



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS BLUMENAU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA, PROCESSOS E MATERIAIS
AVANÇADOS

Pâmela Rosa Oliveira

**Modificação de nanopartículas do grupo caulim com óleos essenciais e aplicação em
embalagens ativas à base de poli(hidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato)**

Blumenau

2022

Pâmela Rosa Oliveira

Modificação de nanopartículas do grupo caulim com óleos essenciais e aplicação em embalagens ativas à base de poli(hidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Nardini Carli
Coorientador: Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini

Blumenau

2022

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

Oliveira, Pâmela Rosa

Modificação de nanopartículas do grupo caulim com óleos essenciais e aplicação em embalagens ativas à base de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) / Pâmela Rosa Oliveira ; orientadora, Larissa Nardini Carli , coorientador, Ismael Casagrande Bellettini, 2022.

108 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Blumenau, Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados, Blumenau, 2022.

Inclui referências.

1. Nanociência, Processos e Materiais Avançados. 2. Polímeros biodegradáveis. 3. Nanocompósitos poliméricos. 4. Modificação orgânica de nanopartículas. I. Carli , Larissa Nardini. II. Bellettini, Ismael Casagrande. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados. IV. Título.

Pâmela Rosa Oliveira

Modificação de nanopartículas do grupo caulim com óleos essenciais e aplicação em embalagens ativas à base de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Claudia Merlini
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Daniela Brondani
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Janaina da Silva Crespo
Universidade de Caxias do Sul

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Dr.(a) Larissa Nardini Carli
Orientador(a)

Blumenau, 2022.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e aos meus irmãos, por todo incentivo e encorajamento não somente neste trabalho, mas em todas as etapas da minha vida.

Ao meu noivo Joel, por ter muita paciência comigo, me incentivar, aconselhar e escutar.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Larissa Nardini Carli e Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini, por confiar a responsabilidade da pesquisa, os auxílios nos laboratórios, pelo socorro quando um equipamento dava defeito, ajuda e paciência durante toda a execução e escrita do trabalho.

A equipe de laboratório por sempre estarem disponíveis para a realização dessa pesquisa. Em especial a Renata C. da Costa e Daniele S. Malvessi, por me ajudarem não somente na realização das análises, mas por todos os ensinamentos e pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Cristiano da Silva Teixeira, pela ajuda nas análises e na participação de eventos.

A todos os professores do PPGNPMat, que de alguma forma contribuíram para meu desenvolvimento.

Aos meus colegas de classe/laboratório, em especial a Gabriele S. Malvessi, por toda ajuda, conversas e distrações.

À minha amiga Marisa, que mesmo distante, estava disponível em todos os momentos que precisei.

À banca de qualificação, Prof. Dr. Tales da Silva Daitx, Profa. Dra. Claudia Merlini e Profa. Dra. Daniela Brondani, por todos os questionamentos, contribuições e sugestões realizadas.

À banca de dissertação, Profa. Dra. Claudia Merlini, Profa. Dra. Daniela Brondani e Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo, pelos apontamentos e sugestões realizadas para tornar melhor este trabalho.

À Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo, da Universidade de Caxias de Sul, pela realização das análises termogravimétricas e de permeabilidade ao oxigênio.

Ao Prof. Dr. Tales da Silva Daitx, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela realização da análise elementar.

À Deise Rebelo Consoni, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), pela disponibilização e realização das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Ricardo Machado, do Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN), pela realização da análise de difração de raios x.

À Profa. Marília Miotto, do departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, e Daiane Mara Bobermin, do departamento de Farmacologia, pelo auxílio e realização da análise de atividade antimicrobiana.

Ao Leandro Guarezi Nandi, do departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos-EQA, pela realização da análise de cromatografia gasosa acoplado ao detector por espectrometria de Massa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro (processos nº 435650/2018-1 e 313599/2018-1).

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de fomento e apoio financeiro para esta pesquisa.

