno) (PEO) é uma macromolécula linear que contém em sua cadeia a unidade monomérica (-CH₂-CH₂-O-) e grupamentos terminais R = OH e R' = H. É obtido da polimerização por abertura do anel do óxido de etileno. Comercialmente, encontram-se disponíveis polímeros com massa molecular até 5×10^6 . A regularidade da sua unidade estrutural permite um elevado grau de cristalinidade envolvendo 70 a 85 % do polímero. A temperatura de fusão (T_m) da fase cristalina é T_m = 65 °C e a sua transição vítrea (T_g) é T_g = - 60 °C. O PEO é compatível com uma vasta gama de plasticizantes, compostos de baixa massa molecular e outros polímeros. À temperatura ambiente o PEO é muito solúvel em água. É solúvel em uma grande quantidade de solventes orgânicos como acetonitrila, diclorometano e tetrahydrofurano entre outros (DHAWAN; VARMA; SINHA, 2005).

Dentre as utilizações do PEO pode se citar suas aplicações em blendas e filmes nanocompósitos. Jagadish e Raj (2011) estudaram a formação de blendas de PEO com amido para o desenvolvimento de

filmes. Padmaja (2013) e seus colaboradores avaliaram propriedades óticas e estruturais de filmes de PEO com ciclodextrina.

Porém a alta solubilidade do PEO em água limita suas aplicações em embalagens de alimentos, uma alternativa na melhoria dessas propriedades é desenvolver filmes nanocompósitos de PEO funcionalizados com nanopartículas biologicamente ativas (DHAWAN; VARMA; SINHA, 2006a).

1.5 Nanocompósitos

Atualmente, uma das alternativas mais eficazes para melhorar as propriedades de filmes de biopolímeros para a aplicação em alimentos é a formação de nanocompósitos. Nanocompósitos poliméricos são materiais formados por uma matriz polimérica reforçada com uma pequena quantidade, em geral abaixo de 5 % em massa, de uma carga nanométrica. Revestimentos nanocompósitos compreendem normalmente duas fases: uma amorfa e uma cristalina, ou as duas fases cristalinas (ZHANG et al., 2003).

Devido ao reforço fornecido pelas partículas nanométricas dispersas no material do polímero, ocorre uma alteração nas propriedades das embalagens, em comparação com o polímero puro. Oymaci e Altinkaya (2016), ao avaliar adição de nanopartículas de zeína revestidas com caseinato de sódio em filmes de proteínas do soro de leite melhoraram as propriedades mecânicas e barreira ao vapor d'água quando comparados com filmes formados apenas por proteínas do soro de leite.

Fazem parte da composição dos nanocompósitos, além da carga nanométrica, a funcionalização destas com ingredientes biologicamente ativos como tocoferóis, carotenoides, óleos essenciais entre outros, que são capazes de conferir propriedades funcionais desejadas para os materiais de embalagem.

Estudos realizados por Noronha (2014) e colaboradores ao incorporar nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona carregadas com α -tocoferol em matrizes poliméricas de metilcelulose observou que a adição das cargas nanométricas alterou propriedades como plasticidade, alongação na ruptura, aumento da hidrofocidade na superfície dos filmes, acréscimo na atividade antioxidante e liberação controlada de α -tocoferol. Em estudo semelhante, Lino (2012) desenvolveu filmes nanocompósitos de metilcelulose incorporados com nanopartículas de

poli-ε-caprolactona carregadas com β-caroteno, e foi observado alteração na plasticidade e alongação dos filmes, significativo aumento nas barreiras na radiação UV, efetiva ação antioxidante e liberação controlada dos compostos ativos.

Hosseini (2016) e colaboradores avaliaram a incorporação de nanopartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de orégano em filmes de gelatina, resultados apontaram filmes com propriedades antimicrobianas, menos resistentes e mais flexíveis, com diminuição da permeabilidade ao vapor de água.

Referências

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10835–10847, 2013.

ATARES, L. CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 51-62, 2016.

AZIZI, A.; YAN, F.; HONERMEIER, B. Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare L.*) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 554–561, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 67–75, 2005.

BONFANTI, C.; IANNÌ, R.; MAZZAGLIA, A.; LANZA, C. M.; NAPOLI, E. M.; RUBERTO, G. Emerging cultivation of oregano in Sicily: sensory evaluation of plants and chemical composition of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 160–165, 2012.

BOROSKI, M.; AGUIAR, A. C.; BOEING, J. S.; ROTTA, E. M.; WIBBY, C. L.; BONAFÉ, E. G.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Enhancement of pasta antioxidant activity with oregano and carrot leaf. **Food Chemistry**, v. 125, p. 696–700, 2011.

BOTSOGLU, N. A.; FLETOURIS, D. J.; FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKIA, E.; SPAIS, A. B. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. **Food Research International**, v. 36, 207–213, 2003.

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

DAL BOSCO, A.; GERENCSÉR, ZS.; SZENDRŐ, ZS.; MUGNAI, C.; CULLERE, M.; KOVÁCS, M. Effect of dietary supplementation of *Spirulina (Arthrospira platensis)* and Thyme (*Thymus vulgaris*) on rabbit meat appearance, oxidative stability and fatty acid profile during retail display. **Meat Science**, v. 96, p. 114–119, 2014.

DHAWAN, S.; VARMA, M.; SINHA, V. R. Applications of poly(ethylene oxide) in drug delivery systems. Part II. **Pharmaceutical Technology**, p. 82-96, 2005.

DHAWAN, S.; VARMA, M.; SINHA, V. R. High molecular weight poly(ethylene oxide)-based drug delivery systems. Part I: hydrogels and hydrophilic matrix systems. **Pharmaceutical Technology**, p. 73-81, 2005.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A Review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 2709-2728, 2006.

EL-NEKEETY, A. A.; MOHAMED, S. R.; HATHOUT, A. S.; HASSAN, N. S.; ALY, S. E.; ABDEL-WAHHAB, M. A. Antioxidant

properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. **Toxicol**, v. 57, p. 984–991, 2011.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 38–49, 2012.

FASSEAS, M.K.; MOUNTZOURIS, K. C.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M.; ZERVAS, G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1188–1194, 2007.

GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144–150, 2011.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1266–1274, 2016.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 930-940, 2010.

JAGADISH, R.; S. RAJ, B. Properties and sorption studies of polyethylene oxide-starch blended films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1572-1580, 2011.

JOYE. I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Production of nanoparticles by antisolvent precipitation for use in food systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 34, p. 109-123, 2013.

LINO, R. C. **Desenvolvimento de filmes de metilcelulose incorporados por nanopartículas de poli-ε-caprolactona/β-caroteno**. 2012. 139 f. Dissertação. (Mestre em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p. 187–195, 2001.

MATALANIS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p.1865–1880, 2011.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113 – 142, 2010.

MOZAFARI, M.R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A.; SUNTRES, Z.E.; SINGH, H.J. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal Science Food Agriculture**, v. 86, p. 2038–2045, 2006.

NAPOLI, E. M.; CURCURUTO, G.; RUBERTO, G. Screening the essential oil composition of wild Sicilian oregano. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 484–493, 2009.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806 – 1815, 2011.

NORONHA, C. M.; DE CARVALHO, S. M.; LINO, R. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 159, p. 529–535, 2014.

OYMACI, P.; ALTINKAYA, S. A. Improvement of barrier and mechanical properties of whey protein isolate based food packaging films by incorporation of zein nanoparticles as a novel bionanocomposite. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 1–9, 2016.

PADMAJA, S.; JAYAKUMAR, S.; BALAJI, R.; SUDAKAR, C.; KUMARAVEL, M.; RAJENDRAN, V.; RAJKUMAR, M.; RADHAMANI, A. V. Structural and optical properties of CdS/PEO nanocomposite solid films. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 16, p.1502–1507, 2013.

PARRIS, N.; COOKE, P. H., HICKS, K. B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4788-4792, 2005.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food**. Woodhead Publishing and CRC Press LLC, Boca Raton, 2001.

RHEIN, L. D.; SCHLOSSMAN, M.; O'LENICK, A.; SOMASUNDARAN, P. **Surfactants in personal care products and decorative cosmetics**. Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2007.

ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, p. 681–687, 2008.

RUSSO, M.; GALLETI, G. C.; BOCCHINI, P.; CARNACINI, A. Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare ssp. hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, 3741-3746, 1998.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S., LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118–122, 1997.

SUN, C-Z.; LU, C-T.; ZHAO, Y-Z.; GUO, P.; TIAN, J-L.; ZHANG, L.; LI, X-K.; LV, H-F.; DAI, D-D.; LI, X. Characterization of the doxorubicin-Pluronic F68 conjugate micelles and their effect on doxorubicin resistant human erythroleukemic cancer cells. **Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 2, p. 114-120, 2011

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. **Nanoparticulate Drug Delivery Systems**. PharmaceuTech, Inc, North Carolina, 2007.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 40-53, 2013.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 283-290, 2012.

ZHANG, S.; SUN, D.; FU, Y.; DU, H. Recent advances of superhard nanocomposite coatings: a review. **Surface and Coatings Technology**, v. 167, p. 113–119, 2013.

ZHONG, Q.; JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, 2380–2387, 2009.

CAPITULO 2

SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE OREGANO E TOMILHO E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS

Parte desse capítulo foi publicado em artigo:

DA ROSA, C. G.; MACIEL, M. V. O. B.; DE CARVALHO, S. M.; DE MELO, A. P. Z.; JUMMES, B.; DA SILVA, T. MARTELLI, S. M.; VILLETTI, M. A.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 481, p. 337–344, 2015.

Parte desse capítulo foi submetido para o periodico Food Science & Nutrition, e encontra-se em processo de revisão.

RESUMO

Os óleos essenciais de orégano e tomilho são antioxidantes e antimicrobianos naturais, ricos nos monoterpenos fenólicos timol e carvacrol. Entretanto, a eficácia desses compostos depende da sua preservação e biodisponibilidade, sendo este o grande obstáculo, já que estes compostos são suscetíveis à degradação durante o processamento dos alimentos. Diante disso, o objetivo desse trabalho é desenvolver nanopartículas carregadas com óleos essenciais. As nanopartículas carregadas com timol e carvacrol e os óleos essenciais foram avaliadas em relação à estabilidade no armazenamento (4 °C e 20 °C) durante 90 dias quanto à atividade antioxidante, eficiência de encapsulação, índice de polidispersão e potencial zeta; liberação controlada; e, atividade antimicrobiana. A morfologia foi avaliada através de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura; propriedades térmicas por calorimetria diferencial de varredura e análise termogravimétrica e espalhamento de luz dinâmico. Nanopartículas carregadas com os compostos puros e os óleos essenciais revelaram estabilidade nas condições de armazenamento avaliadas, atividade antimicrobiana frente às bactérias estudadas, liberação controlada ao longo do tempo (50 % em 8 horas), sem a presença de *efeitos burst*, mostrando uma forte interação destes com o material de parede, e revelando a zeína como um bom revestimento. Os mecanismos de transporte variaram entre Fickiano e não Fickiano. As nanopartículas carregadas apresentaram características distintas aos óleos essenciais e aos compostos puros não encapsulados, sendo comprovada pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica. Comparando os resultados de espalhamento de luz dinâmico e microscopia eletrônica de transmissão, pode-se dizer que os resultados de tamanho de partícula apresentam concordância, levando em consideração as diferenças de métodos de análises de cada técnica.

Palavras-chave: Nanopartículas. Zeína. Óleos essenciais.

ABSTRACT

The essential oils of oregano and thyme are antioxidants and natural antimicrobials, rich in phenolic thymol and carvacrol monoterpenes. However, the effectiveness of these compounds depends on their preservation and bioavailability; being this the major obstacle since these compounds are susceptible to degradation during processing of food. Thus, the aim of this work is to develop nanoparticles loaded with essential oils. Nanoparticles loaded with carvacrol and thymol and essential oils were evaluated for stability in storage (4 ° C and 20 ° C) for 90 days for antioxidant activity, encapsulation efficiency, polydispersity index and zeta potential; controlled release; and antimicrobial activity. The morphology was evaluated by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy, thermal properties by differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis and dynamic light scattering. The nanoparticles loaded with pure compounds and essential oils showed stability in the evaluated storage conditions, antimicrobial activity against bacteria studied, controlled release over time (50% in 8 hours), without the presence of burst effects, showing strong interaction of them and the wall material, and showing that the zein is a good loading material. The transport mechanisms varied between Fickian and non-Fickian. The loaded nanoparticles showed distinct characteristics in relation to the essential oils and pure compounds not encapsulated, being proved by scanning electron microscopy techniques, transmission electron microscopy, differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis techniques. When comparing the results of dynamic light scattering and transmission electron microscopy, it can be said that the particle size results show agreement, taking into account the differences in technical analysis methods.

Keywords: Nanoparticles. Zein. Essential oil.

1 Introdução

O principal produto da extração do orégano (*Origanum vulgare* Linneus) e do tomilho (*Thymus vulgaris*) é o seu óleo essencial, de cor amarelo limão, estando presente na planta fresca em torno de 0,15 % a

0,40 % em massa. A composição química desses óleos é basicamente de compostos fenólicos timol e carvacrol, sendo esta bastante variável. Esses compostos são muito semelhantes estruturalmente, sendo isômeros de posição em relação ao grupo hidroxila (EL-NEKEETY et al., 2011; BONFANTI et al., 2012;).

Esses óleos essenciais apresentam propriedades antimicrobianas (GUARDA et al., 2011; DEL NOBILE et al., 2008), antioxidantes (CAMO et al., 2011; FASSEAS et al., 2007), antiinflamatórias (RIELLA et al., 2012) e as suas aplicações em produtos alimentares estão sendo cada vez mais difundidas como alternativa aos aditivos sintéticos (RAMOS, et al. 2012; GOVARIS, et al., 2010; MASTROMATTEO et al., 2010). O maior desafio para utilização desses compostos em sua forma convencional são suas características de instabilidade química, fato que limita sua atividade bioativa em longo prazo. Uma alternativa para prolongar e preservar suas características intrínsecas é a encapsulação, ou seja, é o aprisionamento desses compostos em matrizes poliméricas, mantendo a estabilidade química e promovendo a sua liberação no momento e na taxa desejada. A eficiência de encapsulação vai depender do método utilizado (ZHANG et al., 2014), do material de parede (HOSSEINI et al., 2013), e do tamanho da partícula (WU et al., 2012), o qual pode ser ajustado dependendo dos parâmetros de processo tais como o tipo de surfactante utilizado ou método de obtenção.

O método de nanoprecipitação, desenvolvido por Fessi e colaboradores (1989), apresenta inúmeras vantagens quando comparado aos demais sistemas de encapsulação, como rapidez, facilidade de utilização e simplicidade, além de permitir a produção de nanopartículas (100-300 nm) com distribuição estreita e unimodal. Esse sistema consiste em duas fases: fase solvente e a fase não solvente. A fase solvente é composta pelo material de revestimento utilizado, neste caso a zeína, e do composto ativo. A fase não solvente consiste de água e um surfactante hidrofílico (BILATI et al., 2005).

A formação das nanopartículas é instantânea, e todo procedimento é realizado em uma única etapa. Resumidamente, dois solventes que são miscíveis, tanto o polímero zeína quanto o composto ativo (óleo essencial) devem dissolver-se no primeiro (solvente), mas não no segundo sistema (não-solvente). A nanoprecipitação vai ocorrer por uma rápida dessolvatação, quando a solução do polímero for

adicionado ao não-solvente. No momento em que a solução com o polímero entra em contato com o não-solvente, há uma migração do solvente para o não-solvente, ocorrendo a precipitação do polímero, encapsulando imediatamente o composto ativo (ZHONG; JIN, 2009).

A zeína é uma prolamina do milho, rica nos aminoácidos prolina, leucina, glutamina e alanina, e devido ao caráter hidrofóbico destes aminoácidos, a zeína é solúvel em etanol em concentrações acima de 70 % (ELZOGHBY et al., 2012). Essas características de hidrofobicidade, conferem a zeína a capacidade de promover auto-associação na presença de solventes polares como a água. Esta auto-associação da zeína já foi utilizada para encapsular óleos essenciais como orégano e tomilho (PARRIS et al., 2005) e também timol e carvacrol (WU et al., 2012). Porém inexistem estudos sobre a estabilização de nanopartículas carregadas com óleos essenciais com surfactantes não-iônicos e também sobre o armazenamento das nanopartículas em solução.

O objetivo desta pesquisa foi preparar nanopartículas de zeína carregadas com os óleos essenciais de orégano e tomilho e seus componentes majoritários timol e carvacrol e avaliar suas atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, eficiência de encapsulação, liberação do princípio ativo, estabilidade durante o armazenamento. A encapsulação foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espalhamento de luz dinâmico (DLS), espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

2 Material e métodos

2.1 Material

Proteína zeína, timol, carvacrol, poloxamer (Pluronic F68) foram obtidos a partir da Sigma Aldrich. Folhas de orégano e tomilho adquiridas no comércio local.

2.2 Extração e caracterização dos óleos essenciais

Folhas de orégano e tomilho adquiridas do comércio local foram moídas e secas em estufa (45 °C) até peso constante. Posteriormente extraídas por arraste de vapor utilizando aparato Clevenger (GUENTER, 1948).

2.3 Identificação e quantificação dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises por CLAE foram realizadas utilizando um equipamento Shimadzu modelo (LC-20AT, Tóquio, Japão), equipado com um sistema controlador CBM - 20A, um sistema de bomba LC - 20AT, um detector de arranjo de fotodiodo SPD - M20A, CTO - 20A, e amostrador automático SIL - 20A. A análise foi realizada utilizando uma coluna Shim-pack BDS-Hypersil C18 (250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm de tamanho de partícula; Thermo Scientific, EUA), protegido por uma coluna de guarda (BDS Hypersil C18; 150 mm x 4,6 mm; 5 µm tamanho de partícula m; Thermo Scientific, EUA). A quantificação do timol e carvacrol foi realizada de acordo com Thompson e Carlson, (1989), em $\lambda = 275$ nm, com uma fase móvel de metanol:água (75:25) (v/v) com um fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A coluna analítica foi mantida a 50 °C, volume de injeção foi de 20 µL. Os dados foram armazenados e processados por um sistema de estação de trabalho LC (Tóquio, Japão).

O óleo essencial de orégano foi quantificado em relação ao seu conteúdo de timol e o óleo essencial de tomilho em relação ao conteúdo de carvacrol. As curvas de calibração da área do pico em função da concentração de timol e carvacrol foram lineares na gama de concentração de 0,0008-0,1 mg/mL. A equação de regressão da curva de calibração para o timol ($n = 3$) foi o seguinte : $y = 2.107x + 4124,3$ ($R^2 = 0,9995$) e para o carvacrol: $y = 2.107x + 19992$ ($R^2 = 0,9976$).

2.4 Preparações das nanopartículas

Nanopartículas de zeína carregadas com óleo essencial de orégano (NPT-orégano), timol (NPT-timol), tomilho (NPT-tomilho) e carvacrol (NPT-carvacrol) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, de acordo com Parris et al. (2005) e Zhong e Jin (2009). A solução de zeína foi preparada dissolvendo 20 mg.mL⁻¹ de zeína em 10 mL de uma solução aquosa de etanol (85 % v/v), sendo

mantida sob agitação magnética durante 15 h. Posteriormente 100 mg dos compostos puros e de cada óleo essencial foram adicionados nas soluções de zeína. As soluções de zeína contendo compostos puros e os óleos essenciais (10 mL) foram dispersas em 30 mL de solução aquosa de Pluronic F68 (1,5 % m/v) com homogeneização em Ultra Turrax (Modelo T25, IKA-Works, Inc., Cincinnati) a 3000 rpm por 3 minutos. O etanol foi evaporado em capela com exaustão por 15 h.

2.5 Estudo de estabilidade físico-química

A estabilidade físico-química das NPT-orégano, NPT-timol, NPT-tomilho, NPT-carvacrol e da amostra controle (NPT-vazia) foi estudada em duas temperaturas diferentes (6 ± 2 e 20 ± 5 °C) por um período de 90 dias. As amostras foram armazenadas em vidros âmbar de 30 mL e analisadas quanto à eficiência de encapsulação, atividade antioxidante, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta nos tempos de 1, 30, 60 e 90 dias.

2.5.1 Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação foi definida pela diferença entre o conteúdo de composto ativo livre (não encapsulado) pelo conteúdo que foi aprisionado dentro da matriz polimérica (encapsulado), de acordo com a metodologia descrita por de Carvalho et al. (2013). A concentração de timol e carvacrol livre foram determinadas utilizando o método de separação de membrana com Ultra Amicon Filtros Centrífugos com uma membrana 30k Ultracel (Millipore, Irlanda). As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 30 min, o timol e o carvacrol não encapsulados permearam na membrana filtrante, e os compostos encapsulados permaneceram retidos na unidade de filtro. Os compostos não encapsulados obtidos no filtrado foram analisados e quantificados por CLAE, conforme descrito no item 2.3. A eficiência de encapsulação dos óleos essenciais de orégano e tomilho foi expressa em timol e carvacrol respectivamente (Equação 1).

$$EE\% = 100 - \left(\frac{\text{óleo essencial livre}}{\text{óleo essencial inicial}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

2.5.2 Determinação da atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante (AA) foi determinada pela capacidade dos compostos presentes nas amostras em inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1998). Para avaliar a atividade antioxidante, 500 µL de cada formulação de nanopartícula foram suspensos em 500 µL de etanol (85 %), a dispersão foi sonicada durante 30 min, e mantida em repouso por 15 hs, posteriormente 100 µL do sobrenadante foram adicionados a 3,9 mL de DPPH (0,1 mmol.L⁻¹) e analisados após 60 min em espectrofotômetro Hitachi, L-1800 (Tóquio, Japão), em comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (PI) do radical DPPH (Equação 2).

$$PI = \frac{(Abs\ inicial - Abs\ final)}{(Abs\ inicial)} \quad \text{Equação 2}$$

2.5.3 Determinação do tamanho da partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ)

Z-ave, IP e ζ (mV) das nanopartículas carregadas e vazias foram obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz (DLS), utilizando um equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As amostras foram diluídas apropriadamente com água filtrada Milli-Q®, e as medições foram realizadas a 25 °C a um ângulo de 173°. Para as medições, as amostras foram colocadas em célula de eletroforese.

2.6 Determinação da atividade antibacteriana das nanopartículas

A atividade antibacteriana das nanopartículas carregadas e vazias foi testada contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 2593, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica subsp. enterica serovar. typhimurium* ATCC 14028 através do ensaio de difusão em poços, como descrito por Cintas et al. (1995) com algumas modificações (BENDJEDDOU et al., 2012). Foram inoculados, em profundidade, 1 mL de cada cultura teste com cerca de 10⁸ UFC/mL (Mc Farland 0,5) em Agar apropriado (BHI, TSA, Ágar nutriente). Após solidificação do meio, foram preparados, de forma estéril, poços com 6 mm de diâmetro. Em seguida, 100 µL da

solução das nanopartículas foram vertidos em cada poço. As placas foram pré-incubadas a 4 °C por 2 h para permitir a difusão total do sobrenadante, e incubadas a 37 °C durante 24 h. A atividade antibacteriana foi avaliada por medição do diâmetro das zonas de inibição (mm) em torno dos poços.

2.7 Estudos de liberação

O perfil de liberação foi conduzido em solução tampão McIlvaine (ácido cítrico - fosfato de sódio), de acordo com o método de Luo et al. (2012). Resumidamente, (1 mL) das nanopartículas foram incubados em 350 mL de tampão (pH 7,4) utilizando uma membrana de diálise. As amostras foram coletadas durante 72 horas, sendo que nas primeiras 8 hs foram retiradas alíquotas a cada hora e, posteriormente a cada 12 horas. As alíquotas foram filtradas e, analisadas por CLAE, conforme descrito no item 2.3.

A cinética de liberação e dissolução foi avaliada com o intuito de investigar a influência da morfologia dos sistemas na liberação in vitro do timol e carvacrol, bem como a indicação do tipo de transporte e os mecanismos envolvidos nesse processo, seguindo o modelo cinético de Korsmeyer–Peppas (Equação 3).

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = Kt^n \quad \text{Equação 3}$$

Em que,

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = \text{fração do fármaco liberado no tempo } t$$

k = constante de liberação

t = tempo (h)

n = indicação do tipo de transporte

2.8 Determinação do espalhamento de luz dinâmico

As medidas de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas em um ângulo fixo de 90°, no espectrômetro de espalhamento de luz Brookhaven Instruments Corporation (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-9000), com laser de He-Ne (comprimento de onda de 637

nm e potência de 35 mW) como fonte de radiação. O raio hidrodinâmico (R_h) das nanopartículas e a curva de distribuição dos tempos de relação, $A(\tau)$, foram obtidos a partir da análise da função de autocorrelação temporal da intensidade de luz espalhada. As funções de autocorrelação foram tratadas aplicando-se a transformada inversa de Laplace utilizando-se o algoritmo REPES (Regularized Positive Exponential Sum), incorporada ao programa Gendist (Schillh, Brown, & Johnsen, 1994). A análise da função de autocorrelação fornece os valores das frequências, $\Gamma(1/\tau)$, de relaxação das partículas em solução e a partir deste foram calculados o coeficiente de difusão ($D = \Gamma/q^2$) e o raio hidrodinâmico através da relação de Stokes-Einstein ($R_h = kT/6\pi\eta D$).

2.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas por MET foram realizadas utilizando um microscópio JEOL modelo JEM -1011 (Tóquio, Japão) operando a 70 kV. As soluções contendo as nanopartículas foram previamente diluídas em água ultrapura Milli-Q®, e cerca de 5 μL de cada amostra foi depositada sobre grids de cobre revestidas com carbono (200 mesh). Após secagem à temperatura ambiente, as grids foram observadas no microscópio.

A morfologia das nanopartículas por MEV foi obtida usando microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6390LV (Tóquio, Japão). As soluções contendo as nanopartículas previamente secas em mini spray-drier modelo B290 (Büchi-Suíça), com temperatura de secagem 130 °C, bomba 25 %, aspiração 100 %, foram fixadas em um suporte metálico de cobre (*stubs*) com auxílio de uma fita dupla-face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica, EUA). A visualização foi realizada em aumentos de 300 a 2200 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 a 15 kV.

2.10 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi usada para avaliar a estabilidade e a degradação térmica das nanopartículas carregadas ou vazias em equipamento TGA-50 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para cada amostra (previamente secas, conforme descrito no

item 2.9), 10 mg foram aquecidas em cadinho de platina a uma razão de 10 °C/min entre 25 e 600 °C, com um fluxo de nitrogênio de 40mL. min⁻¹.

2.11 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas para as nanopartículas e amostra controle (não carregadas) em equipamento DSC-50 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão. Para cada amostra (previamente secas, conforme descrito no item 2.9), 10 mg foram aquecidas em panela de alumínio a uma razão de 10°C.min⁻¹ com uma rampa de aquecimento de -25 a 60 °C, resfriamento e posterior aquecimento a 150°C, com um fluxo de nitrogênio de 40mL min⁻¹.

2.12 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos como médias e desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa STATISTICA 7.

3 Resultados e Discussão

3.1 Estudo de estabilidade

O tamanho médio de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP), potencial zeta (ζ), eficiência de encapsulação (EE) e atividade antioxidante (AA) foram os parâmetros selecionados como referência para avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas em solução expostas a duas temperaturas (6 e 20 °C) durante 90 dias de armazenamento (Tabela 1). A formulação NPT-vazia foi estudada para avaliar o efeito da adição do óleo essencial na matriz de zeína.

Tabela 1 Estudo da estabilidade nas nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais, composto puro e controle.

Amostra/dia	Z-ave (nm)	IP	ζ (mV)	EE (%)	AA (%)
NPT-vazia					
Dia 1	153,9 ± 3,6 ^a	0,173 ± 0,007 ^a	31,73 ± 0,9 ^a	----	9,7 ± 0,8 ^c
Dia 30					
6 °C	154,2 ± 3,2 ^{aA}	0,147 ± 0,002 ^{aA}	30,7 ± 2,6 ^{aA}	-----	16,7 ± 2,3 ^{bB}
20 °C	159,5 ± 1,4 ^{aA}	0,149 ± 0,01 ^{aA}	26 ± 2,2 ^{aA}	-----	24,5 ± 3,9 ^{aA}
Dia 60					
6 °C	157,5 ± 4,0	0,136 ± 0,01	26,9 ± 1,4	-----	13,8 ± 3,2 ^{bcA}
20 °C	**	**	**	-----	17,5 ± 1,8 ^{bA}
Dia 90					
6 °C	162,2 ± 1,0	0,142 ± 0,02	19 ± 2,3	----	10,2 ± 5,7
20 °C	**	**	**	-----	**
Amostra/dia	Z-ave (nm)	IP	ζ (mV)	EE (%)	AA (%)
NPT-oregano					
Dia 30					
6 °C	165,6 ± 6,1 ^{aA}	0,165 ± 0,01 aA	21,4 ± 1,6 aA	71,2 ± 4,1 ^{aA}	22,2 ± 0,8 ^{bB}
20 °C	168,2 ± 7,8 ^{aA}	0,143 ± 0,005 aA	21,8 ± 0,8 aA	71,5 ± 2,1 ^{aA}	29,6 ± 0,7 ^{aA}
Dia 60					
6 °C	164,0 ± 2,7 ^{aA}	0,149 ± 2,7 aA	23,0 ± 4,0 aA	71,08 ± 0,09 ^{aA}	17,7 ± 0,9 ^{cA}
20 °C	175,4 ± 7,0 ^{aA}	0,150 ± 0,006 aA	21,8 ± 1,4 aA	69,9 ± 4,8 ^{aA}	16,6 ± 1,0 ^{dA}
Dia 90					
6 °C	167 ± 2,7 ^{aA}	0,151 ± 0,01 aA	23,1 ± 5,6 aA	73,4 ± 0,4 ^{aA}	16,2 ± 0,8 ^{cdB}
20 °C	159,6 ± 8,1 ^{aA}	0,152 ± 0,002 aA	26,6 ± 9,0 aA	74,0 ± 3,7 ^{aA}	25,3 ± 3,2 ^{bA}

Amostra /dia					
NPT-timol	Z-ave (nm)	IP	ζ (mV)	EE (%)	AA (%)
Dia 30					
6 °C	121,7 ± 9,2aA	0,236 ± 0,04aA	9,36 ± 0,2cB	91,9 ± 1,3aA	72,1 ± 6,8abB
20 °C	108,0 ± 6,4aA	0,248 ± 0,02aA	12,7 ± 0,5abA	91,6 ± 1,4aA	84,2 ± 0,1aA
Dia 60					
6 °C	122,8 ± 8,2aA	0,249 ± 0,01aA	9,38 ± 1,3cB	89,75 ± 1,6aA	59,3 ± 5,5cA
20 °C	111,7 ± 4,9aA	0,245 ± 0,02aA	12,8 ± 0,2abA	92,8 ± 1,5aA	50,3 ± 3,2cA
Dia 90					
6 °C	118,9 ± 8,9aA	0,234 ± 0,01aA	9,3 ± 0,2cB	92,4 ± 0,5aA	62,5 ± 7,0bcA
20 °C	110,1 ± 9,3aA	0,235 ± 0,02aA	11,4 ± 0,5bcA	92,4 ± 1,5aA	61,7 ± 4,1bcA
NPT-tomilho	Z-ave (nm)	IP	ζ (mV)	EE (%)	AA (%)
Dia 30					
6 °C	145,9 ± 5,6abA	0,183 ± 0,01abA	25,1 ± 0,9aA	94,8 ± 0,2aA	23,3 ± 1,7ab
20 °C	148,4 ± 5,0abA	0,162 ± 0,01abcA	23,3 ± 2,5aA	94,5 ± 0,3aA	27,3 ± 1,7 ^a
Dia 60					
6 °C	151,1 ± 5,8abA	0,152 ± 0,01bcdA	23,6 ± 0,9aA	93,4 ± 0,4aA	19,4 ± 0,3abc
20 °C	155,9 ± 6,5aA	0,159 ± 0,01abcA	23,7 ± 1,2aA	92,5 ± 0,7aA	18,6 ± 0,3bc
Dia 90					
6 °C	156,4 ± 7,3aA	0,124 ± 0,01dA	23,1 ± 1,6aA	92,9 ± 0,2aA	21,9 ± 7,0abc
20 °C	154,3 ± 5,8abA	0,147 ± 0,01cdA	24,4 ± 0,3aA	93,9 ± 0,1aA	20,8 ± 3,1abc

Amostra/dia	Z-ave (nm)	IP	ζ (mV)	EE (%)	AA (%)
NPT-carvacrol					
Dia 30					
6 °C	119,9 ± 2,6 ^a A	0,244 ± 0,01aA	11,7 ± 0,6cB	99,8 ± 0,003aA	72,7 ± 4,7aA
20 °C	111,8 ± 0,6 ^a A	0,223 ± 0,02aA	13,9 ± 0,7bA	99,9 ± 0,005aA	76,2 ± 7,1aA
Dia 60					
6 °C	114,3 ± 8,9 ^a A	0,239 ± 0,03aA	11,0 ± 0,5cB	99,7 ± 0,02aA	61,0 ± 3,8bA
20 °C	110,2 ± 7,8 ^a A	0,244 ± 0,02aA	14,1 ± 0,3abA	99,8 ± 0,02aA	43,2 ± 0,5cB
Dia 90					
6 °C	112,5 ± 11,8 ^a A	0,225 ± 0,02aA	10,7 ± 0,9cA	99,9 ± 0,007aA	58,3 ± 3,8bA
20 °C	108,9 ± 5,7 ^a A	0,248 ± 0,03aA	11,3 ± 1,4cA	99,8 ± 0,02aA	53,0 ± 2,2bcA

^a Letras minúsculas diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes. Os resultados são expressos como médias de três determinações ± desvio padrão.

** Instável

----- medida não realizada

Z-ave: tamanho de partícula em nanômetros; IP: índice de polidispersão; ζ : potencial zeta em mV; EE: eficiência de encapsulação e AA: atividade antioxidante.

Os parâmetros estudados revelaram que as nanopartículas são estáveis nas condições estudadas. Somente as nanopartículas controle armazenadas sob 20 °C, após 2 meses de armazenamento, precipitaram, impossibilitando com isso a continuidade das análises.

Z-ave, IP e ζ são parâmetros primordiais na otimização de nanopartículas estáveis para aplicações nutricionais e médicas.

Ao avaliarmos o tamanho de partícula fatores como: natureza e concentração do polímero na fase orgânica, polaridade dos solventes, a natureza e proporção de fases internas / externas e a natureza são fatores essenciais na determinação do tamanho (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Nanopartículas com óleos essenciais de orégano e tomilho apresentaram tamanho de partículas superiores quando comparados aos compostos puros (timol e carvacrol), isso pode ser devido ao fato dos óleos essenciais das plantas (tomilho e orégano) não serem substâncias puras e conterem uma maior quantidade de compostos. Nanopartículas controle (vazias) apresentaram tamanho semelhante àquelas carregadas com óleos essenciais, esse fato pode ser explicado porque a presença dos óleos essenciais na dispersão desempenha função de tensoativo, impedindo que as partículas coalesçam e aumentem o tamanho (RHEIN et al., 2007). Esse fato foi observado claramente devido à instabilidade química apresentada por essas partículas que após o segundo mês de armazenamento impossibilitou a continuidade das análises devido à precipitação e separação de fases.

Nanopartículas carregadas com timol, orégano e carvacrol não variaram seu tamanho durante os 90 dias de observação, apenas NPT-tomilho apresentaram uma pequena variação durante o período avaliado.

O tamanho médio das nanopartículas variou entre 110 e 150 nm, nas duas temperaturas de armazenamento estudadas (6 e 20 °C), durante os 90 dias de avaliação. Valores reduzidos de diâmetro de partícula, como encontrado neste estudo em torno de 150 nm são fundamentais para a absorção e distribuição in vivo das suspensões. Wu, Luo e Wang (2012), estudando a obtenção de nanopartículas de zeína pelo método líquido-líquido carregadas com timol apresentaram resultados superiores em relação ao tamanho de partícula em torno de $269,4 \pm 32,9$ nm, podendo estar relacionado a ausência de surfactante na formulação.

Resultados de IP encontram-se abaixo de 0,3 em todas as nanopartículas estudadas revelando uma distribuição estreita de tamanho, e uma boa homogeneidade das soluções, durante o estudo de armazenamento, esses resultados estão de acordo com Wu, Luo e Wang (2012).

Medidas de potencial zeta (ζ , mV), dependem principalmente da natureza química do polímero, do agente estabilizante e do pH do meio (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Medidas de potencial zeta positivas são obtidas quando são usados polímeros catiônicos e agentes estabilizantes não-iônicos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As nanopartículas avaliadas no presente estudo, apresentaram valores de potencial zeta na faixa entre +9 e +30 mV, e a dispersão coloidal apresentou um pH de 2,8, confirmando a carga positiva da proteína, estando de acordo com resultados obtidos por Zou et al. (2012) em nanopartículas de zeína carregadas com proantocianidinas.