RESUMO

As embalagens ativas, que visam estender a vida útil de produtos, normalmente são produzidas a partir da incorporação direta de aditivos na matriz polimérica. No entanto, para os óleos essenciais (OE) essa incorporação pode ocasionar perda por volatilização durante o processamento e rápida liberação durante a aplicação, o que resulta na diminuição do tempo de inibição de crescimento microbiano. Em vista disso, este trabalho consistiu em modificar nanopartículas de argila com óleo essencial de orégano (OEO) e de manjerição (OEM) e incorporá-las na matriz polimérica de poli(hidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato) (PHBV), com a finalidade de obter uma embalagem com propriedades antimicrobianas. Inicialmente, as superfícies de haloisita (Hal) e caulinita (Kaol) foram modificadas com OEO e OEM por diferentes metodologias e foram caracterizadas por análise termogravimétrica, com a finalidade de se obter os percentuais de incorporação do OE. Os melhores resultados foram observados quando as nanopartículas de argilas foram modificadas por ultrassom seguido de aplicação de vácuo em uma proporção de argila:OE de 1:10. A argila Hal modificada com OEO foi a que obteve melhor resultado na incorporação (44% em massa de OE) e proporcionou uma evaporação lenta do OEO, sendo selecionada para incorporação na matriz polimérica. Todos os nanocompósitos produzidos apresentaram uma diminuição na estabilidade térmica do polímero e não proporcionaram uma mudança significativa no grau de cristalinidade quando comparado ao filme de PHBV. Também foi observado que o nanocompósito produzido com argila modificada e com acréscimo de OEO livre apresentou uma boa propriedade de barreira ao oxigênio quando comparado ao filme de PHBV puro e outros nanocompósitos produzidos. Além disso, a modificação prévia da argila viabilizou uma liberação lenta e controlada do OEO, resultando em uma atividade antimicrobiana contra *E. coli* próxima a concentração inibitória mínima e uma boa atividade antioxidante (30%) após 48 h de liberação do OEO em meio de ácido acético. Em vista disso, a modificação prévia da argila com OE se mostrou promissora para aplicação em embalagens ativas.

Palavras-chave: Polímeros biodegradáveis. Nanopartículas de argila. Modificação orgânica. Propriedade antimicrobiana e antioxidante. Liberação controlada. Embalagem ativa de alimentos.

ABSTRACT

Active packaging aims to extend the shelf life of products and are normally produced from the direct incorporation of additives into the polymer matrix. However, for essential oils (EO), this incorporation may cause loss by volatilization during processing and rapid release during the application, which results in a reduction in the time of inhibition of microbial growth. This work consisted of modifying nanoclays with oregano (OEO) and basil (OEM) essential oils and incorporating them into a polymer matrix of poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) (PHBV), in order to obtain an active package with antimicrobial properties. Initially, the surfaces of halloysite (Hal) and kaolinite (Kaol) were modified with OEO and OEM by different methodologies and were characterized by thermogravimetric analysis, in order to obtain the percentages of incorporation of the EO. The best results were observed with the clay nanoparticles which were modified by the application of ultrasound followed by vacuum in a ratio of 1:10 (nanoclay:EO). The Hal modified with OEO was the one that obtained the best result in the incorporation (44 w% of EO) and provided a slow evaporation of the OEO, being selected for incorporation in the polymeric matrix. All nanocomposites produced showed a decrease in the thermal stability of the polymer and did not present a significant change in the degree of crystallinity when compared to the PHBV film. It was also observed that the nanocomposite produced with modified clay and the addition of OEO presented a good oxygen barrier property when compared to the pure PHBV film and other nanocomposites. Thus, the previous modification of the clay enabled a slow and controlled release of OEO, resulting in an antimicrobial activity against *E. coli* near to the minimum inhibitory concentration and a good antioxidant activity (30%) after 48 h of OEO release in acetic acid medium. In view of these facts, the previous modification of clay with EO proved to be promising for application in active packaging.

Keywords: Biodegradable polymers. Nanoclays. Organic modification. Antimicrobial and antioxidant properties. Controlled release. Food active packaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de grânulos de PHB no interior das bactérias.	21
Figura 2: Representação esquemática das vias metabólicas para produção de PHBV.	22
Figura 3: Estrutura química do PHBV.	22
Figura 4: Figura esquemática da estrutura (a) octaédrica e (b) tetraédrica.	26
Figura 5: Estrutura da haloisita hidratada.	27
Figura 6: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (a) haloisita tubular (b) haloisita esferoidal.	27
Figura 7: Estrutura esquemática da caulinita.	28
Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, com escala de 100 nm, da caulinita.	29
Figura 9: Compostos ativos presentes no óleo essencial de orégano.	32
Figura 10: Compostos ativos presentes no óleo essencial de manjerição	33
Figura 11: Estrutura molecular do Tween 80.	38
Figura 12: Imagem esquemática das três metodologias utilizadas para modificação das nanopartículas de argilas com OE.	39
Figura 13: Esquema ilustrativo do Processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo.	40
Figura 14: Esquema ilustrativo do Processo de evaporação e adsorção.	41
Figura 15: Esquema ilustrativo do Processo Ultra-turrax®	41
Figura 16: Estabilização do radical livre DPPH.	48
Figura 17: Estabilização do radical livre ABTS ⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	49
Figura 18: Curvas de TGA e DTG das amostras de (a) Hal pura; (b) Kaol pura; (c) OEO; (d) OEM; (e) T80.	52
Figura 19: Espectros de FTIR-ATR das amostras: a) Hal pura, OEO e Hal/OEO_U e b) Kaol pura, OEO e Kaol/OEO_U	55
Figura 20: Espectros de FTIR-ATR das amostras: (a) Hal pura, OEM e Hal/OEM_U e (b) Kaol pura, OEM e Kaol/OEM_U	57
Figura 21: Imagens MEV mostrando a morfologia típica da argila pura, (a) Kaol e (d) Hal, e após a adsorção do OE, (b) Kaol/OEO_U, (c) Kaol/OEM_U, (e) Hal/OEO_U, (f) Hal/OEM_U.	59