De uma forma geral, o potencial zeta avalia a estabilidade das dispersões coloidais em suspensão seguindo a regra de que os valores de potencial zeta maiores do que ± 30 mV indicam partículas altamente carregadas (negativa ou positivamente), proporcionando dispersões fisicamente estáveis devido à repulsão eletrostática imposta pelas cargas (MEHNERT; MÄDER, 2012).

Como os resultados de potencial zeta não dependem apenas do tipo de estabilizante utilizado, mas também do pH do meio e do tipo de polímero, no presente estudo um surfactante não iônico que confere estabilidade ao provocar um impedimento estérico, sua presença na camada externa da nanopartícula pode acarretar uma diminuição do valor de potencial zeta devido a modificações no plano de cisalhamento da partícula. Assim, não apenas a carga do surfactante justifica a manutenção da dispersão dentro da faixa de estabilidade teórica (MEHNERT; MÄDER, 2012).

Para a determinação da eficiência de encapsulação nos óleos de orégano e tomilho, a mesma foi expressa em relação ao conteúdo de timol para orégano e carvacrol para o tomilho. A concentração de timol no óleo de orégano foi de $9,5 \pm 0,4$ mg de timol/100 mg de óleo e a concentração de carvacrol no óleo de tomilho foi de $6,4 \pm 0,9$ mg de carvacrol/100 mg de óleo.

A eficiência de encapsulação é o principal parâmetro para avaliar a estabilidade de um composto encapsulado durante o seu armazenamento. No presente estudo durante os 90 dias de observação e nas duas temperaturas avaliadas ocorreram pequenas variações no conteúdo de timol e carvacrol das nanopartículas, mostrando uma forte interação dos óleos essenciais com a zeína, revelando ser um bom material de parede. Além disso, o método de encapsulação por nanoprecipitação mostrou-se muito eficiente, pois possibilita o armazenamento das nanopartículas em solução facilitando o manuseio e aplicação destas em produtos alimentícios. NPT-tomilho apresentaram melhores resultados de EE quando comparadas com as NP-orégano.

A eficiência de encapsulação pelo método de nanoprecipitação depende de alguns fatores determinantes como: tipo de revestimento utilizado, da interação deste com o composto ativo, natureza química do composto ativo e sua polaridade. Desta forma a eficiência de encapsulação em compostos hidrofílicos pode atingir valores máximos de 10 %, e em casos de compostos lipofílicos esses resultados podem ser superiores a 70 % (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Estudos realizados por Wu, Luo e Wang (2012) sobre carregamento do timol nas matrizes de zeína pelo método líquido-líquido obtiveram EE em torno de 90 %, exatamente como no presente estudo. Hosseini et al. (2013) ao encapsular óleo de orégano (rico em timol) na presença de quitosana obteve eficiência de encapsulação de 24%.

As nanopartículas carregadas com os óleos essenciais apresentaram capacidade de inibir o radical DPPH durante o tempo de estudo. Após 30 dias de análise, pode se observar um aumento da AA das NPT, isso pode ser explicado pelo fato das nanopartículas permanecerem em solução durante a estocagem podendo ocorrer um acúmulo de composto ativo (timol e carvacrol) na solução devido à liberação pelas nanopartículas para o meio com o decorrer do tempo. Os óleos essenciais apresentaram resultados inferiores de AA quando comparados aos compostos puros, isso pode ser explicado devido a melhor disponibilidade do timol e carvacrol para reagir com o radical DPPH, e pelo fato que os óleos essenciais sejam composto por uma matriz mais complexa. NPT-controle mostraram que a zeína também apresenta uma certa capacidade em inibir o radical DPPH, estando de acordo com Wu, Luo e Wang (2012).

3.2 Avaliações da atividade antimicrobiana

Através da análise do tamanho do halo de inibição (Tabela 2), foi possível observar a capacidade de inibição das nanopartículas com todos os microrganismos estudados.

Tabela 2 Atividade antimicrobiana das nanopartículas carregadas com os óleos essenciais e controle frente a diferentes microrganismos

Amostra	<i>Listeria</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>
	<i>Monocytogenes</i>	<i>Coli</i>	<i>enterica</i>	<i>aureus</i>
	ATCC 7644	ATCC 25922	ATCC 14028	ATCC 2593
NPT-vazia	-	-	-	-
NPT-oregano	++	+	+	++
NPT- timol	+++	+	+	+++
NPT-tomilho	++	+	+	++
NPT- carvacrol	+++	+	+	+++

Diâmetro médio dos halos de inibição em mm já subtraído o valor do diâmetro interno do poço: + 1mm; ++= 2-4mm, +++5-8 mm e - =ausência do halo de inibição

Estudos relatam que as bactérias gram-positivas são mais sensíveis aos óleos essenciais do que as bactérias gram-negativas. Estes resultados estão em concordância com o presente estudo sendo que as nanopartículas carregadas com os óleos essenciais na presença das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* apresentaram um maior halo de inibição quando comparado com as demais gram-negativas. A menor sensibilidade para bactérias gram negativas frente aos compostos contidos nas nanopartículas pode ser explicada pelo fato desses microrganismos apresentarem na sua membrana, uma camada externa lipopolissacarídica (LPS) limitando a difusão dos compostos hidrofóbicos. Os óleos essenciais apresentam capacidade de desintegrar essa membrana externa da bactéria gram-negativa, liberando o LPS, e assim aumentando a permeabilidade da adenosina trifosfato (ATP), na membrana citoplasmática e, alterando a permeabilidade passiva da

célula. Dessa forma é necessária uma maior concentração de agente antimicrobiano para obter o mesmo efeito obtido nas bactérias Gram-positivas (SMITH-PALMER et al., 1997; GUARDA et al., 2011).

Foi possível também observar uma maior atividade antimicrobiana dos compostos puros em relação aos óleos brutos (orégano e tomilho) estando estes resultados de acordo com os de atividade antioxidante neste mesmo estudo, revelando que a matriz complexa desses compostos pode interferir na liberação dos mesmos para o meio.

2.4 Estudos de liberação

A velocidade de liberação de princípios ativos a partir de sistemas nanoparticulados pode ser influenciada pela combinação de diversos fatores, tais como características da matriz polimérica (espessura, porosidade, capacidade de intumescimento e combinação de duas matrizes), tamanho das nanopartículas, localização e concentração do composto ativo no interior das partículas, das propriedades físico-químicas do fármaco e do polímero.

O perfil de liberação das nanopartículas carregadas com os óleos essenciais na presença da solução tampão, está apresentado na Figura 1. Os óleos essenciais apresentaram uma liberação controlada ao longo do tempo (em torno de 50 % em 8 horas), sem a presença de efeitos *burst*, mostrando uma forte interação destes com o material de parede, e revelando a zeína como um bom revestimento.

Hosseini et al. (2013) avaliaram a liberação de óleo de orégano aprisionado em nanoesferas de quitosana em diferentes concentrações, em apenas 3hs de observação, cerca de 82 % do composto ativo já havia sido liberado. Luo et al. (2013) estudaram a encapsulação de glicosinolatos (indole-3-carbinol and 3,3'-diindolilmetano), utilizando como material de parede uma combinação de zeína/carboximetil quitosana, obteve resultados inferiores aos apresentado no presente estudo, foi observado um acentuado efeito *burst* em apenas 0,5 h onde foi liberado 50% do seu composto ativo.

Estudos cinéticos foram conduzidos de acordo com o modelo de Korsmeyer–Peppas (Tabela 3), foi possível obter a indicação do tipo de transporte bem como os mecanismos envolvidos nesse processo, através de parâmetros obtidos pelos resultados de n e K , respectivamente.

NPT-orégano e timol apresentaram transporte característico de difusão anômala, nestes casos o mecanismo de difusão é uma

combinação entre Fickiana e não Fickiana onde o valor de n (Equação 3) está entre 0,5 e 1,0 ($n=0,5265$ e $n=0,6451$), respectivamente para orégano e timol. Difusão anômala ocorre quando as taxas de difusão e relaxamento do polímero são comparáveis. NPT-carvacrol apresentou comportamento classificado como super transporte do tipo II ($n>1$), no transporte do caso II a taxa de difusão é muito maior que a taxa de relaxamento do polímero. NPT-tomilho apresentou valores de $n=0,3207$, porém não são descritos na literatura mecanismos de transporte para valores de n menores do que 0,5. Mas de certa forma se encaixa na classificação de difusão Fickiana simples ($n=5$), onde a taxa de difusão é muito mais lenta do que o processo de relaxamento do polímero (CRANK, 1955; MASTROMATTEO et al., 2010).

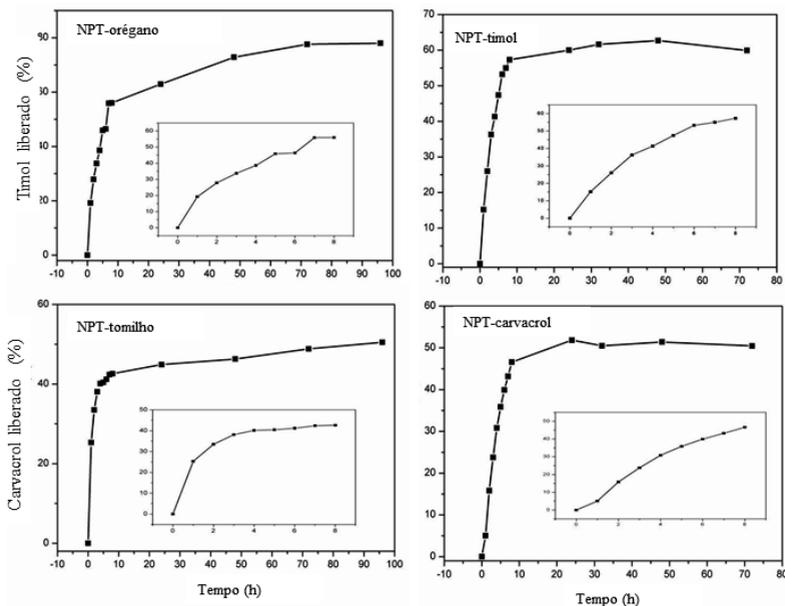
As constantes de velocidade de liberação (K) foram menores para os compostos puros, quando comparados com os óleos brutos indicando timol e carvacrol isolados apresentarem uma liberação mais lenta.

Coefficientes de correlação linear próximos a 1 foram obtidos para os sistemas nanoparticulados estudados.

Tabela 3 Constantes de velocidade de liberação (K), coeficiente de correlação linear (R^2) e o mecanismo de liberação (n) referente aos perfis de liberação dos sistemas nanoparticulados.

Amostra	Korsmeyer Peppas		
	R^2	K	n
NPT-orégano	0,9859	0,3194	0,5265
NPT-timol	0,9823	0,2847	0,6451
NPT-tomilho	0,9391	0,4804	0,3207
NPT-carvacrol	0,9522	0,1387	1,0295

Figura 1 Perfil de liberação dos compostos encapsulados.



3.4 Calorimetria exploratória diferencial

As análises de calorimetria exploratória diferencial são muito utilizadas para confirmar o aprisionamento de um composto ativo em uma matriz polimérica, bem como possíveis interações que ocorrem entre ambos, com supostos desaparecimentos ou deslocamentos de picos de fusão, cristalização ou outras transições térmicas.

Os termogramas das nanopartículas carregadas com os óleos essenciais, compostos puros (timol e carvacrol), nanopartícula controle e zeína são apresentados na Figura 2.

Nos termogramas de zeína foram realizadas duas corridas, a primeira de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ para apagar a história térmica, seguida de um resfriamento com posterior aquecimento até $150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

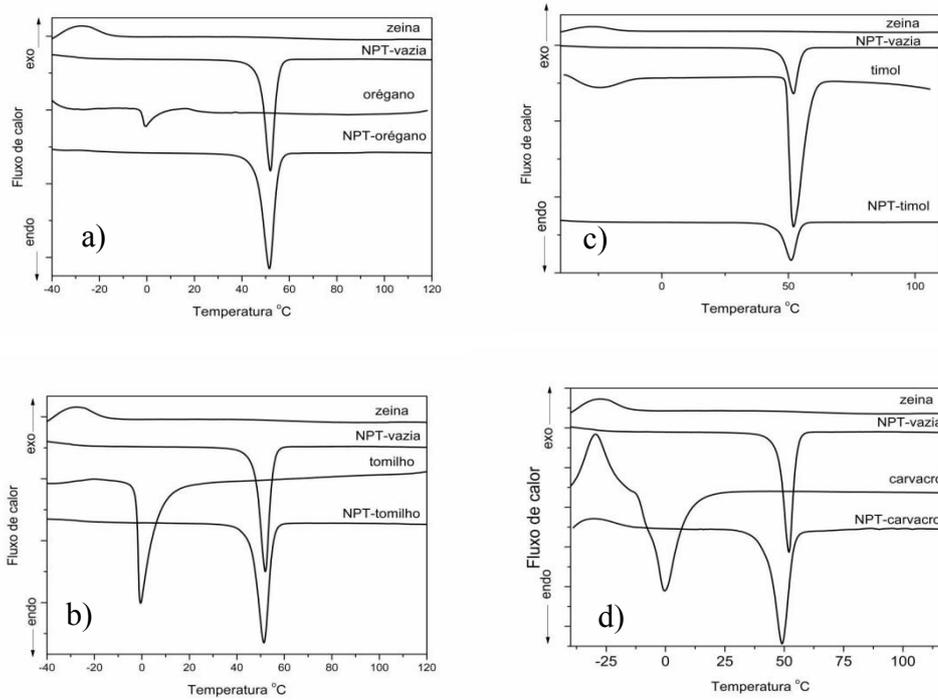
Nanopartículas controle (vazias), apresentaram um pico endotérmico de fusão em $51,96\text{ }^{\circ}\text{C}$, referente à presença do surfactante Pluronic. O pico do Pluronic repetiu-se nos termogramas das

nanopartículas, na mesma temperatura de fusão do timol, podendo mascarar o resultado, mas ao comparar os picos pode-se observar a semelhança. Podaralla e Perumal (2012), ao avaliar a encapsulação de zeína com 6,7-dihidroxycumarina, utilizando Pluronic como surfactante observou a presença do pico endotérmico em torno de 50 °C referente ao Pluronic. Li et al. (2014), ao avaliar nanopartículas de zeína/caseinato de sódio carregados com timol, observaram a supressão do pico cristalino do timol em 50 °C, com a encapsulação.

Comparando os termogramas do carvacrol e os óleos essenciais de orégano e tomilho puros com ponto fusão em torno de 0 °C, com os termogramas das nanopartículas carregadas com esses respectivos compostos observa-se ausência dessas transições nessas temperaturas, confirmando a encapsulação e a sua proteção.

A encapsulação se confirma pela ausência dos picos endotérmicos dos óleos essenciais e respectivos compostos puros estudados, ao observar os termogramas das nanopartículas carregadas, possivelmente devido a formação de um complexo com a zeína dentro da matriz polimérica, corroborando com os bons resultados de eficiência de encapsulação

Figura 2 Transições térmicas referentes a zeína, óleos essenciais: a) orégano e b) tomilho, compostos puros: c) timol e d) carvacrol, NPT-control, e nanopartículas carregadas.



3.5 Análises termogravimétrica (TGA)

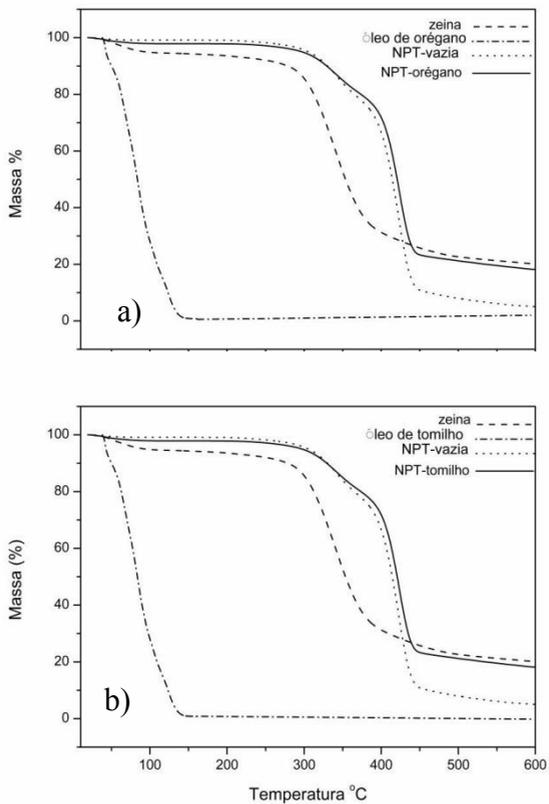
Análise termogravimétrica é uma técnica muito útil para avaliar a perda de peso de uma amostra em função da temperatura e para avaliar a sua estabilidade térmica. Conforme mostrado na Figura 3 e Tabela 4, os óleos essenciais apresentaram apenas uma etapa de perda de massa, enquanto as nanopartículas de zeína carregadas com os óleos essenciais apresentaram de duas a três etapas de perda de massa. A primeira perda de massa foi atribuída a perda de água adsorvida. A segunda e terceira perdas de massa foram atribuídas a degradação da estrutura da proteína.

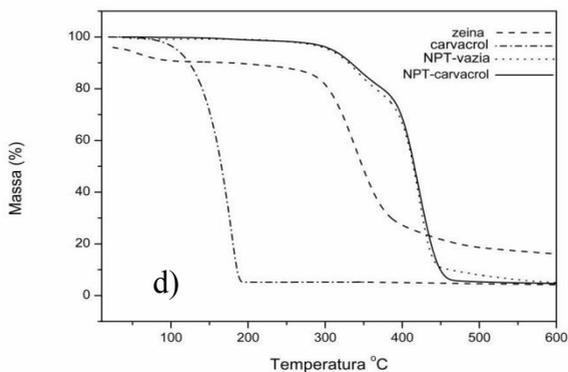
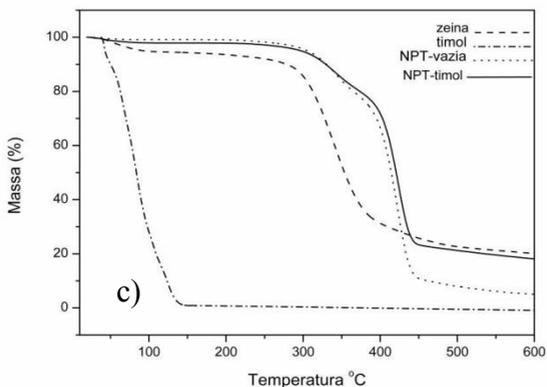
As nanopartículas carregadas com os óleos essenciais apresentaram comportamento semelhante entre si. Ao analisar o início da temperatura de fusão para os óleo de orégano e tomilho, timol e carvacrol em temperaturas baixas, entre 50 °C e 120 °C (RAMOS et al. 2012), pode ser observado que esses compostos quando na presença de zeína, deslocam essas temperaturas para valores superiores, confirmando a interação entre eles. A encapsulação também foi confirmada pela maior perda de massa dos compostos puros em relação às nanopartículas carregadas. Nanopartículas vazias também apresentaram comportamento semelhante, confirmando o aumento da resistência dos compostos encapsulados quando submetidos ao aquecimento.

Tabela 4 Transições térmicas referentes a zeína, óleos essenciais (orégano e tomilho), compostos puros (timol e carvacrol), NPT-controle, e nanopartículas carregadas.

Transições térmicas	zeína	NPT vazia	óleo de orégano	NPT orégano	timol	NPT timol	óleo de tomilho	NPT tomilho	carvacrol	NPT carvacrol
Ponto 1 (°C)	83,7	68,05	106,9	122,5	138,8	198,9	54,9	66,2	144	356,3
Ponto 2 (°C)	385,2	441,4	178,1	355,4	176,9	357,8	112	364,2	187,3	448,6
Ponto 3 (°C)	0	0	0	441,3	0	450,3	0	438,5	0	0
Perda de massa 1 (%)	5,6	0,8	99,07	0,5	98,1	1,6	98,4	2,1	94,8	19,1
Perda de massa 2 (%)	73,8	93,9	0	20,3	0	14,8	0	17,5	0	76,5
Perda de massa 3 (%)	0	0	0	72,8	0	77,9	0	62,4	0	0

Figura 3 Termogramas (TGA) referentes a zeína, óleos essenciais: a) orégano e b) tomilho). Compostos puros: c) timol e d) carvacrol, NPT-controle, e nanopartículas carregadas.





3.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

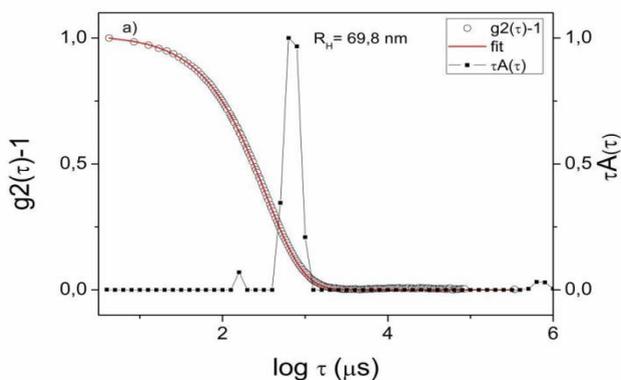
Pelas análises de DLS é possível medir as flutuações na intensidade da luz espalhada por um pequeno volume de uma solução na escala de microssegundos, estando diretamente relacionada ao movimento browniano do soluto. A Figura 4 ilustra a função de autocorrelação normalizada de intensidade do tempo $G(\tau)$ em 90° e a distribuição normalizada do tempo de decaimento $\tau_A(\tau)$ e na abscissa o tempo de decaimento $\log \tau$ (μs), onde (τ) é o tempo de espera entre duas leituras consecutivas, normalmente de poucos microssegundos e (A) o quadrado da média da intensidade da luz espalhada.

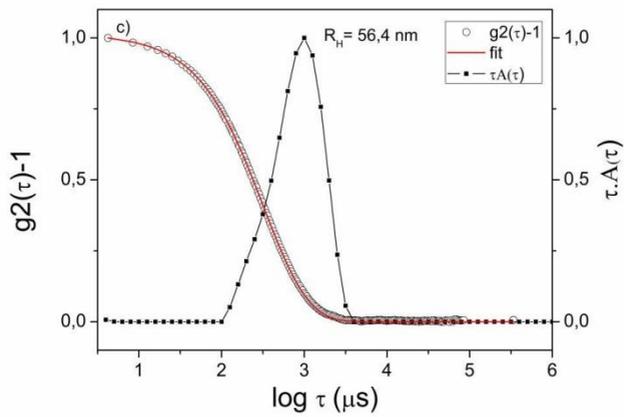
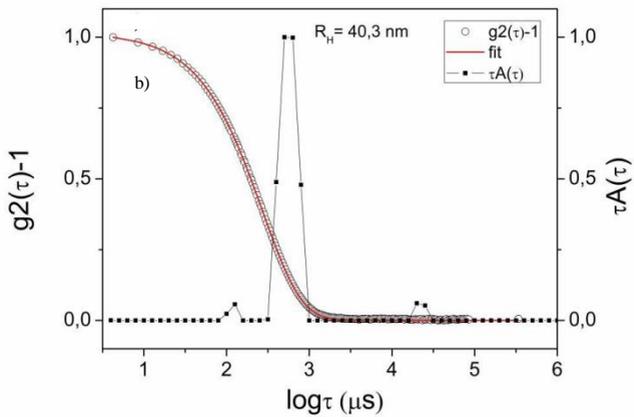
No caso de partículas pequenas, a função de auto-correlação entre as intensidades diminui mais rapidamente com o tempo, do que no caso de partículas grandes. A intensidade de espalhamento e a função de auto-correlação possuem um valor máximo. Com o passar do tempo, a intensidade de espalhamento terá cada vez menos correlação com a intensidade de espalhamento inicial, e a média sobre os produtos das intensidades, que é $G(\tau)$, tende a zero. Normalmente admite-se que $G(t)$ decai exponencialmente em função do tempo. Os equipamentos utilizados para medir tamanho de partículas são dotados de software que encontra a curva que melhor se ajusta aos pontos gerados pela função de autocorrelação, ou seja, encontra um valor apropriado para τ (SCHÄRTL, 2007).

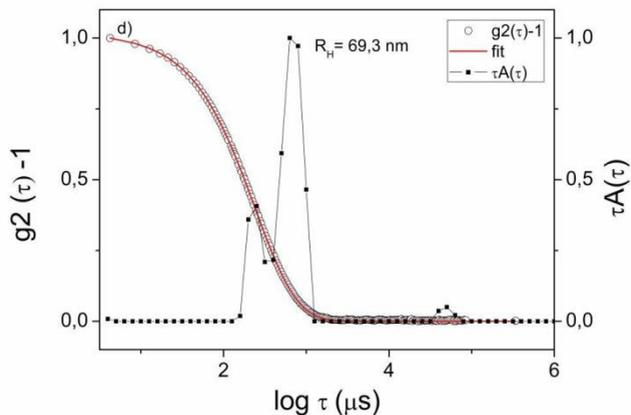
Pode ser observado que todas as nanopartículas apresentaram um comportamento monomodal, exceto para o carvacrol que apresenta dois diferentes grupos de tamanhos de partículas.

Comparando os resultados de raio hidrodinâmico (R_h) obtidos no equipamento da Brookhaven com o diâmetro hidrodinâmico obtido no equipamento Zetasizer Nano Series foi observada uma pequena diferença no tamanho da nanopartícula. Tamanhos maiores são encontrados no equipamento Zetasizer Nano Series o qual pode ser explicado pela dependência angular da função de autocorrelação (FAYAD et al., 2013).

Figura 4 Função de correlação e distribuição do tempo de decaimento das nanopartículas estudadas. a) NPT-orégano; b) NPT-timol; c) NPT-tomilho e d) NPT-carvacrol.





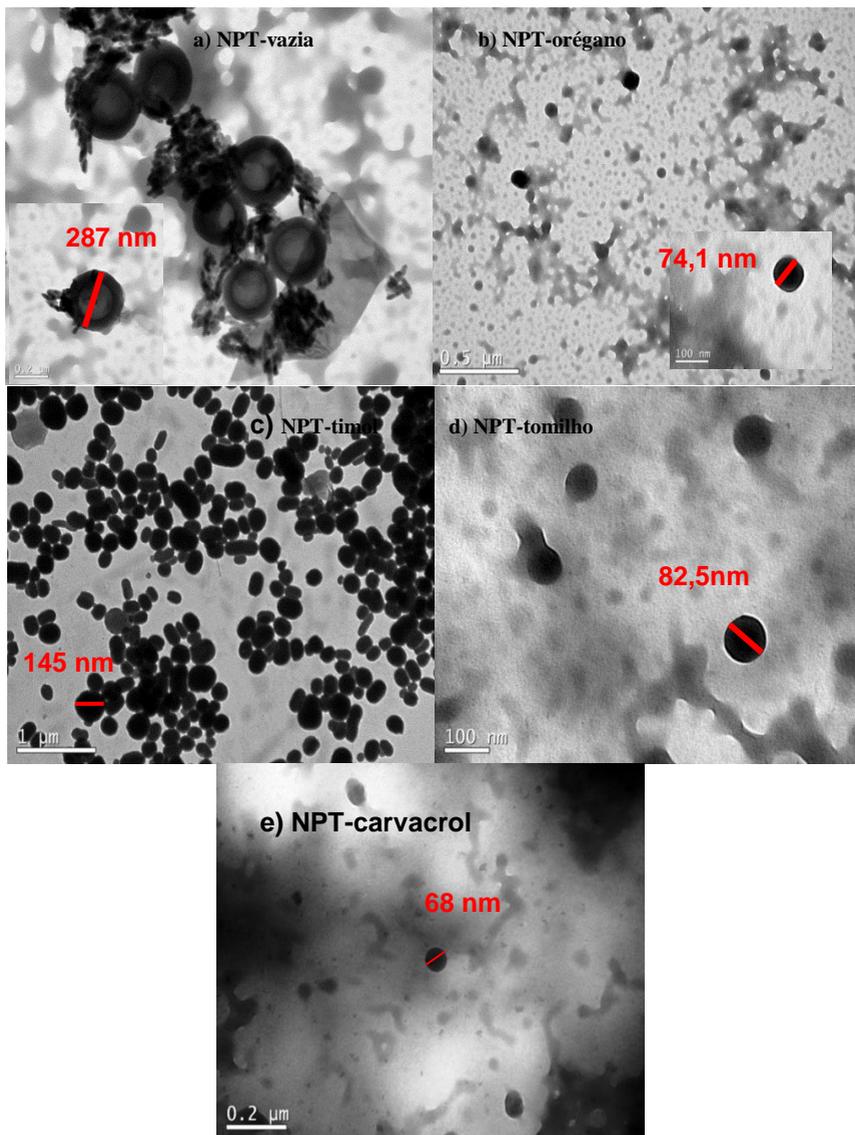


3.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Análises de MET foram realizadas na NPT-controle e nas nanopartículas carregadas (Figura 5). O diâmetro médio das partículas analisadas por TEM diferiram dos resultados obtidos pela espalhamento de luz dinâmico (DLS) medidos nos ângulo de 173° (Zetasizer Nano Series) e 90° (Brookhaven Instrument). Isso pode ser explicado pelo processo de preparação da amostra para a realização das análises de MET, como a remoção do solvente, podendo causar modificações que podem influenciar no formato e tamanho das nanopartículas (de CARVALHO et al., 2013). Esta diferença pode ser também atribuída ao achatamento das partículas no grid e ao menor número de partículas visualizadas por MET quando comparadas as técnicas de DLS.

Observando-se as micrografias obtidas da amostra controle (NPT-vazia), foi possível observar a presença de um núcleo vazio e menos denso quando comparado com as nanopartículas carregadas, comportamento semelhante foi observado por Gauche (2013), ao estudar nanopartículas de gliadina.

Figura 5 Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais e nanopartícula controle.

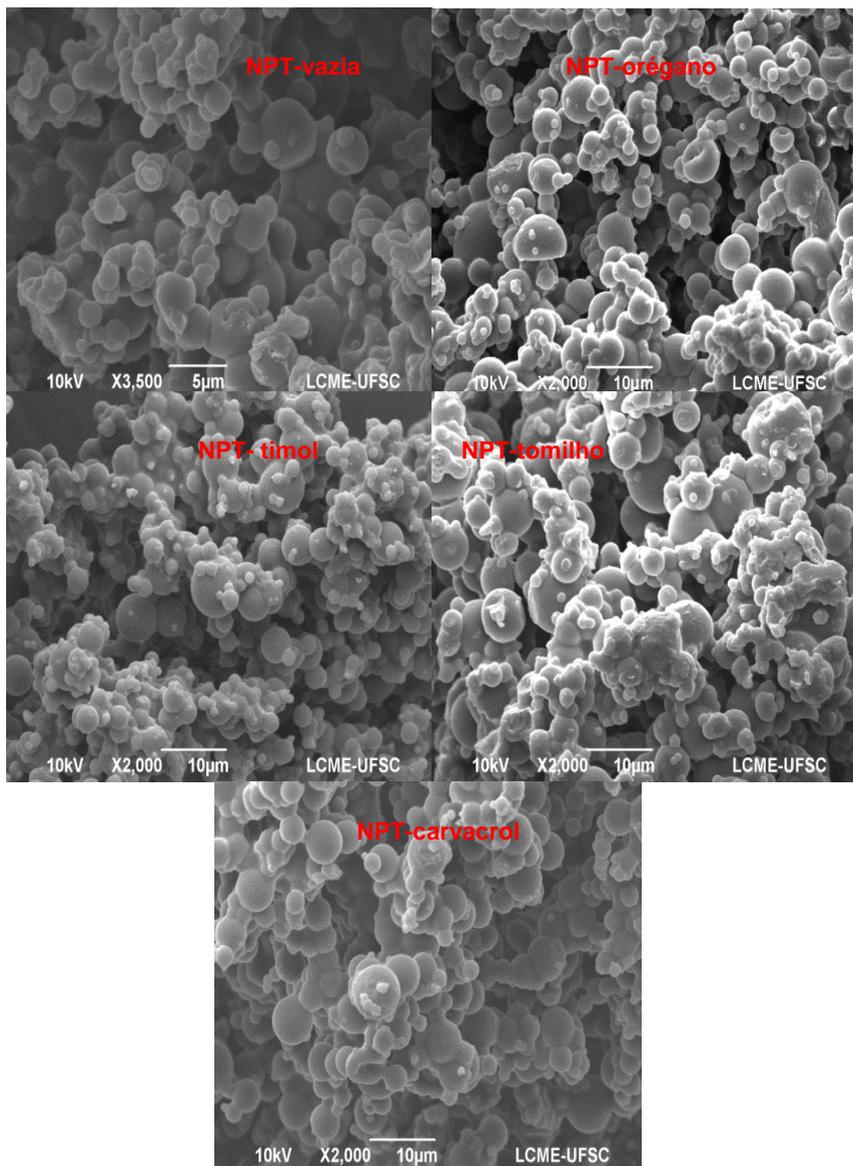


3.8 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

Análises de MEV foram realizadas na NPT-controle e nas nanopartículas carregadas (Figura 6). As nanopartículas em estudo foram secas em spray-drier para que fosse avaliada sua estrutura, propriedades de superfície e porosidade. Devido ao processo de secagem estas apresentaram tamanhos variados e superiores quando comparados às demais técnicas estudadas.

De uma forma geral, as partículas apresentaram ausência de material livre na superfície, com superfície lisa, compacta, com formato esférico e ausência de poros. As paredes externas não apresentaram fissuras ou rachaduras sendo muito importante para garantir uma maior proteção e retenção do agente encapsulado, e por se tratar de compostos altamente voláteis impede a permeabilidade dos mesmos.

Figura 6 Micrografias de Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais e nanopartícula controle.



4 Conclusão

No presente trabalho, nanopartículas de zeína carregadas com timol obtidas pelo método de nanoprecipitação foram caracterizadas. O método mostrou-se eficiente para obtenção de dispersões de nanopartículas estáveis. Os parâmetros de Z-ave (nm), IP, ζ (mV), AA e EE, revelaram que as nanopartículas são estáveis nas condições estudadas, possibilitando o seu armazenamento em dispersão durante os 90 dias de observação. Somente as nanopartículas controle armazenadas sob 20 °C, após 2 meses de armazenamento, precipitaram, impossibilitando com isso a continuidade das análises.

Nanopartículas carregadas com óleos essenciais apresentaram maior atividade antimicrobiana frente às bactérias gram-positivas do que as gram-negativas, através da observação do tamanho do halo de inibição.

As nanopartículas apresentaram uma liberação controlada ao longo do tempo (50 % em 8 horas), sem a presença de efeitos burst, mostrando uma forte interação dos compostos encapsulados com o material de parede. Os mecanismos de transporte variaram entre os encapsulados. NPT-timol e NPT-orégano apresentaram comportamento de difusão anômala, formando uma combinação entre Fickiana e não Fickiana. NPT-carvacrol apresentou comportamento classificado como super transporte do tipo II ($n > 1$), e NPT-tomilho apresentou valores de “n” menores que 0,5. Porém não são descritos na literatura mecanismos de transporte para esses valores.

As nanopartículas apresentaram características distintas aos óleos essenciais e aos compostos puros, sendo comprovado pelas técnicas de MEV, MET, DSC e TGA.

Comparando os resultados de tamanho de partícula obtidos por DLS e MET estes estão em concordância, levando em consideração as características inerentes de cada técnica.

Em resumo, do ponto de vista físico-químico, os resultados encontrados, indicam que as nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais são estáveis.

Referências

- BENDJEDDOU, K.; FONS, M.; STROCKER, P.; SADOUN, D. Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1543–1552, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSER, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- CHEN, Y.; YE, R.; LIU, J. Effects of different concentrations of ethanol and isopropanol on physicochemical properties of zein-based films. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 140–147, 2014.
- CINTAS, L. M.; RODRIGUEZ, J. M.; FERNANDEZ, M. F.; SLETTEN, K.; NES, I. F.; HERNANDEZ, P. E.; HOLO, H. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2643-2648, 1995.
- CRANK, J. **The mathematics of diffusion**. Oxford: Clarendon Press. p. 56-60, 1995.
- de CARVALHO, S. M.; NORONHA, C. M.; FLORIANI, C. L.; LINO, R. C.; ROCHA, G.; BELLETTINI, I. C.; OGLIARI, P. J.; BARRETO, P. L. M. Optimization of α -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 278– 285, 2013.
- FAYAD, S. J.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; BARRETO, P. L. M.; SOLDI, V.; MINATTI, E. Morphology of Soy Protein Isolate at Oil/Water and Oil/Air Interfaces. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1012-1017, 2013.
- GAUCHE, C.; SOLDI, V.; FORTA, S.; BORSALI, R.; HALILA, S. Xyloglucan-based diblock co-oligomer: Synthesis, self-assembly and steric stabilization of proteins. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1272– 1280, 2013.
- GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144–150, 2011.