Figura 22: Padrões de DRX das amostras (a) Hal pura, Hal/OEO_U e Hal/OEM_U e (b) Kaol pura, Kaol/OEO_U e Kaol/OEM_U.....	60
Figura 23: Percentual de evaporação OE incorporado em Kaol e Hal e em forma livre a: (a) 25°C, temperatura adequada para o crescimento fúngico, e (b) 37 °C, temperatura adequada para o crescimento bacteriano.	62
Figura 24: Espectro FTIR-ATR das diferentes composições de filmes de PHBV, sem e com Hal modificada com OEO.	64
Figura 25: Análise comparativa das transmitâncias dos filmes de PHBV versus os de (a) PHBV puro, (b) PHBV/OEO, (c) PHBV/Hal/OEO, (d) PHBV/Hal/OEO_U e (e) PHBV/Hal/OEO_U/OEO.	65
Figura 26: Curvas de (a)TGA e parte ampliada correspondente à perda de massa do PHBV, e (b) DTG do OEO e das diferentes composições do filme de PHBV.....	67
Figura 27: Curvas de (a) fusão e (b) cristalização dos filmes de PHBV.	69
Figura 28: Permeabilidade dos filmes de PHBV ao oxigênio.	71
Figura 29: Liberação de OEO em solução de ácido acético 3%, a 25 °C.	73
Figura 30: Concentração prevista de OEO liberado utilizando o modelo Korsmeyer-Peppas (linhas) e dados experimentais (pontos)	74
Figura 31: Capacidade antioxidantes de simuladores alimentares após exposição às amostras de filmes de PHBV contendo OEO, a partir do método de DPPH.	76
Figura 32: Atividade antioxidantes dos filmes contendo OEO em meio de ácido acético 3% pelo método ABTS ⁺	77
Figura 33: Curvas TGA/DTG da Hal/OEO_U.	96
Figura 34: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEO_U.	96
Figura 35: Curvas TGA/DTG da Hal/OEM_U.	97
Figura 36: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEM_U.	97
Figura 37: Curvas TGA/DTG da Hal/OEO/T80_U.	98
Figura 38: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEO/T80_U.	98
Figura 39: Curvas TGA/DTG da Hal/OEO/0.5T80_U.	99
Figura 40: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEO/0.5T80_U.	99
Figura 41: Curvas TGA/DTG da Hal/2OEO_U	100
Figura 42: Curvas TGA/DTG da Kaol/2OEO_U.....	100
Figura 43: Curvas TGA/DTG da Hal/OEO_UΔ.	101
Figura 44: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEO_UΔ.	101
Figura 45: Curvas TGA/DTG da Hal/0.4OEO_U.....	102

Figura 46: Curvas TGA/DTG da Kaol/0.4OEO_U.....	102
Figura 47: Curvas TGA/DTG da Hal/0.4OEM_U.....	103
Figura 48: Curvas TGA/DTG da Kaol/0.4OEM_U.....	103
Figura 49: Curvas TGA/DTG da Hal/0.4OEM/EtOH_U.....	104
Figura 50: Curvas TGA/DTG da Kaol/0.4OEM/EtOH_U.....	104
Figura 51: Curvas TGA/DTG da Hal/0.4OEM_EA.....	105
Figura 52: Curvas TGA/DTG da Kaol/0.4OEM_EA.....	105
Figura 53: Curvas TGA/DTG da Hal/0.4OEM_UT.....	106
Figura 54: Curvas TGA/DTG da Kaol/0.4OEM_UT.....	106