- GUENTHER, E. **Determination of Essential Oil Content of Plant Material and Oleoresins**. In *The Essential Oils*, Van Nostrand: New York, 1948; v. I, p. 316-319.
- HOSSEINI, S. F.; ZANDI M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAZI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 50–56, 2013.
- HU, D.; LIN, C.; LIU, L.; LI, S.; ZHAO, Y. Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 545–552, 2012.
- LUO, Y.; WANG, T. T. Y.; TENG, Z.; CHEN, P.; SUN, J.; WANG, Q. Encapsulation of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability. **Food Chemistry**, v. 139, p. 224–230, 2013.
- MASTROMATTEO, M.; MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Advances in controlled release devices for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 591-598, 2010.
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113 – 142, 2010.
- PARRIS, N.; COOKE, P. H., HICKS, K. B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4788-4792, 2005.
- PODARALLA, S.; PERUMAL, O. Influence of Formulation Factors on the Preparation of Zein Nanoparticles. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 13, p. 919-927, 2012.
- RAMOS, M.; JIMÉNEZ, A.; PELTZER, M.; GARRIGÓS, M. C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 513–519, 2012.
- RHEIN, L. D.; SCHLOSSMAN, M.; O'LENICK, A.; SOMASUNDARAN, P. **Surfactants in personal care products and decorative cosmetics**. Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2007.
- SCHÄRTL, W. **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions**, Springer, Berlin, 2007.

SCHILLH, K.; BROWN, W.; JOHNSEN, R. M. Micellar Sphere-to-Rod Transition in an Aqueous Triblock Copolymer System. A Dynamic Light Scattering Study of Translational and Rotational Diffusion. **Macromolecules**, v. 27, p. 4825-4832, 1994.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118–122, 1997.

THOMPSON, R. D.; CARLSON, M. Determination of thymol in halothane anaesthetic preparations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 7, 1199-1206, 1989.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 283-290, 2012.

ZHONG, Q.; JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**. v. 23, 2380–2387, 2009.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE POLI (ÓXIDO ETILENO) INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADA COM MONOTERPENOS FENÓLICOS.

Resumo

Dispersões de nanopartículas de zeína carregadas com timol e carvacrol foram incorporadas nas concentrações de 30, 50 e 70 % (v/v) na solução filmogênica de poli (óxido de etileno) (PEO) a 3 % (m/v), com intuito de investigar os seus efeitos com relação às propriedades estruturais, mecânicas, óticas, reológicas, molhabilidade, térmicas, morfológicas e o potencial antioxidante. A interação entre as nanopartículas e o PEO foi confirmada pelas técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Microscopia Eletrônica de Varredura. Com a incorporação das nanopartículas foram observadas aumento da estabilidade térmica; acréscimo na atividade antioxidante; aumento da hidrofobicidade dos filmes até concentrações de 50 %, aumento do índice de consistência com o incremento das concentrações de nanopartículas nas soluções filmogênicas com comportamento não newtoniano; aumento da coloração e opacidade dos filmes e manutenção do efeito plastificante e luminosidade dos filmes de PEO. Os filmes contendo as nanopartículas e PEO atuaram como filtros à radiação ultravioleta e visível, quando comparados aos filmes sem as nanopartículas.

Palavras chaves: Filmes. Nanopartículas. Óleos essenciais.

Abstract

Dispersions of thymol and carvacrol loaded on zein nanoparticles were incorporated at concentrations of 30, 50 and 70% (v / v) in 3% (w / v) poly (ethylene oxide) (PEO) filmogenic solutions, in order to investigate their effects in the structural, mechanical, optical, rheological, wettability, thermal, morphological properties and the antioxidant potential. The interaction between the nanoparticles and PEO was confirmed by the techniques of Differential Scanning Calorimetry, Infrared Spectroscopy with Fourier Transform and Scanning Electron Microscopy. By nanoparticles incorporation were observed increase on the thermal stability, in the antioxidant activity and the hydrophobicity of the films up to concentrations of 50%. Also, increasing the consistency index by nanoparticles increasing in the filmogenic solution with non-Newtonian behavior; increase in color and opacity of the films and maintenance in the brightness and plasticizing effect of the PEO

film. The PEO films containing nanoparticles had ultraviolet and visible radiation filter function, when compared to films without the nanoparticles.

Keywords: films, nanoparticles, essential oil

1 Introdução

Plásticos convencionais como polietileno, polipropileno, policloreto de vinila, polietileno tereftalato são derivados do petróleo, e implicam em sérias preocupações ambientais. Polímeros biodegradáveis como poli (óxido de etileno) (PEO) representam uma alternativa frente aos materiais plásticos convencionais, podendo ser aplicado na indústria de alimentos (ATARES; CHIRALT, 2016)

O poli (óxido de etileno) é uma macromolécula linear que contém em sua cadeia a unidade monomérica $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)$ e grupamentos terminais $\text{R} = \text{OH}$ e $\text{R}' = \text{H}$. É obtido da polimerização por abertura do anel do óxido de etileno. Comercialmente, encontram-se disponíveis polímeros com massa molecular até $5.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$. O PEO é compatível com uma vasta gama de plasticizantes, compostos de baixa massa molecular e outros polímeros. Em temperatura ambiente o PEO é muito solúvel em água, e uma grande quantidade de solventes orgânicos como acetonitrila, diclorometano e tetrahidrofurano entre outros (DHAWAN; VARMA; SINHA, 2006b).

Polímeros como PEO, podem ser utilizados como filmes para revestimentos de alimentos, porém a sua alta solubilidade em água, limita suas propriedades de aplicação em embalagens de alimentos. Uma alternativa na melhoria dessas propriedades é a produção de filmes nanocompósitos de PEO (DHAWAN; VARMA; SINHA, 2006a).

Nanocompósitos poliméricos são materiais formados por uma matriz polimérica reforçada com uma pequena quantidade, em geral abaixo de 5 % em massa, de uma carga nanométrica. Revestimentos nanocompósitos compreendem normalmente duas fases: uma amorfa e uma cristalina, ou duas fases cristalinas (ZHANG et al., 2003).

Devido ao reforço fornecido pelas partículas nanométricas dispersas no material do biopolímero, ocorre uma acentuada melhoria nas propriedades das embalagens, em comparação com o polímero puro. Além disso, a incorporação de ingredientes biologicamente ativos, como óleos essenciais, presentes nas nanopartículas, conferem propriedades

funcionais desejadas para os materiais de embalagem (MARTUCCI et al. 2015).

Na literatura são vastos os estudos utilizando óleos essenciais em revestimentos biodegradáveis (MARTUCCI et al. 2015; HOSSEINI et al., 2015;), ou em plásticos derivados do petróleo (RAMOS et al., 2012; RAMOS et al., 2014) e também a utilização de PEO em blendas e filmes (WANG et al., 2001; PEREIRA et al, 2009; PEREIRA, et al, 2010; JAGADISH; RAJ, 2011; BOSTAN et al., 2014), no entanto inexistem trabalhos com filmes de PEO incorporado com nanopartículas poliméricas carregadas com óleos essenciais.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi desenvolver filmes de PEO, incorporar nanopartículas poliméricas de timol e carvacrol e caracterizar com relação às propriedades físico-químicas, mecânicas, óticas, reológicas, molhabilidade, térmicas, estruturais, morfológicas e atividade antioxidante.

2 Material e Métodos

2.1 Material

Proteína zeína, timol, carvacrol, poloxamer (Pluronic F68), sorbitol e poli (óxido de etileno) - massa molar média de 10^6 g.mol^{-1} , utilizados foram da Sigma Aldrich.

2.2 Preparação das nanopartículas de zeína carregadas com timol e carvacrol

Nanopartículas de zeína carregadas com timol (NPT-timol), e carvacrol (NPT-carvacrol) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, de acordo com Parris et al. (2005) e Rosa et al (2015) (conforme descrito no capítulo 2). A solução de zeína foi preparada dissolvendo 20 mg.mL^{-1} de zeína em 10 mL de uma solução aquosa de etanol (85 % v/v), sendo mantida sob agitação magnética durante 15 h. Posteriormente 100 mg dos óleos essenciais foram adicionados nas soluções de zeína. As soluções de zeína contendo os óleos essenciais (10 mL) foram dispersas em 30 mL de solução aquosa de Pluronic F68 (1,5 % m/v) sob homogeneização em Ultra Turrax (Modelo T25, IKA-

Works, Inc., Cincinnati) a 3000 rpm por 3 minutos. O etanol foi evaporado em capela com exaustão por 15 h.

2.3 Preparação dos filmes

Os filmes foram preparados pelo método de casting. As soluções aquosas de PEO (3 % m/v) e soluções de nanopartículas de timol e carvacrol nas proporções de 100/0 (PEO puro); 70/30; 50/50 e 30/70 (v/v) respectivamente, doravante chamadas de soluções de 30, 50 e 70 % (v/v). As soluções filmogênicas foram mantidas sob agitação magnética por 5 horas a 20 °C, para perfeita homogeneização. Os filmes foram preparados colocando-se 10 g das soluções filmogênicas em placas de Petri de poliestireno (10 cm de diâmetro) até completa evaporação do solvente, em estufa a vácuo (Modelo TE-395, Tecnal), sob abrigo da luz, a temperatura de 25 °C.

2.4 Medidas de espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi medida utilizando o micrômetro digital DIGIMESS 110.284 (São Paulo, Brasil) com divisões de 0,01 mm e capacidade de leitura de 0-25 mm. As medidas de espessura foram tomadas aleatoriamente em 5 locais dos corpos de provas em cada replicata.

2.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes, tensão máxima e módulo de elasticidade ou módulo de Young foram obtidos usando o texturômetro TA.TX2-Plus (Stable Micro Systems - Inglaterra), controlado pelo software Exponent Stable Micro System, com célula de carga de 50 kgf, conforme o método ASTM D882-12 (ASTM, 1995), que compreende a determinação das propriedades de tensão ou tração de plásticos em forma de folhas delgadas, incluindo filmes, com espessura menor do que 1,0 mm. As dimensões dos corpos de prova foram de 50 mm de comprimento e 25,4 mm de largura. Foram efetuadas aproximadamente 10 repetições de cada amostra. Antes das leituras, as amostras foram equilibradas durante uma semana a umidade relativa de 57 %, em dessecador com solução saturada de brometo de sódio (NaBr) a 25 ± 2 °C. As medidas foram efetuadas dentro de um tempo médio de

5 minutos para que as condições de temperatura e umidade relativa do ar não interfiram nos resultados experimentais.

2.6 Determinação do ângulo de contato

O ângulo de contato dos filmes foi obtido a 20 °C utilizando o equipamento OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha), com sistema processador de imagem de alta resolução Data Physics Instruments. A temperatura dos ensaios foi ambiente (20 °C) e o volume dos líquidos depositados sobre a superfície de cada filme foi de 5 µL, 4 µL e 0,8 µL para água deionizada, formamida e diiodometano, respectivamente. As medidas do ângulo estático foram automatizadas e os dados apresentados correspondem ao valor da média final.

2.7 Determinação da energia livre superficial

A energia livre superficial e seus componentes (polar e dispersivo) nos filmes foram calculadas pelo modelo de Owens-Wendt, geralmente utilizado para sólidos com baixa energia superficial, tais como os polímeros. Esses pesquisadores provaram que a energia livre superficial total de um sólido, γ_S , pode ser expressa como a soma do componente dispersivo, γ_L^d , e polar, γ_L^p (Equação 1). A equação de Owens-Wendt (Equação 2) aplica os dados dos líquidos polares e não polares, com componentes dispersivos, γ_L^d , e polares γ_L^p conhecidos, da energia livre superficial total e do ângulo de contato, θ (JAMSHIDIAN et al., 2012).

$$\gamma_S^T = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad (\text{Equação 1})$$

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

onde γ_L é a tensão superficial do líquido.

Para esta medida, três diferentes líquidos, água deionizada ($\gamma^T = 72.8$ mN/m, $\gamma^d = 21.8$ mN/m, $\gamma^p = 51.0$ mN/m), diiodometano ($\gamma^T = 50.8$ mN/m, $\gamma^d = 50.8$ mN/m, $\gamma^p = 0$ mN/m) e formamida ($\gamma^T = 58.0$ mN/m, $\gamma^d = 39.0$ mN/m, $\gamma^p = 19.0$ mN/m) foram testados para cada filme.

2.8 Medidas de cor

A cor dos filmes foi determinada utilizando um colorímetro Minolta (CR 400; Minolta, Japão), de acordo com a escala de Hunter e CIE. Valores de cores L^* (luminosidade), a^* (verde-vermelho) e b^* (amarelo-azul) foram obtidos com três medições das amostras de filme, e uma placa de cor branca foi usada como padrão para a calibração. Diferença total de cor (ΔE_{ab}) foi calculada para o filme controle e o padrão, utilizando a Equação 3.

$$\Delta E_{ab} = \{ (\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 \}^{1/2} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: $\Delta a = a_{\text{controle}} - a_{\text{amostra}}$

$$\Delta b = b_{\text{controle}} - b_{\text{amostra}}$$

$$\Delta L = L_{\text{controle}} - L_{\text{amostra}}$$

2.9 Transmissão de luz e opacidade

Para as medidas de transmissão de luz e opacidade, os filmes foram recortados, em triplicata, em tamanhos retangulares ($5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) para que se encaixem em cubetas de quartzo. A transmissão de luz através dos filmes foi medida pela exposição dos filmes aos comprimentos de onda de 210 e 320 nm (região ultravioleta) e 500 e 620 nm (região visível), utilizando o espectrofotômetro UV-visível Hitachi modelo U-1800 (Tóquio, Japão). A opacidade dos filmes foi determinada de acordo com o método usado por Park, (2004) e colaboradores, através da leitura da absorbância dos filmes no comprimento de onda de 600 nm usando espectrofotômetro UV-visível Hitachi modelo U-1800 (Tóquio, Japão). A opacidade foi calculada através da Equação 4.

$$O = Abs_{600}/x \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: Abs_{600} representa o valor da absorbância em 600 nm e x a espessura dos filmes (mm). De acordo com esta equação, valores altos de O indicam menos transparência e maior o grau de opacidade. Uma cubeta vazia (controle) foi utilizada como referência.

2.10 Comportamento reológico das soluções filmogênicas

As medidas reológicas das soluções filmogênicas de PEO incorporadas por nanopartículas, assim como das soluções de PEO

foram realizadas em diferentes temperaturas 15, 25 e 35 °C em um Reômetro Brookfield RVDV-IIIICP, modelo de spindle do tipo SSA, SC4-27, equipado com um banho termostático para controle da temperatura, os dados foram computados utilizando o Software Rheocalc 32. Todas as amostras foram deixadas em repouso por 10 min depois de colocadas no porta amostras para equilibrar a temperatura e induzir o estresse de relaxamento. Medições de fluxo em estado estacionário foram realizadas para cada amostra em cada temperatura durante 20 min e os parâmetros reológicos (tensão de cisalhamento, taxa de deformação, viscosidade aparente) foram obtidos a partir do software. As curvas de fluxo experimentais foram ajustados para o modelo de Lei da Potência, dado pela Equação 5.

$$T = k(\dot{\gamma})^n \quad (\text{Equação 5})$$

T : tensão de cisalhamento (Pa)

k : índice consistência (Pa.sⁿ)

$\dot{\gamma}$: taxa de deformação

n : índice de comportamento do fluxo (adimensional).

2.11 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho (FTIR) foi realizada para observar as interações estruturais dos filmes de PEO incorporados com as nanopartículas. Os espectros no infravermelho foram obtidos na região entre 4500 e 500 cm⁻¹ com resolução de 1 cm⁻¹ utilizando módulo de refletância atenuada (ATR) em equipamento Perkin Elmer FTIR/NIR Spectrometer Frontier, com 40 varreduras e precisão de 4 cm⁻¹. Todas as leituras foram realizadas em temperatura ambiente.

2.12 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das nanopartículas por MEV foram obtidas usando microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6390LV (Tóquio, Japão). As amostras foram fixadas em um suporte metálico de cobre (*stubs*) com auxílio de uma fita dupla-face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica, EUA). A visualização foi realizada em aumentos de 300 a 2200 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 a 15 kV.

2.13 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi usada para avaliar a estabilidade e a degradação térmica dos filmes nanoparticulados e controle em equipamento TGA-50 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para cada amostra 10 mg foram aquecidas em cadinho de platina a uma razão de 10°C/min entre 25 e 600 °C, com um fluxo de nitrogênio de 40mL. min⁻¹.

2.14 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas para os filmes nanoparticulados e amostra controle em equipamento Multi-Cell DSC-TA instruments. Para cada amostra, 2 mg foram aquecidas em ampolas de MC-DSC a uma razão de 2 °C.min⁻¹ com uma rampa de resfriamento até -20 °C com posterior aquecimento até 140°C, e resfriamento até -20 °C, com um fluxo de nitrogênio de 2 mL min⁻¹.

2.15 Determinação da Atividade antioxidante (AA)

AA foi determinada pela capacidade dos compostos presentes nas amostras em inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1998). Para avaliar a atividade antioxidante, 100 mg de cada filme foram recortados em pequenas peças e agitados em vórtex durante 3 minutos com 5 mL de etanol 85 %. A mistura foi colocada em repouso durante 15 h a 25°C para extração do antioxidante e então novamente agitada por outros três minutos. Posteriormente 100 µL do sobrenadante foram adicionados a 3,9 mL de DPPH (0,1 mM) e analisadas após 60 min em espectrofotômetro Hitachi, L-1800 (Tóquio, Japão), em comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (PI) do radical DPPH (Equação 6).

$$\% PI = ((Abs\ inicial - Abs\ final)) / ((Abs\ inicial)) \quad (\text{Equação 6})$$

2.16 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos com médias e desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi

realizada pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa STATISTICA 7.0.

3 Resultados e Discussão

3.1 Determinação do ângulo de contato e da energia livre superficial

A Tabela 1 mostra ângulos de contato com a água, o diiodometano e a formamida, a energia livre superficial total e os componentes polar e dispersivo dos filmes de PEO puro e PEO/T-NP e PEO/C-NP.

PEO é um polímero que apresenta alta solubilidade em água, e em alguns solventes orgânicos como acetonitrila e diclorometano (DHAWAN; VARMA; SINHA, 2006b). Adição das nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais nos filmes de PEO apresentam tendência em diminuir essa polaridade, devido a hidrofobicidade da zeína e dos óleos essenciais.

A medida do ângulo de contato mostra a relação de polaridade das superfícies. Para ângulos menores do que 90° a superfície é hidrofílica e para maiores hidrofóbicas, quando utilizados líquidos polares, sendo esta relação inversa com líquidos apolares (NORONHA, 2014).

Dos resultados obtidos para o ângulo de contato dos filmes na presença de água como solvente foi possível observar um desvio desta teoria, pois a tendência seria o aumento da hidrofobicidade linearmente com adição das nanopartículas. No entanto nos filmes de PEO incorporados com as nanopartículas de timol, foi observado um aumento na hidrofiliabilidade quando foi adicionado 50 e 70 % de nanopartículas, e nos filmes adicionados com carvacrol, foi observado esse aumento somente com a adição de 70 % de nanopartículas. Comportamento semelhante foi obtido quando avaliado líquido de polaridade intermediária (formamida).

Nos filmes com concentração de 50 e 70 % de nanopartículas existe uma maior concentração do surfactante Pluronic. Esse comportamento é confirmado por estudos realizados por Qiu (2008) e colaboradores, revelando que o aumento na concentração de Pluronic reduz em até 10° o ângulo de contato, tornando as superfícies mais hidrofílicas. Noronha et al. (2014), ao incorporar nanopartículas de tocoferol utilizando o surfactante Pluronic em filmes de metilcelulose,

avaliou o decréscimo do ângulo de contato a medida que aumentava a concentração de nanopartículas.

Com o aumento da concentração das nanopartículas também foi observado um aumento do componente polar e redução do componente dispersivo, comprovando o aumento da hidrofiliicidade na superfície dos filmes.

Ao avaliar a interação do líquido diiodometano (apolar), observou-se um aumento do ângulo dos filmes incorporados com as nanopartículas quando comparado com o PEO puro, revelando uma modificação na superfície do filme de PEO puro com relação a sua polaridade. Corroborando com os resultados obtidos com os demais solventes, como o diiodometano apresenta caráter apolar, ao avaliar superfícies mais hidrofílicas, devido ao aumento do surfactante a tendência é o aumento do ângulo de contato.

A energia livre total também apresentou redução quando adicionado as nanopartículas em relação ao PEO puro. Essa diminuição na energia livre reduz a interação com outras substâncias.

Tabela 1 Ângulo de contato ($^{\circ}$), energia livre superficial (γ), componente dispersivo (γ^d) e componente polar (γ^p) dos filmes incorporados com PEO/T-NP e PEO/C-NP para os três diferentes líquidos.

Filme	Ângulo de contato ($^{\circ}$)			Owens-Wendt		
	Água	Diiodometano	Formamida	γ^T (mN/m)	γ^p (mN/m)	γ^d (mN/m)
PEO (controle)	65,6±0,4 ^c	43,2 ± 1,3 ^b	57,7±0,4 ^b	42,93	8,61	34,32
PEO/T-NP 30	106,7±0,3 ^a	58,1 ± 2,9 ^a	72,7±2,7 ^a	32,60	0,00	32,59
PEO/T-NP 50	85,2±0,9 ^b	48,4 ± 0,1 ^{ab}	69,06±0,7 ^{ab}	34,65	3,63	31,02
PEO/T-NP 70	84,0±4,0 ^b	57,8 ± 0,4 ^a	68,7±1,2 ^{ab}	32,44	5,33	27,11
PEO (controle)	65,6±0,4 ^c	43,2 ± 1,3 ^c	57,7±0,4 ^c	42,93	8,61	34,32
PEO/C-NP 30	105,7±0,03 ^a	57,5 ± 0,03 ^a	82,4±0,2 ^a	29,05	0,07	28,98
PEO/C-NP 50	101,3±2,1 ^a	49,5 ± 0,07 ^{bc}	74,5±0,7 ^b	33,39	0,23	33,16
PEO/C-NP 70	79,2±0,1 ^b	54,4 ± 0,7 ^{ab}	75,8±0,9 ^b	32,75	6,70	26,05

γ^T : energia livre superficial total; γ^d : componente dispersivo; γ^p : componente polar. Valores apresentados como média + desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisados pelo teste de Tukey.

3.2 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes de PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP foram avaliadas em relação aos parâmetros de Espessura, Módulo de Young ou módulo de elasticidade e tensão máxima, e estão apresentados na Tabela 2. Parâmetros como tensão na ruptura e alongação na ruptura não foram avaliados devido às características dos filmes em não romper devido à capacidade limitada do equipamento utilizado.

Os resultados de espessura dos filmes de PEO revelaram um aumento com adição das nanopartículas, isso pode ser explicado pelo aumento do teor de sólidos na matriz polimérica, corroborando com os resultados de morfologia, onde foi observado um aumento da espessura dos filmes na seção transversal, com a incorporação das nanopartículas.

O módulo de elasticidade (módulo de Young) é a relação linear entre a tensão aplicada e a deformação sofrida, e é determinado pela inclinação da curva de tensão vs. deformação na região elástica (coeficiente angular). Este é um parâmetro que caracteriza a rigidez de um material (CANEVAROLO, 2004).

Quanto maior o valor para o módulo de Young, maior é a resistência à deformação e rigidez, ou seja, o filme apresenta uma menor flexibilidade (ROTTA; BARRETO; MINATTI, 2011). Os filmes de PEO incorporados ou não com as nanopartículas apresentaram valores baixos para o módulo de elasticidade revelando alta flexibilidade dos mesmos. Esses resultados também podem ser associados à flexibilidade das cadeias de PEO, pois a presença destas moléculas tende a diminuir a rigidez dos filmes (ZIVANOVIC; DAVIDSON; KIT, 2010).

Tabela 2 Medidas de espessura, módulo de Young e tensão máxima dos filmes de PEO puro e incorporados com diferentes concentrações de nanopartículas.

Filme	Espessura(mm)	Módulo de Young (MPa)	Tensão máxima (MPa)
PEO (controle)	0,06±0,01 ^b	6,2±1,1 ^a	4,1±0,4 ^b
PEO/T-NP 30	0,08±0,01 ^a	7,1±1,7 ^a	4,1±0,4 ^b
PEO/T-NP 50	0,08±0,01 ^a	7,1±1,3 ^a	4,0±0,4 ^b
PEO/T-NP 70	0,09±0,01 ^a	6,4±0,4 ^a	5,1±0,8 ^a
PEO (controle)	0,06±0,01 ^b	6,2±1,1 ^b	4,1±0,4 ^b
PEO/C-NP 30	0,08±0,01 ^a	9,7±2,7 ^a	4,9±0,6 ^a
PEO/C-NP 50	0,08±0,01 ^a	7,5±0,5 ^b	4,9±0,2 ^a
PEO/C-NP 70	0,09±0,01 ^a	6,8±0,9 ^b	4,5±0,6 ^{ab}

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisados pelo teste de Tukey.

Os resultados de tensão máxima apresentaram valores baixos, com comportamento semelhante ao módulo de elasticidade devido ao caráter flexível característico dos filmes de PEO. Li (2010) e seus colaboradores ao avaliarem a tensão máxima de blendas entre quitosana e PEO, observaram que à medida que a concentração de PEO aumenta os valores de tensão máxima reduzem, corroborando com os resultados do presente estudo. Esse comportamento também é confirmado em estudos realizados por Bostan (2014) e seus colaboradores ao estudarem a tensão máxima de blendas de quitosana/peo/*levan*. Neste trabalho os valores de tensão máxima reduziram com o aumento da proporção de PEO na blenda.

Estudos realizados por Miro (2013) e colaboradores avaliaram as propriedades mecânicas de filmes de PEO e ciclodextrina. Os resultados de módulo de Young e tensão máxima ao analisar PEO puro (Massa molar média= 600 g/mol¹), foram em torno de 2,8 MPa e 4,7 MPa respectivamente, cabe ressaltar que a massa molar do PEO utilizado no presente estudo foi de 1.10⁶g/mol¹, sendo os resultados do módulo de Young próximos ao do presente estudo.

Há claramente um efeito reforçador na adição das nanopartículas à matriz polimérica. E esse efeito na tensão máxima decaiu com o aumento da concentração das nanopartículas nos filmes.

Tanto para a nanopartículas contendo timol quanto as contendo carvacrol. O fato das dispersões conterem surfactantes pode sugerir um efeito plastificante desse componente, sendo responsável pela diminuição do módulo de Young com o aumento das concentrações de nanopartículas nos filmes. No entanto, todos os filmes contendo nanopartículas apresentam módulo de Young mais elevado do que os filmes de PEO.

3.3 Comportamento reológico das soluções

As soluções filmogênicas foram avaliadas em relação ao seu comportamento reológico através da Lei de Potência, a partir da qual é possível obter os seguintes parâmetros reológicos: k (índice de consistência – Pa.sⁿ -) e n (índice de comportamento de fluxo – adimensional -) (Tabela 3). Foram avaliadas soluções filmogênicas em diferentes concentrações de nanopartículas, em diferentes temperaturas.

As soluções filmogênicas nas diferentes concentrações de nanopartículas e nas diferentes temperaturas apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$), sendo este comportamento característico de fluidos não newtonianos. Os fluidos com essa característica tendem a reofluidificar quando a taxa de deformação aumenta. Para fluidos não newtonianos os valores de k (índice de consistência), indicam o grau de resistência do fluido diante do escoamento, de modo que quanto maior o valor de k , mais consistente o fluido será. Esse comportamento é confirmado nas soluções filmogênicas incorporadas com as nanopartículas de carvacrol em que a amostra com maior adição de nanopartículas (PEO/T-NP 70), apresentou o maior índice de consistência. Nas soluções filmogênicas incorporadas de nanopartículas contendo timol esse comportamento é diferenciado, sendo que a incorporação de apenas 30 % de nanopartículas, já apresentou maior valor do índice de consistência.

Esse comportamento diferenciado das soluções filmogênicas incorporadas das nanopartículas de carvacrol, pode ser explicado pelo fato de apesar da aparência homogênea, o sistema possui partículas dispersas com formato irregular. Com o aumento da taxa de deformação muitas partículas dispersas podem se deformar alinhando-se em direção ao fluxo e facilitando o deslizamento, reduzindo a viscosidade (MACHADO, 2002).

De uma forma geral comparando o índice de consistência entre as soluções filmogênicas, este apresentou uma tendência a aumentar com a adição das nanopartículas.

Como ambas as amostras mostraram um comportamento pseudoplástico, apesar de ocorrer uma deformação das partículas dispersas inicialmente com o aumento da taxa de deformação, estas readquirem sua forma original fazendo com que a dispersão filmogênica tenda a um valor de viscosidade constante e definida novamente (MACHADO, 2002).

Ao avaliar as soluções filmogênicas nas temperaturas estudadas, o índice de escoamento não apresentou comportamento linear. De uma forma geral na temperatura de 15 °C para 25 °C ocorreu um decréscimo, seguido de um aumento quanto esta foi elevada para 35 °C. Essas características de índice de escoamento maior em temperaturas em torno de 35°C favorecem positivamente no processamento dos filmes, resultando em um menor gasto energético em manufaturamento, além disso, um material menos viscoso facilitando as condições de trabalho, como por exemplo, nas operações de sopro e calandragem.

Tabela 3 Resultados do índice de comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K), conforme modelo Lei de Potência, para soluções de filmes de PEO com diferentes concentrações de nanopartículas.

T (°C)	PEO controle		PEO/T-NP 30		PEO/T-NP 50		PEO/T-NP 70	
	K (Pa.s ⁿ)	n	K (Pa.s ⁿ)	n	K (Pa.s ⁿ)	n	K (Pa.s ⁿ)	n
15	6,6197±0,2 ^{ba}	0,641±0,01 ^{aA}	9,4670±0,6 ^{ca}	0,6354±0,007 ^{aa}	8,1888±0,6 ^{abA}	0,647±0,001 ^{aA}	6,7891±0,01 ^{abA}	0,629±0,2 ^{aA}
25	4,5226 ± 0,14 ^{cB}	0,657 ± 0,005 ^{aA}	5,6003 ± 0,22 ^{aC}	0,627 ± 0,004 ^{ba}	4,7589±0,05 ^{cbB}	0,660±0,003 ^{aA}	5,1634±0,07 ^{abA}	0,645±0,0009 ^{aA}
35	4,6932±0,5 ^{cB}	0,667±0,03 ^{aA}	7,4839±0,2 ^{ab}	0,614±0,009 ^{aA}	5,5519±0,007 ^{bcB}	0,645±0,006 ^{aA}	6,0461±0,04 ^{ba}	0,631±0,002 ^{aA}

T (°C)	PEO controle		PEO/C-NP 30		PEO/C-NP 50		PEO/C-NP 70	
	K (Pa.s ⁿ)	n	K (Pa.s ⁿ)	n	K (Pa.s ⁿ)	n	K (Pa.s ⁿ)	n
15	6,6197±0,2 ^{aA}	0,641±0,01 ^{aA}	4,9132 ± 0,1 ^{ba}	0,660 ± 0,01 ^{aA}	6,1155±0,1 ^{aA}	0,643±0,006 ^{ab}	6,6085±0,3 ^{aA}	0,637±0,01 ^{aAB}
25	4,5226 ± 0,14 ^{ab}	0,657 ± 0,005 ^{aA}	1,7989±0,3 ^{bb}	0,722±0,01 ^{ba}	2,2968±0,02 ^{bc}	0,684±0,002 ^{aA}	4,9236±0,04 ^{ab}	0,650±0,007 ^{aA}
35	4,6932±0,5 ^{bb}	0,667±0,03 ^{aA}	4,9266±0,6 ^{ba}	0,644±0,03 ^{aA}	4,9401±0,1 ^{bb}	0,635±0,01 ^{ab}	7,1188±0,2 ^{aA}	0,608±0,009 ^{ab}

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na linha e letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisados pelo teste de Tukey.

Coefficientes de correlação linear (R^2) próximo a 1 foram obtidos para os sistemas estudados.

3.4 Análises de cor

A Tabela 4 mostra os parâmetros de cor utilizando o sistema CIELAB para os filmes de PEO puro e PEO/T-NP e PEO/C-NP.

No sistema CIELAB o parâmetro L^* é relatado como a luminosidade da amostra e varia de 0 (preto) a 100 (branco), a^* representa as variações da cor entre o (-) verde e o (+) vermelho e b^* representa as variações da cor entre (-) azul e (+) amarelo (HUNTERLAB, 2012). Em relação ao parâmetro L^* , foi possível observar valores próximos a 100, aproximando da cor branca, sendo esta visualmente observada nos filmes de PEO com as nanopartículas incorporadas, ocorrendo a manutenção da luminosidade do PEO com a adição das nanopartículas. Ao analisarmos o parâmetro b^* , observamos valores positivos, sendo estes maiores quando incorporados as nanopartículas, isso é explicado pela presença das nanopartículas de zeína que apresentam uma coloração amarela por ser uma prolamina do milho. Observando o parâmetro a^* , os valores negativos tendem a cor verde, sendo esta cor absorvida em comprimentos de onda em regiões próximas ao amarelo, devido a presença da zeína no sistema.

Pode se dizer de forma geral que a adição das nanopartículas ao sistema filmogênico tornaram os filmes mais coloridos, devido ao aumento do parâmetro de ΔE_{ab} (NORONHA et al., 2014).

Tabela 4 Valores de cor dos filmes de PEO puro e incorporados com as nanopartículas.

Filme	Parâmetros de cor			
	L^*	a^*	b^*	ΔE_{ab}
PEO (controle)	92,44± 0,10 ^a	-1,10±0,02 ^a	13,76±0,2 ^c	
PEO/T-NP 30	92,56±0,3 ^a	-2,13±0,2 ^b	17,72±0,9 ^b	3,72±0,8 ^b
PEO/T-NP 50	91,98±0,07 ^b	-3,3±0,4 ^c	23,52±2,0 ^a	11,10±0,4 ^a
PEO/T-NP 70	91,87 ±0,14 ^b	-3,4±0,3 ^c	23,95±1,5 ^a	9,81±1,2 ^a
PEO (controle)	92,44± 0,1 ^a	-1,10±0,02 ^a	13,76±0,2 ^c	
PEO/C-NP 30	91,56±0,5 ^b	-3,31±0,4 ^{bc}	22,12±2,1 ^b	9,37±1,9 ^b
PEO/C-NP 50	92,03±0,4 ^{ab}	-2,98±0,5 ^b	21,83±2,6 ^b	9,48±1,6 ^b
PEO/C-NP 70	91,70±0,30 ^b	-3,85±0,4 ^c	26,48±2,4 ^a	14,08±1,1 ^a

Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisados pelo teste de Tukey.

3.5 Análises de transmissão de luz e opacidade

A tabela 5 mostra os valores de transmissão de luz nas regiões do UV (210 e 320 nm) e nas regiões do visível (500 e 620 nm) para os filmes de PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP.

A transparência está inversamente relacionada com a absorção/reflexão da luz. Um material não transparente pode absorver luz e/ou refletí-la. Quanto mais transparente for um material, menos luz é absorvida e/ou refletida por ele.

Os resultados obtidos para os filmes de PEO puro e incorporados com as nanopartículas de uma forma geral apresentaram este comportamento, baixa transmissão de radiação nas regiões do UV e visível. Um aumento no comprimento tanto na região do UV como na região do visível, fez com que aumentasse a proporção de radiação transmitida através da amostra, de modo geral os filmes contendo as nanopartículas atuaram como filtros à radiação ultravioleta e visível, quando comparados aos filmes de PEO

As matrizes poliméricas possuem capacidade de absorver luz na região do ultravioleta e em menor proporção na região do visível. O interesse em materiais opacos é de grande valia na área de embalagens para indústria alimentícia, pois muitos alimentos são instáveis na presença de luz, tornando assim a embalagem uma barreira natural, sem necessidade de uso de aditivos (GENNADIOS et al., 1996; ROTTA, 2008).

Opacidade é uma análise que indica o grau de transparência do filme, quanto maior os valores de opacidade, menos transparência terá o filme. Adição das nanopartículas quando comparado ao PEO puro aumentou o grau de opacidade dos filmes analisados.

Tabela 5 Características de transmissão de luz e opacidade para filmes controle e incorporados com as nanopartículas de timol e carvacrol.

Filme	Transmissão de Luz				Opacidade
	Transmitância (%)				
	210 nm	320 nm	500 nm	620 nm	
PEO (controle)	0,43±0,06aC	2,8±0,4aB	4,9±0,8aA	2,5±0,5bBC	15,3±0,5c
PEO/T-NP 30	0,53±0,05aC	2,2±0,3aB	3,23±0,05aB	4,8±0,4aA	17,75±0,1bc
PEO/T-NP 50	0,45±0,07aB	1,10±0,0bAB	0,9±0,4bB	2,0±0,4bA	26,18±1,5a
PEO/T-NP 70	0,43±0,06aB	0,93±0,06bB	1,15±0,2bB	2,25±0,4bA	23,84±0,7ab
PEO (controle)	0,43±0,06bC	2,8±0,4aB	4,9±0,8aA	2,5±0,5aBC	15,3±0,5b
PEO/C-NP 30	0,7±0aA	1,45±0,07bA	2,25±0,8bA	2,2±0,6aA	19,10±3,0a
PEO/C-NP 50	0,6±0,0abB	1,6±0,2bAB	2,0±0,3bA	2,6±0,4aA	19,70±0,2a
PEO/C-NP 70	0,6±0,06abC	1,10±0,0bB	1,25±0,07bB	1,7±0,14aA	20,62±0,08a

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna e letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisados pelo teste de Tukey.