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resumo dos trabalhos encontrados na literatura.	25
Quadro 2: Principais componentes e propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e manjerição.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: A nomenclatura e proporção em massa das nanopartículas modificadas com OE pelos processos de ultrassom seguido de aplicação de vácuo (U) ou evaporação/adsorção (E.A) ou Ultra-Turrax® (UT).....	42
Tabela 2: Composição dos filmes poliméricos.....	43
Tabela 3: Eficiência de incorporação do OEO, OEM e T80 nas nanopartículas.	53
Tabela 4: Composição elementar das nanopartículas de argila puras e modificadas com OE.	58
Tabela 5: Resultados do ângulo 2θ e espaçamentos da interplanar (d001) encontrados a partir dos padrões de DRX da Hal pura, Kaol pura, Hal/OEO_U, Hal/OEM.....	61
Tabela 6: Valores do coeficiente de determinação (R^2) e do erro médio quadrático (RMSE) do filme de PHBV e os nanocompósitos.	66
Tabela 7: Temperaturas de degradação, massa de OEO incorporado no filme e massa residual em 600 °C.	68
Tabela 8: Propriedades térmicas (temperatura de fusão (T_{m1} e T_{m2}), temperatura de cristalização (T_c), variação de entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (X_c)) para PHBV puro, PHBV/OEO, PHBV/Hal/ OEO, PHBV/Hal/OEO_U e PHBV/Hal/OEO_U/OEO.....	70
Tabela 9: Parâmetros do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas para liberação de OEO em ácido acético 3%.	75
Tabela 10: Carga microbiana em filmes de PHBV contendo OEO calculados por ensaio de contato direto contra <i>E. coli</i>	78
Tabela 11: Composição do óleo essencial de orégano.	95
Tabela 12: Composição do óleo essencial de manjerição.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)
CEC	Capacidade de troca catiônica
CG/MS	Cromatografia gasosa acoplado ao detector por espectrometria de Massa
CMC	Concentração micelar crítica
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DPPH	2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazin-1-il
DRX	Difração de raio X
EA	Processo de evaporação/adsorção
EI	Eficiência de incorporação
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
FTIR-ATR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada
GRAS	Geralmente reconhecidos como seguros
Hal	Haloisita
HB	Hidroxibutirato
HV	Hidroxivalerato
K	Constante de proporcionalidade
Kaol	Caulinita
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mt	Montmorilonita
n	Expoente de difusão
NaOH	Hidróxido de sódio
OE	Óleo essencial
OEA	Óleo essencial de alecrim
OEL	Óleo essencial de laranja
OEM	Óleo essencial de manjeriço
OEO	Óleo essencial de orégano
OET	Óleo essencial de tomilho
PCL	Policaprolactona
PHA	Polihidroxialcanoatos

phaA	Enzima 3-cetotiolase
phaB	Acetoacetyl-CoA redutase
PHB	Polihidroxibutirato
PHBHHx	Poli(hidroxibutirato- <i>co</i> -hidroxihexanoato)
PHBV	Poli(hidroxibutirato- <i>co</i> -hidroxivalerato)
PHV	Polihidroxivalerato
PLA	Poli(ácido láctico)
PP	Polipropileno
RMSE	Erro médio quadrático
R ²	Coefficiente de determinação
Sep	Sepiolita
T80	Tween 80
T _c	Temperatura de cristalização
T _g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
T _m	Temperatura de fusão
T _p	Temperatura máxima de degradação
U	Processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo
UFC	Unidade formadora de colônia
UT	Processo de Ultra-Turrax [®]
UV-Vis	Ultravioleta-visível
X _c	Grau de cristalinidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo Geral.....	18
1.1.2	Objetivos Específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	20
2.1.1	Poli(hidroxi butirato-co-hidroxi valerato).....	20
2.1.1.1	<i>Estrutura e propriedades</i>	22
2.2	NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS À BASE DE PHBV.....	23
2.3	NANOPARTÍCULAS DE ARGILA.....	25
2.3.1	Haloisita	26
2.3.2	Caulinita	28
2.4	EMBALAGENS ATIVAS	29
2.4.1	Óleos essenciais como agentes antimicrobianos.....	31
2.4.1.1	<i>Óleo essencial de orégano.....</i>	31
2.4.1.2	<i>Óleo essencial de manjeriço.....</i>	32
2.5	MODIFICAÇÃO ORGÂNICA DE NANOPARTÍCULAS DE ARGILA	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	MATERIAIS.....	38
3.2	MODIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ARGILA COM ÓLEO ESSENCIAL.....	39
3.2.1	Processo de ultrassom seguido de vácuo.....	39
3.2.2	Processo de evaporação/adsorção (E.A)	40
3.2.3	Processo Ultra-turrax® (UT).....	41
3.3	PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS	43
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	43