3.6 Análises de FTIR

Os espectros de FTIR dos filmes de PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP, estão apresentados na Figura 1. Análises de FTIR foram realizadas com o intuito de detectar mudanças estruturais nas moléculas de PEO quando incorporados com as nanopartículas, confirmando as interações.

Interações estas que podem ser ligações de hidrogênio entre os oxigênios da molécula de PEO, com os hidrogênios da zeína, ou os nitrogênios da zeína com os átomos de hidrogênio das moléculas de PEO. Outras formas de interação intermolecular que podem ocorrer são forças fracas do tipo dipolo entre as moléculas da proteína zeína e o polímero PEO.

Nos espectros do filme de PEO (controle) é possível observar uma banda em 2896 cm^{-1} referente às vibrações de alongação do C-H, e em 1098 cm^{-1} bandas características de vibrações de C-O-C (ZHOU et al., 2011).

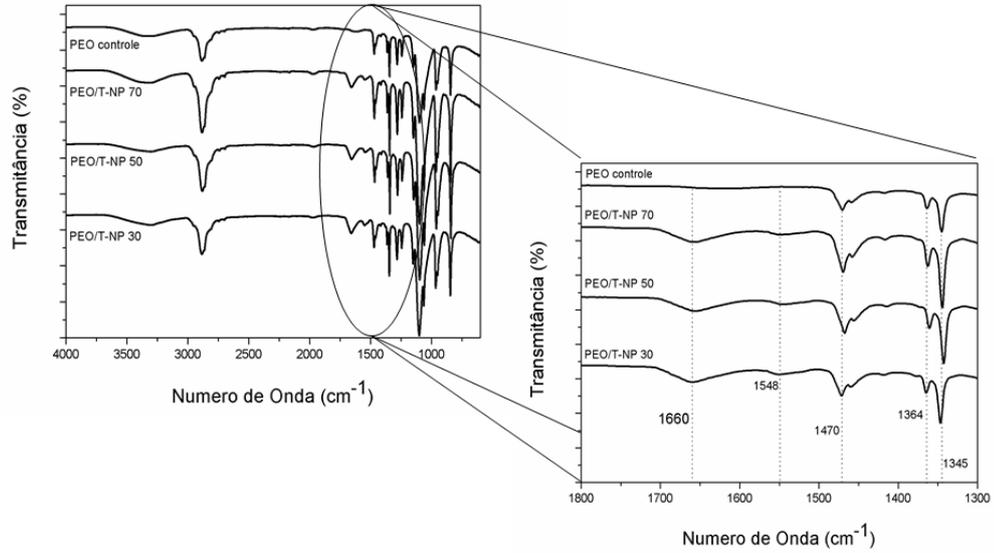
Nos espectro dos filmes de PEO/T-NP e PEO/C-NP é possível observar bandas suaves correspondentes aos grupamentos OH entre 3300 e 3500 cm^{-1} . A presença dos grupamentos OH são atribuídos à presença de água e aos grupamentos fenólicos dos óleos essenciais. Essas bandas de OH são visualizadas de forma suave devido ao fato de os filmes apresentarem baixa umidade e grupamentos fenólicos dos óleos essenciais estarem numa estrutura compacta e em menor disponibilidade que o PEO e a zeína.

Picos agudos na região de 2800 cm^{-1} representam o alongamento dos grupos funcionais CH_3 e CH_2 ; em 1660 e 1550 , é possível observar os grupamentos (C-H e N-H) referentes às estruturas de amida I e amida II da molécula de zeína, confirmando a interação das nanopartículas proteicas com o PEO pelo deslocamento das bandas, mostrados no detalhe da Figura (1a e 1b) (FORATO et al., 2003).

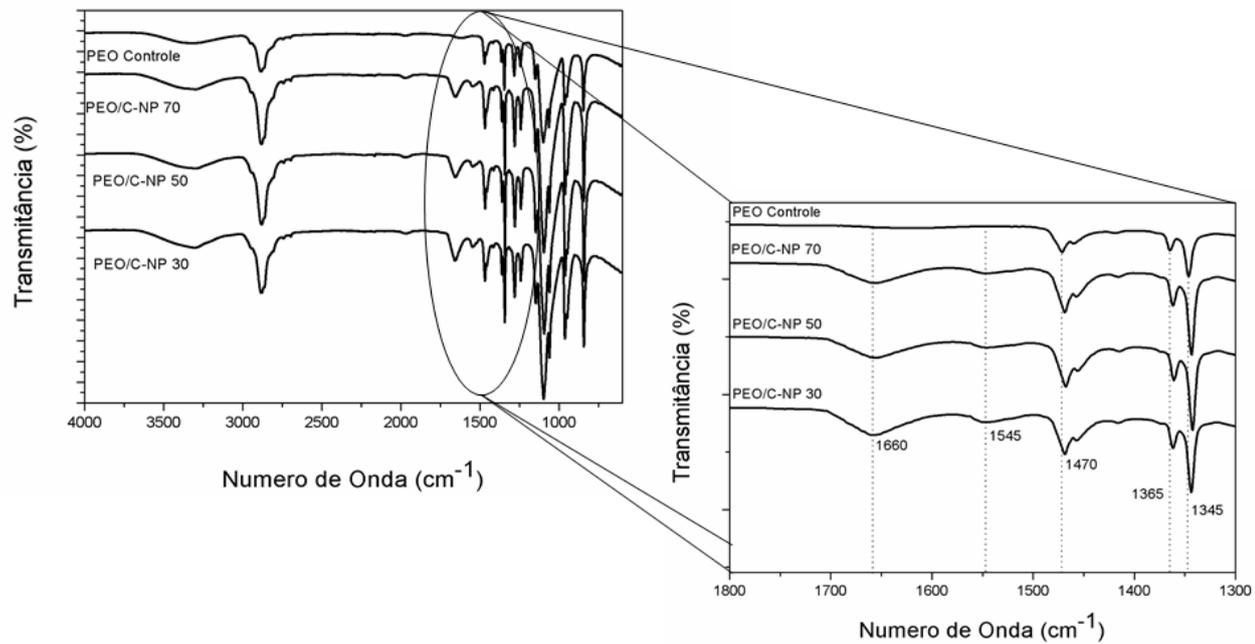
Os picos característicos do anel fenólico do timol e do carvacrol, em torno de 1625 cm^{-1} desapareceram por apresentar posição semelhante aos picos da amida I e II da zeína (1660 e 1550 cm^{-1} , respectivamente) (WU et al., 2012).

Figura 1 Espectros de FTIR. a) PEO (controle), PEO/T-NP30, PEO/T-NP50 e PEO/T-NP50. b) PEO/C-NP30, PEO/C-NP50 e PEO/C-NP70.

a)



b)



3.7 Análises termogravimétricas (TGA)

Análise termogravimétrica é uma técnica muito útil para avaliar a perda de peso de uma amostra em função da temperatura e para avaliar a sua estabilidade térmica.

Os eventos térmicos referentes o percentual de perda de massa e as respectivas temperaturas estão apresentadas na Figura 2 e Tabela 6, para as amostras PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP.

Os filmes de PEO (controle) e carregados com as nanopartículas apresentaram dois eventos de perda de massa. Pode se dizer que a primeira perda de massa foi atribuída a perda de compostos voláteis, devido a presença dos óleos essenciais e também supostas desidratações, e a segunda perda de peso é relacionada ao rompimento da rede polimérica e a formação de um resíduo carbonáceo (JAGADISH; RAJ, 2011).

Amostras de PEO apresentaram a primeira perda de massa na temperatura de 251,14°C com 2,8% de perda de massa, e a segunda em 418°C com 82,14 %. A estabilidade térmica das amostras foi aumentando à medida que a proporção de nanopartículas se sobressaiu com relação à de PEO. Adição das nanopartículas conferiu aumento da estabilidade térmica na matriz do filme, melhorando as propriedades térmicas dos filmes de PEO puro.

Nos filmes incorporados com nanopartículas de timol (PEO/T-NP30, PEO/T-NP50 e PEO/T-NP70) (Fig 2a) foi possível observar a primeira perda de massa em regiões semelhantes entre 375 e 390 °C e com percentual em perda de massa variando entre 7 a 10%. O diferencial ocorreu na temperatura de degradação em que os filmes com maior concentração de nanopartículas apresentou maior resistência térmica quando comparado aos filmes com menor concentração.

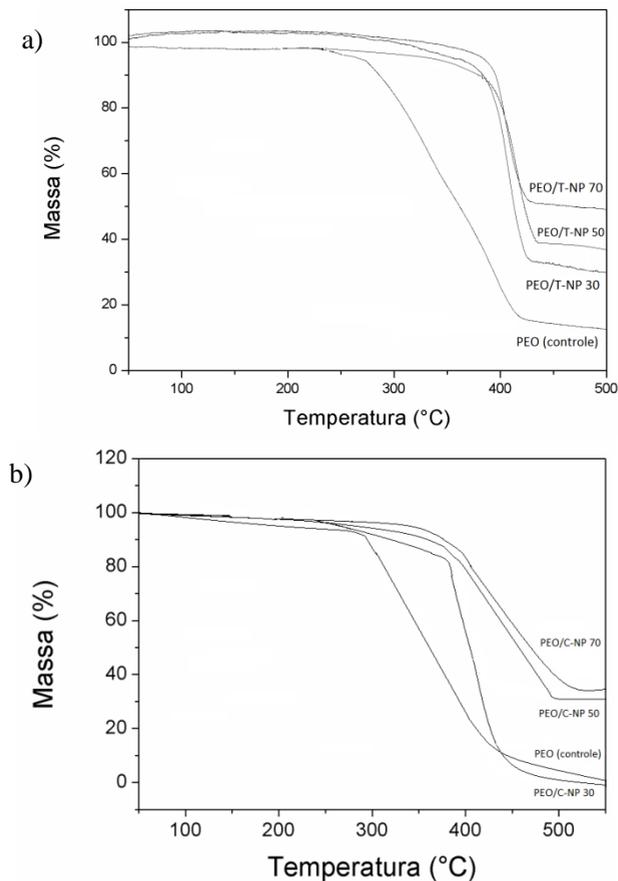
Os filmes de PEO/C-NP50 e PEO/C-NP70, apresentaram pequenas diferenças no comportamento térmico entre si. Nas amostras com PEO/C-NP30 observou-se a segunda perda de massa em temperaturas próximas as PEO/C-NP50 e PEO/C-NP70, porém acentuada perda de massa, cerca de 30% acima.

Isso pode ser explicado pelo fato que a amostra PEO/C-NP30, possui a menor proporção de nanopartículas, reduzindo a sua estabilidade térmica.

Tabela 6 Transições térmicas dos filmes de PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP

Transição térmica	PEO (controle)	PEO/T-NP 30	PEO/T-NP 50	PEO/T-NP 70
Ponto 1 (°C)	251,14	387,7	376,8	390,6
Ponto 2 (°C)	418,9	427	436,6	426,2
Perda de Massa 1 (%)	2,8	10,42	7,86	7
Perda de Massa 2 (%)	82,14	66,3	61,1	47,1
Transição térmica		PEO/C-NP 30	PEO/C-NP 50	PEO/C-NP 70
Ponto 1 (°C)		382,3	371	383,2
Ponto 2 (°C)		432,3	422,7	427,5
Perda de Massa 1 (%)		17	11	14,2
Perda de Massa 2 (%)		96,35	64,4	62,4

Figura 2 Termogramas de TGA. a) PEO (controle), PEO/T-NP30, PEO/T-NP50 e PEO/T-NP70. b) PEO/C-NP30, PEO/C-NP50 e PEO/C-NP70.



3.8 Análises de calorimetria diferencial de varredura

As análises de calorimetria diferencial de varredura são muito utilizadas para confirmar o aprisionamento de um composto ativo em uma matriz polimérica, bem como possíveis interações que ocorrem entre ambos, com supostos desaparecimentos ou deslocamentos de picos de fusão, cristalização ou outras transições térmicas.

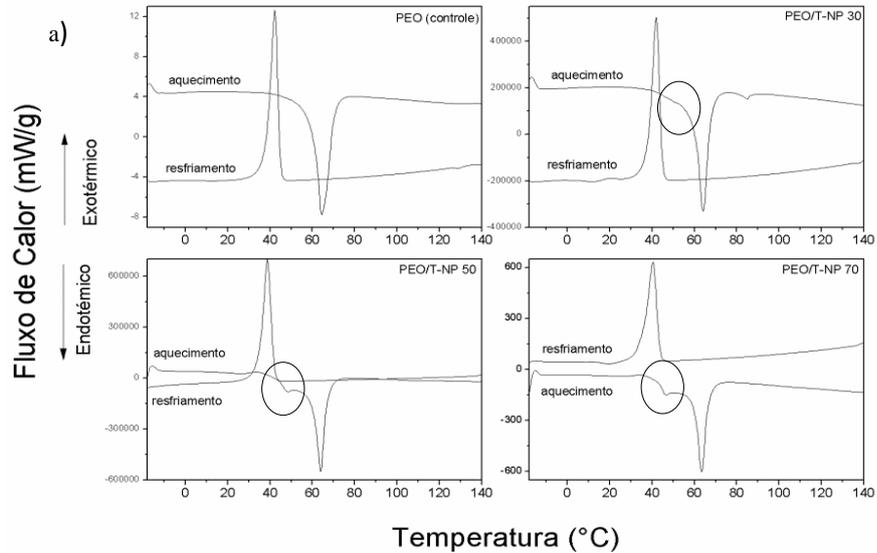
Curvas de DSC do PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP estão apresentados na Figura 3(a,b).

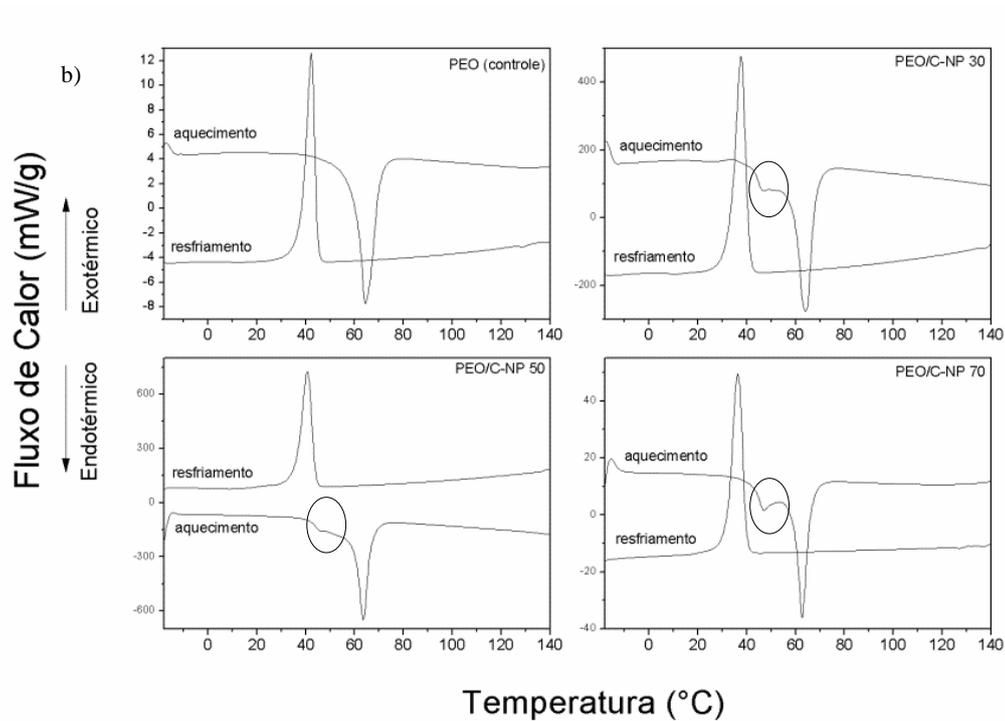
PEO é um termoplástico, semicristalino com solubilidade em água contendo oxigênio e éter em cada unidade de repetição (JAGADISH; RAJ, 2011). Nos termogramas de PEO puro foi possível observar um pico endotérmico agudo referente à fusão em 62°C, com posterior cristalização, sendo representado por um sinal exotérmico em torno 40°C, estes eventos se repetiram em todas as amostras estudadas (WANG et al., 2001).

Observando os filmes PEO/C-NP (Fig. 3 b) é possível observar que o ponto de fusão do carvacrol foi deslocado para temperaturas de 40°C. Este óleo essencial tem como característica física ponto de fusão em 0°C (dados apresentados no capítulo 2). Com o aprisionamento nas matrizes de zeína e a incorporação em filmes de PEO foi confirmada a proteção desses compostos pelas matrizes poliméricas (da ROSA et al. 2015)

Nos filmes PEO/T-NP, é possível observar o ponto de fusão referente à molécula do timol em temperaturas próximas de 40°C.

Figura 3 Termogramas de DSC com respectivas curvas de aquecimento e resfriamento. a) PEO (controle), PEO/T-NP30, PEO/T-NP50 e PEO/T-NP70. b) PEO (controle), PEO/C-NP30, PEO/C-NP50 e PEO/C-NP70.





3.9 Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas por MEV são mostradas nas Figuras 4 e 5 para os filmes de PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP, referente à superfície dos filmes e as suas respectivas secções transversais.

Não foram observadas agregações e separações de fase na superfície dos filmes de PEO incorporados com as nanopartículas. Estes resultados indicam que as nanopartículas dispersaram homogeneamente na matriz de polimérica.

PEO é um polímero linear e a regularidade da sua unidade estrutural permite um elevado grau de cristalinidade envolvendo 70 a 85 % do polímero, sendo esse comportamento confirmado pelas análises morfológicas, Fig. (4-a;b) (DHAWAN; VARMA; SINHA, 2006b).

A incorporação das nanopartículas nas matrizes de PEO revelaram superfície e secção transversal amorfizada com a presença destas, e o aumento na concentração das nanopartículas proporcionou um aumento na porosidade dos filmes.

Esse aumento na porosidade pode ser também explicado pelo aumento na espessura. Ao avaliarmos as figuras referentes às secções transversais, observamos que com a incorporação das nanopartículas torna o filme menos denso, isto é, com maior volume, e maior espessura à medida que aumenta a concentração das nanopartículas a espessura aumenta e esta por sua vez explica o aumento da porosidade, ou seja, os espaços vazios entre as partículas, devido sua morfologia esférica (mostrado no capítulo 2).