3.4.1	Caracterização química.....	44
3.4.2	Estrutura e morfologia	44
3.4.3	Teste de evaporação do óleo essencial.....	45
3.4.4	Propriedades térmicas.....	45
3.4.5	Permeabilidade ao oxigênio	46
3.4.6	Ensaio de liberação do óleo essencial	47
3.4.7	Atividade antioxidante	47
3.4.7.1	<i>Método DPPH</i>	48
3.4.7.2	<i>Método ABTS</i>	48
3.4.8	Atividade antibacteriana.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ARGILA	51
4.1.1	Eficiência de incorporação dos óleos essenciais nas nanopartículas de argilas	51
4.1.2	Caracterização química.....	55
4.1.3	Morfologia	58
4.1.4	Teste de evaporação do óleo essencial.....	62
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS	63
4.2.1	Caracterização química.....	63
4.2.2	Propriedades térmicas.....	66
4.2.3	Permeabilidade ao oxigênio	71
4.2.4	Ensaio de liberação do OEO	73
4.2.5	Atividade antioxidante	75
4.2.6	Atividade antimicrobiana dos filmes	78
5	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICE A – COMPOSIÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	95

APÊNDICE B – CURVAS TGA/DTG DA CAULINITA E HALOISITA APÓS A MODIFICAÇÃO COM ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E MANJERICÃO.....	96
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, pesquisas têm se concentrado em polímeros de base biológica e/ou biodegradáveis com a finalidade de substituir os oriundos de fonte não renovável. Atualmente no mercado, segundo a European Bioplastic,¹ os bioplásticos – que são definidos como polímeros de fontes renováveis, biodegradáveis ou que apresentam ambas as propriedades – correspondem aproximadamente 1% dos 367 milhões de toneladas de polímero produzido anualmente. Destes, os polímeros biodegradáveis (que incluem os polihidroxicanoatos – PHA) somam mais de 1,5 milhões de toneladas de bioplásticos produzidos globalmente. Embora ainda não sejam tão competitivos quanto os convencionais, os polímeros biodegradáveis têm ganhado destaque por minimizar a quantidade de resíduo gerado e os impactos causados ao meio ambiente.

Os PHA são termoplásticos alifáticos naturais e não tóxicos.² O poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) é um membro da família dos PHA, principalmente produzido por bactérias, sendo biocompatível e biodegradável. No entanto, exibe baixas propriedades mecânicas, cristalinidade (70%) e temperatura de fusão (170°C) relativamente altas.^{3,4} A fragilidade e instabilidade térmica em temperaturas próximas à temperatura de fusão dificultam as aplicações em larga escala. Portanto, torna-se menos competitivo quando comparado aos termoplásticos convencionais.⁵

Como alternativa para aumentar a competitividade do PHBV frente aos materiais convencionais, a formação de nanocompósitos a partir da adição das nanopartículas de argila em matrizes poliméricas tem apresentado uma melhora significativa nas propriedades térmicas, mecânicas e de barreira do polímero.^{5,6} Isso devido às nanopartículas atuarem como carga reforçante e terem alta atividade superficial. Além disso, as nanopartículas de argila vêm se destacando por serem naturais, não tóxicas e de baixo custo.^{7,8} A formação de nanocompósitos poliméricos possibilita aplicação em áreas novas ou já existentes.

Dentro dessa perspectiva, o desenvolvimento de embalagens ativas tem sido uma das novas áreas de estudo bem como de aplicação, principalmente para indústrias alimentícias. Além das funções normais de embalagem para alimentos, como a proteção, conservação, veículo de informação sobre o produto e conveniência ou serviço, as embalagens ativas visam interagir com o alimento sem alterar suas propriedades organolépticas a partir da incorporação de certos aditivos. Elas também prolongam o tempo de vida útil e garantem a segurança alimentar.⁸⁻¹⁰

A incorporação dos aditivos proporciona novas propriedades ao material, ação antimicrobiana, antioxidante, barreira a gases, entre outras. A embalagem antimicrobiana tem por finalidade inibir e/ou inativar microrganismos indesejáveis que podem estar presentes nos alimentos.⁸ As nanopartículas de prata são muito estudadas por serem um agente antimicrobiano eficaz.^{11,12} No entanto, a preocupação relacionada à segurança e efeitos ambientais limitam seu uso generalizado. Portanto, existe uma necessidade significativa da substituição desses aditivos por agentes antimicrobianos naturais que sejam eficazes contra bactérias patogênicas e não sejam prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente.

Os óleos essenciais, como o de orégano e manjeriço, são conhecidos por terem atividade antimicrobiana, serem naturais e de baixo nível de toxicidade. Existem estudos dos mesmos para incorporação nos materiais de embalagem, e podem ter atividade por contato direto com a superfície dos alimentos ou pela liberação no espaço vazio através da evaporação.⁸ Vários métodos existem para incorporação desses agentes ativos na embalagem. A incorporação direta de aditivos antimicrobianos em polímeros são as mais comuns. No entanto, essas metodologias apresentam algumas desvantagens, como a volatilização do óleo essencial durante o processamento, o esgotamento rápido dos agentes ativos e mecanismo de ação em curto período.¹³

Novos estudos têm evidenciado uma melhoria nos mecanismos de ação e liberação dos agentes antimicrobianos a partir da modificação das nanopartículas de argila com óleos essenciais.^{7-9,14} Em vista disso, esta pesquisa propõe o desenvolvimento de nanocompósitos de PHBV com argilas de diferentes características físico-químicas, modificadas com óleos essenciais, objetivando prolongar o tempo do mecanismo de ação da embalagem alimentícia contra bactérias, além de combinar as características da argila e do óleo com as propriedades do polímero visando aplicação em embalagens ativas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste projeto é modificar diferentes nanopartículas de argila – haloisita e caulinita – com óleos essenciais para incorporação em matriz polimérica biodegradável de poli(hidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato) (PHBV), a fim de se obter nanocompósitos com propriedades antibacterianas para aplicação em embalagens ativas para alimentos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Definir e otimizar um método de incorporação do óleo essencial nas nanopartículas de argila com distintas características físico-químicas;
- Analisar a influência do tipo de óleo essencial na modificação das nanopartículas de argila em relação à eficiência de incorporação;
- Analisar a influência da modificação das nanopartículas nas propriedades térmicas e de barreira da matriz polimérica;
- Determinar a cinética de liberação do composto ativo em meios simuladores de alimentos;
- Avaliar as propriedades antibacteriana e antioxidante dos nanocompósitos obtidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLÍMEROS BIODERADÁVEIS

Nas últimas décadas, a poluição causada por resíduos sólidos, principalmente os poliméricos, tornou-se um grande problema ambiental cuja solução e/ou mitigação é um dos principais desafios da sociedade moderna, uma vez que esses materiais ao serem descartados em terra ou água são de difícil degradação ou quando incinerados podem emitir gases poluentes. Em vista disso, o desenvolvimento de materiais poliméricos biodegradáveis tem sido investigado por diversos países como forma de substituir os polímeros convencionais.

Polímeros biodegradáveis são aqueles que têm sua cadeia quebrada por enzimas adequadas produzidas por microrganismos (bactérias, fungos ou algas), sob condições específicas de temperatura, pH, umidade, e oxigenação.^{15,16} Durante ou antes do processo de biodegradação do polímero podem também ocorrer processos como hidrólise e fotodegradação, que auxiliam na quebra das macromoléculas, afetando sua estrutura.¹⁷

Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados em quatro diferentes categorias, as quais estão diretamente relacionadas a sua síntese: (1) polímeros provenientes da biomassa ou de recursos agrícolas (celulose, amido); (2) polímeros obtidos da produção microbiana (polihidroxialcanoatos) (PHA)); (3) polímeros sintetizados quimicamente usando monômeros de recursos renováveis (poli(ácido láctico) (PLA)); (4) polímeros nos quais os monômeros e polímeros são ambos obtidos por síntese química de recursos fósseis (policaprolactona (PCL)).^{16,18} No entanto, das categorias apresentadas apenas as três primeiras são obtidas de recursos renováveis.¹⁸