Figura 4 Micrografias de MEV representadas na coluna da esquerda pela superfície dos filmes e na coluna da direita pela secção transversal. a) e b) PEO (controle); c) e d) PEO/T-NP30; e) e f) PEO/T-NP50; g) e h) PEO/T-NP70.

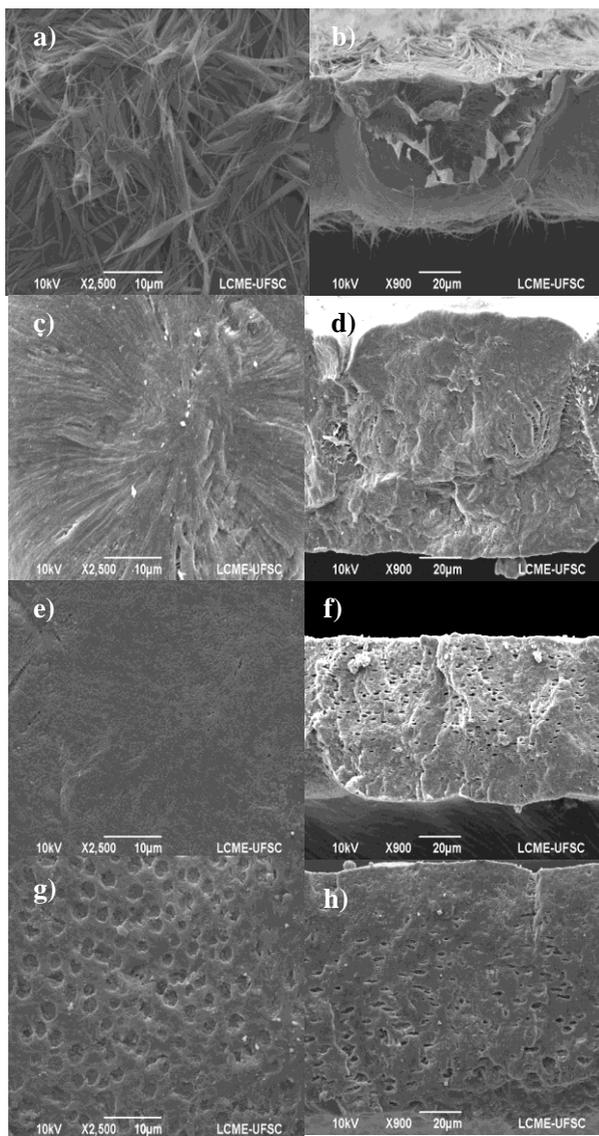
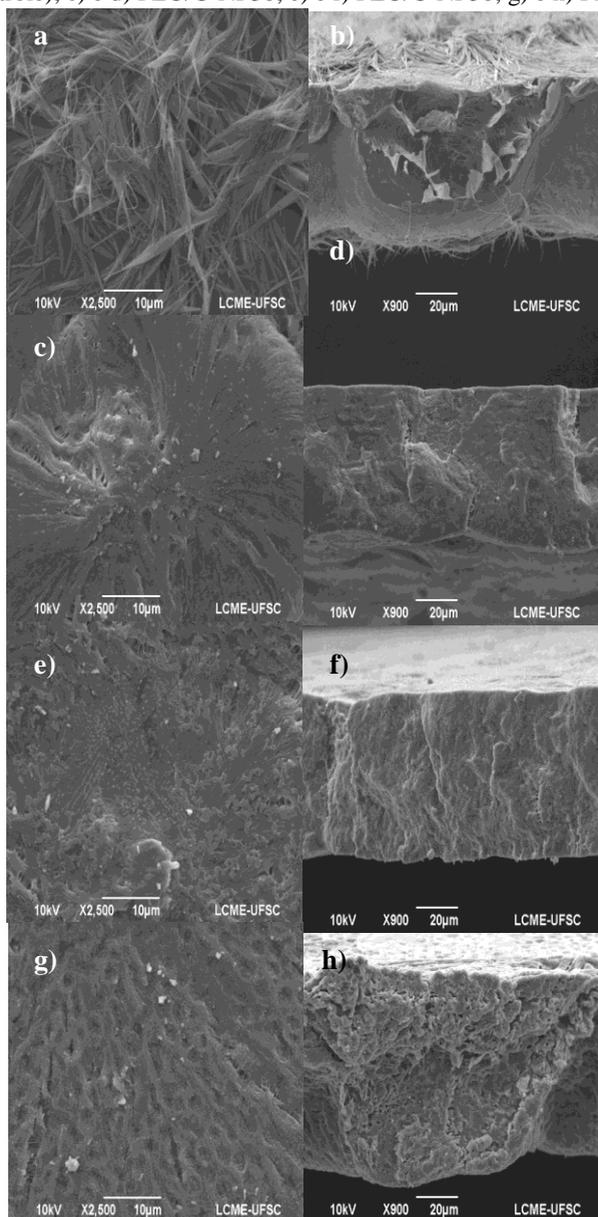


Figura 5 Micrografias de MEV representadas na coluna da esquerda pela superfície dos filmes e na coluna da direita pela secção transversal. a) e b) PEO (controle); c) e d) PEO/C-NP30; e) e f) PEO/C-NP50; g) e h) PEO/C-NP70



3.10 Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi expressa em percentual de inibição dos filmes de PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP estão apresentados na Tabela 7.

Filmes incorporados com 30% e 50% de nanopartículas de timol e carvacrol não apresentaram diferenças significativas nos resultados. O aumento da concentração de nanopartículas para 70% apresentou maior atividade antioxidante em relação aos outros filmes.

Resultados efetivos de atividade antioxidante são atribuídos ao timol e carvacrol, por se tratar de monoterpenos fenólicos, são capazes de retardar ou desacelerar a oxidação de um material oxidável, podendo estar incluídos lipídeos, carboidratos, proteínas e outras moléculas orgânicas que compõem os tecidos de origem animal ou vegetal.

Esses resultados são satisfatórios para a utilização do PEO com as nanopartículas incorporadas como uma embalagem com propriedades antioxidantes para alimentos.

Tabela 7 Atividade antioxidante para os filmes de PEO (controle), PEO/T-NP e PEO/C-NP.

Filme	Atividade antioxidante (%)
PEO (controle)	10,5 ± 0,6 ^c
PEO/T-NP 30	40,7 ± 2,9 ^b
PEO/T-NP 50	42,2 ± 0,3 ^b
PEO/T-NP 70	52,0 ± 0,3 ^a
PEO (controle)	10,5 ± 0,6 ^c
PEO/C-NP 30	52,1 ± 1,9 ^b
PEO/C-NP 50	55,9 ± 2,9 ^b
PEO/C-NP 70	66,9 ± 1,9 ^a

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisados pelo teste de Tukey.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que as nanopartículas de zeína carregadas com timol e carvacrol podem ser incorporadas em filmes de PEO, sendo comprovado pelas técnicas de DSC, TGA e FTIR. A incorporação de PEO/T-NP e PEO/C-NP nas matrizes de PEO apresentou morfologia homogênea, sem formação de agregados e separação de fases, porém com uma estrutura mais expandida, caracterizada pelo aumento da espessura dos filmes.

O aumento na concentração das nanopartículas foi diretamente proporcional aos resultados de atividade antioxidante.

Filmes de PEO/T-NP 30, PEO/C-NP 30 e PEO/C-NP 50 modificaram a superfícies do PEO, aumentando a hidrofobicidade, porém a incorporação de 70% de nanopartículas aumentou a hidrofiliidade devido a presença do surfactante Pluronic, uma vez que se encontra em maior concentração.

A inclusão PEO/T-NP e PEO/C-NP manteve e aumentou o efeito plastificante dos filmes de PEO, reduzindo o módulo de elasticidade e a tensão máxima.

As soluções filmogênicas de PEO contendo as nanopartículas apresentaram comportamento pseudoplástico ($n > 1$), e a adição das nanopartículas aumentou o índice de consistência das dispersões.

Em relação às propriedades óticas pode se dizer que a adição das nanopartículas manteve os bons resultados de luminosidade do PEO, e à medida que as nanopartículas foram adicionadas refletiram positivamente nos parâmetros $-a^*$ (verde), $+b^*$ (amarelo), relacionando com o aumento de cor (parâmetro ΔE_{ab}), levando a formação de filmes com coloração mais afastada do branco (PEO puro). Dos dados de transmissão de luz conclui-se que, quanto maior o comprimento de onda nas regiões do UV e visível maior a transmissão de radiação através do filme. A adição das nanopartículas também aumentou a opacidade dos filmes.

REFERÊNCIAS

- ASTM D882-95a. **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. ASTM International, Philadelphia, United States, 1995.
- ATARES, L. CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 51-62, 2016.
- BOSTAN, M. S.; MUTLU, E. C.; KAZAK, H.; S. SINAN KESKIN, S. S.; ONER, E. T.; EROGLU, M. S. Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 993– 1000, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSER, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- CANEVAROLO Jr, S.V. Técnicas de caracterização de polímeros. **Editora Artliber** - São Paulo, 2004.
- DA ROSA, C. G.; MACIEL, M. V. O. B.; DE CARVALHO, S. M.; DE MELO, A. P. Z.; JUMMES, B.; DA SILVA, T.MARTELLI, S. M.; VILLETTI, M. A.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 481, p. 337–344, 2015.
- DHAWAN, S.; VARMA, M.; SINHA, V. R. Applications of Poly(ethylene oxide) in Drug Delivery Systems. Part II. **Pharmaceutical Technology**, p. 82-96, 2005.
- FORATO, L. A.; BICUDO, T. C. B.; COLNAGO, L. A. Conformation of α zeins in solid state by fourier transform IR. **Biopolymers**, v. 72, p. 421–426, 2003.

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; HANDA, M.A.; FRONING, G.W. Mechanical properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 585 – 589, 1996.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAVI, F. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 403–413, 2015.

HUNTERLAB.

Disponível

em:

http://www.hunterlab.com/appnotes/an07_96a.pdf.

Acesso:

Dezembro, 2015.

JAGADISH, R.; S. RAJ, B. Properties and sorption studies of polyethylene oxide-starch blended films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1572-1580, 2011.

JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E.A.; IMRAN, M.; AKHTAR, M.J.; CLEYMAND, F.; DESOBRY, S. Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidant films. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 380-389, 2012.

LI, J.; ZIVANOVIC, S.; DAVIDSON, P. M.; KIT, K. Characterization and comparison of chitosan/PVP and chitosan/PEO blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p.786–791, 2010.

MACHADO, J.C.V. **Reologia e Escoamento de Fluidos: Ênfase na Indústria do Petróleo**. Editora Interciência: Rio de Janeiro, p. 1-37, 2002.

MARTUCCI, J. F.; GENDE, L. B.; NEIRA, L. M.; RUSECKAITE, R. A. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 205–213, 2015.

NORONHA, C. M.; DE CARVALHO, S. M.; LINO, R. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 159, p. 529–535, 2014.

PARK, P.; JE, J.; KIM, S. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 17-22, 2004.

PARRIS, N.; COOKE, P. H., HICKS, K. B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4788-4792, 2005.

PEREIRA, A. G. B.; GOUVEIA, R. F.; DE CARVALHO, G. M.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Polymer blends based on PEO and starch: Miscibility and spherulite growth rate evaluated through DSC and optical microscopy. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 499-504, 2009.

PEREIRA, A. G. B.; PAULINO, A. T.; RUBIRA, A. F.; E. MUNIZ, E. C. Polymer-polymer miscibility in PEO/cationic starch and PEO/hydrophobic starch blends. **Express Polymer Letters**, v. 4, p. 488-499, 2010.

QIU, Y-R.; RAHMAN, N.A.; MATSUYAMA, H. Preparation of hydrophilic poly(vinyl butyral)/Pluronic F127 blend hollow fiber membrane via thermally induced phase separation. **Separation and Purification Technology**, v. 61, p. 1-8, 2008.

RAMOS, M.; BELTRÁN, A.; PELTZER, M.; VALENTE, A. J. M.; GARRIGÓS, M. C. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, p. 470-477, 2014.

RAMOS, M.; JIMÉNEZ, A.; PELTZER, M.; GARRIGÓS, M. C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 513-519, 2012.

ROTTA, J. Propriedades físico-químicas de filmes de quitosana e hidroxipropilmetil-celulose Plastificados com Sorbitol. **Dissertação Mestrado**, 2008.

ROTTA, J.; BARRETO, P. L. M.; MINATTI, E. . Determination of structural and mechanical properties, diffractometry and thermal analysis of chitosan and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (Impresso), v. 31, p. 1-6, 2011.

WANG, F-Y.; M. MA, C-C.; WU, W-J. Thermal degradation of polyethylene oxide blended with novolac type phenolic resin. **Journal of Materials Science**, v. 36, p. 943 – 947, 2001.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 283-290, 2012.

ZHANG, S.; SUN, D.; FU, Y.; DU, H. Recent advances of superhard nanocomposite coatings: a review. **Surface and Coatings Technology**, v. 167, p. 113–119, 2013.

ZHOU, Q.; ZHANG, Z.; CHEN, T.; GUO, X.; ZHOU, S. Preparation and characterization of thermosensitive pluronic F127-b-poly(ϵ -caprolactone) mixed micelles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 45–57, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes considerações podem ser feitas:

- ✓ O método de nanoprecipitação mostrou-se eficiente para a obtenção de dispersões de nanopartículas estáveis.
- ✓ Os parâmetros de Z-ave, IP, ζ , AA e EE, revelaram que as nanopartículas são estáveis nas condições estudadas, possibilitando o seu armazenamento em dispersão durante os 90 dias de observação. Somente as nanopartículas controle armazenadas sob 20°C, após 3 meses de armazenamento, precipitaram, impossibilitando com isso a continuidade das análises.
- ✓ Nanopartículas carregadas com óleos essenciais apresentaram maior atividade antimicrobiana frente às bactérias gram-positivas do que as gram-negativas, através da observação do tamanho do halo de inibição.
- ✓ As nanopartículas apresentaram uma liberação controlada ao longo do tempo (50% em 8 horas), sem a presença de efeitos burst. Os mecanismos de transporte variaram entre os encapsulados. NPT-timol e NPT-orégano apresentaram comportamento de difusão anômala, formando uma combinação entre Fickiana e não Fickiana. NPT-carvacrol apresentou comportamento classificado como super transporte do tipo II ($n > 1$), e NPT-tomilho apresentou valores de “n” menores que 0,5. Porém não são descritos na literatura mecanismos de transporte para esses valores.
- ✓ As nanopartículas apresentaram características distintas aos óleos essenciais e aos compostos puros, sendo comprovado pelas técnicas de MEV, MET, DSC e TGA.
- ✓ Comparando os resultados de tamanho de partícula obtidos por DLS e MET estes estão em concordância, levando em consideração as características inerentes de cada técnica.
- ✓ Em resumo, do ponto de vista físico-químico, os resultados indicaram que as nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais são estáveis.
- ✓ Nanopartículas de zeína carregadas com timol e carvacrol podem ser incorporadas em filmes de PEO, sendo comprovado pelas técnicas de DSC, TGA e FTIR.
- ✓ A incorporação de PEO/T-NP e PEO/C-NP nas matrizes de PEO apresentou morfologia homogênea, sem formação de agregados e separação de fases.

- ✓ O aumento na concentração das nanopartículas foi diretamente proporcional aos resultados de atividade antioxidante.
- ✓ Filmes de PEO/T-NP 30, PEO/C-NP 30 e PEO/C-NP 50 modificaram a superfícies do PEO, aumentando a hidrofobicidade, porém a incorporação de 70% de nanopartículas aumentou a hidrofiliabilidade devido a presença do surfactante Pluronic, estar em maior concentração.
- ✓ A inclusão PEO/T-NP e PEO/C-NP manteve e aumentou o efeito plastificante dos filmes de PEO, reduzindo o módulo de elasticidade e a tensão máxima.
- ✓ As soluções filmogênicas de PEO contendo as nanopartículas apresentaram comportamento pseudoplástico ($n > 1$), e a adição das nanopartículas aumentou o índice de consistência das dispersões.
- ✓ Em relação às propriedades óticas pode se dizer a adição das nanopartículas manteve os bons resultados de luminosidade do PEO, e à medida que as nanopartículas foram adicionadas refletiram positivamente nos parâmetros a^* = verde), b^* = amarelo), relacionando com o aumento de cor (parâmetro ΔE_{ab}), levando a filmes mais coloridos.
- ✓ Dos dados de transmissão de luz conclui-se que, quanto maior o comprimento de onda nas regiões do UV e visível maior a transmissão de radiação através do filme. A adição das nanopartículas também aumentou a opacidade dos filmes.

PERPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTURO

Como trabalhos futuros é sugerido:

Realizar a estabilidade das nanopartículas em condições mais severas simulando o processamento de alimentos.

Realizar análises de atividade de água, permeabilidade e difração de raios-X.

Aplicar as nanopartículas e os filmes em um sistema alimentício.

ANEXO A- Artigo “Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes” publicado em “Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects”

Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 481 (2015) 337–344



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa



Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes



Cleonice Gonçalves da Rosa^{a,*}, Matheus Vinicius de Oliveira Brisola Maciel^a,
Sabrina Matos de Carvalho^a, Ana Paula Zapelini de Melo^a, Bruna Jummes^a,
Tiago da Silva^a, Sílvia Maria Martelli^b, Marcos Antônio Villetti^c, Fabiano Cleber Bertoldi^d,
Pedro Luiz Manique Barreto^a

^a Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88034-001, Brazil

^b Faculty of Engineering, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS 36036-900, Brazil

^c Department of Physics, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^d Agricultural Research and Rural Extension of Santa Catarina, Itajaí, SC 88318-112, Brazil

ANEXO B- Artigo “Development of zein nanoparticles loaded with essential oils and stabilized by non-ionic surfactant” em processo de revisão em “Food Science & Nutrition”

● Food Science & Nutrition - Decision on Manuscript ID FSN3-2015-12-029... ★

● **ymartinlo@foodscience-nutrition.com** Jan 10 em 5:51 PM ★
Para cleorosaqm@yahoo.com.br

10-Jan-2016

Dear Mrs. da Rosa:

Manuscript ID FSN3-2015-12-0297 entitled "Development of zein nanoparticles loaded with essential oils and stabilized by non-ionic surfactant" which you submitted to Food Science & Nutrition, has been reviewed. Some revisions to your manuscript have been recommended. Therefore, I invite you to respond to the comments appended below and revise your manuscript.

Before submitting your revisions:

1. Prepare a response to the reviewer comments appended below in point-by-point fashion. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response and indicate the page numbers in the manuscript where you have addressed each comment.