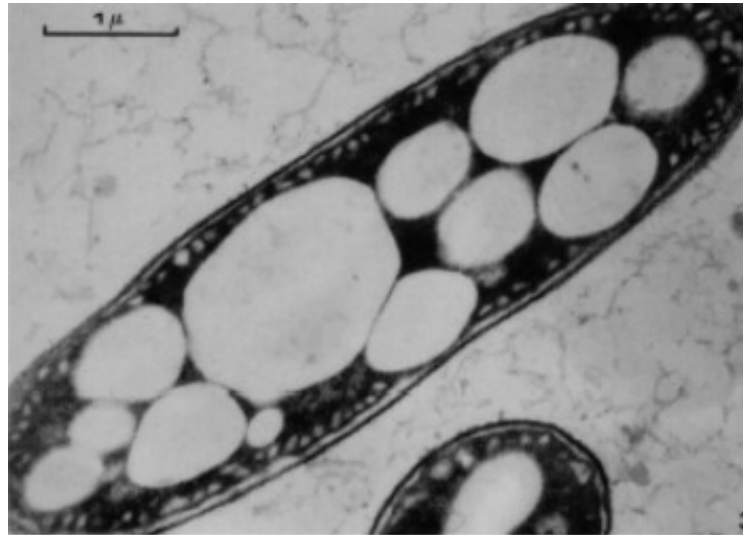
Entre os polímeros biodegradáveis, os PHA têm sido uma opção promissora para algumas aplicações, como embalagem de alimentos,¹⁹⁻²¹ regeneração de tecidos²² e encapsulamento de medicamentos²³ devido à sua biodegradabilidade, propriedades mecânicas e térmicas controladas. Além disso, podem ser produzidos por mais de 300 espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.^{4,24}

2.1.1 Poli(hidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato)

Os PHA são uma classe de polímeros renováveis, biodegradáveis e biocompatíveis, na forma de poliésteres termoplásticos. Eles são sintetizados por grandes variedades de bactérias

e se acumulam em seu citoplasma (Figura 1) durante o processo de fermentação sob condições de estresse, tais como limitações de oxigênio, nitrogênio ou fósforo, com excesso de fonte de carbono.^{4,25}

Figura 1: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de grânulos de PHB no interior das bactérias.³



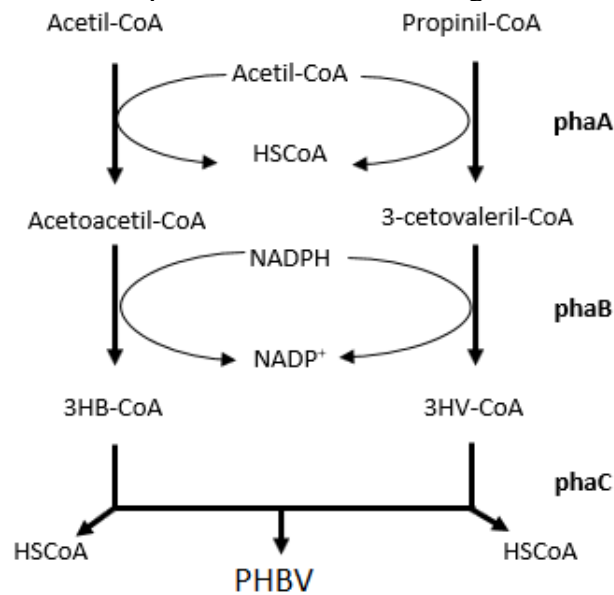
Os PHA podem ser classificados em dois grupos de acordo com o número de átomos de carbono que compõem sua unidade monomérica. O primeiro, classificado como PHA de cadeia curta, consiste de 3-5 átomos de carbono, e o segundo, de cadeia longa, consiste de 6-14 átomos de carbono ou mais, sendo ambos nos grupos laterais.^{4,26}

O polihidroxiбутирато (PHB), o qual pertence à classe de PHA de cadeia curta, é caracterizado como um material rígido e quebradiço, e é difícil de ser processado devido à sua elevada cristalinidade. Uma estratégia para melhorar a processabilidade do PHB é a copolimerização com 3-hidroxiуalerato (HV) através de fermentação bacteriana ou sintética, que tem como resultado a produção do copolímero poli(hidroxiбутирато-*co*-hidroxiуalerato) (PHBV), sendo também da classe de PHA de cadeia curta.^{4,25}

A síntese para a produção de PHBV envolve duas vias metabólicas paralelas, uma levando à produção de um monômero hidroxiбутирато (HB) e a outra à produção de um monômero hidroxiуalerato (HV). O primeiro passo envolve uma condensação de duas moléculas de acetil-CoA ou propionil-CoA (no qual o acetil-CoA é fornecido pelo metabolismo glicolítico de uma fonte de carbono, como o glicerol ou glicose, e o propionil-CoA pela ativação do propionato externo) por ação de uma enzima 3-cetotiolase, codificada por *phaA*. O

intermediário é reduzido para 3-hidroxi-butarato-CoA (3-HB-CoA) ou 3-hidroxi-valerato-CoA (3-HV-CoA) pela acetoacetil-CoA redutase, codificada por *phaB*. O 3-HB-CoA ou 3-HV-CoA é incorporado na cadeia de crescimento pela PHA sintase, codificada por *phaC*.²⁷ A reação de biossíntese do PHBV é apresentada na Figura 2.

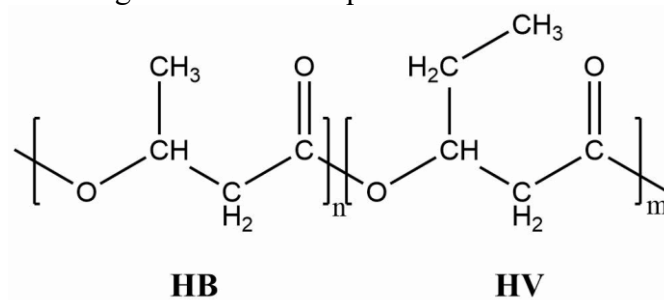
Figura 2: Representação esquemática das vias metabólicas para produção de PHBV.
Adaptado de Aldor e Keasling.²⁷



2.1.1.1 Estrutura e propriedades

O PHBV, produzido substituindo o grupo metila da cadeia principal do PHB pelo grupo etílico, é um poliéster alifático termoplástico opticamente ativo com alta estereoregularidade.²⁸ Sua estrutura química é composta por unidades estruturais HB e HV, as quais estão representadas na Figura 3.

Figura 3: Estrutura química do PHBV.³



O PHBV, com teor de HV até aproximadamente 50%mol, pode apresentar isodimorfismo, ou seja, quando dois monômeros cristalizam na mesma estrutura cristalina. Assim, as unidades de HV co-cristalizam no retículo cristalino do tipo PHB e vice-versa, devido ao polihidroxicvalerato (PHV) e PHB apresentarem estrutura helicoidal semelhantes.²⁹⁻³¹ Em consequências da co-cristalização, o PHBV apresenta um elevado grau de cristalinidade (50 – 70%) ao longo de uma ampla gama de composição.³⁰

A alta cristalinidade faz com que o PHBV seja considerado um polímero rígido e frágil, o que resulta em propriedades mecânicas inferiores quando comparado aos termoplásticos convencionais. O PHBV, com baixa concentração de HV, possui algumas propriedades similares ao polipropileno, como temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_m) em torno de 4°C e 180°C, e módulo de Young e resistência à tração de 3,5 GPa e 43 MPa, respectivamente. No entanto, quando comparado o alongamento na ruptura, o PHBV apresenta resultados muito inferiores ao do polipropileno (400%), tornando-se uma desvantagem no mercado.³²⁻³⁴

2.2 NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS À BASE DE PHBV

Nanocompósito polimérico é uma combinação de polímero e nanomaterial orgânico ou inorgânico, onde pelo menos uma fase permanece na escala nanométrica (1-100 nm) no material resultante.³⁵⁻³⁷ A formação de nanocompósitos pode ajudar a melhorar as propriedades desejadas (como mecânica, térmica, barreira contra permeação de gases, retardante de chama, entre outras) da matriz polimérica, além de poder gerar um novo conjunto de propriedades, dependendo do nanomaterial utilizado.³⁷

A melhoria nas propriedades apresentadas no nanocompósito é devido à elevada área superficial por unidade de volume (área específica) e uma elevada razão de aspecto das nanopartículas, o que proporciona, por exemplo, uma melhor interação entre as nanopartículas de argila e a matriz polimérica, a partir das interações de Van der Waals ou ligação de hidrogênio, e um aumento na eficiência do reforço.³⁷⁻³⁹ As nanopartículas de argila mais estudadas para preparação de nanocompósitos de PHB e PHBV como matriz polimérica são montmorilonita (Mt),^{40,41} sepiolita (Sep),^{2,6} mica,⁴² haloisita (Hal),^{43,44} e caulinita (Kaol).^{45,46}

Embora existam trabalhos realizados com nanopartícula de Kaol com uma variedade de polímeros, como PHB,⁴⁶ poli(hidroxicbutirato-*co*-hidroxihexanoato) (PHBHHx)⁴⁷ e quitosana⁴⁸ para a produção de nanocompósitos, apenas dois trabalhos utilizando

nanopartículas de Kaol e PHBV foram encontrados.^{21,45} Outros tipos de argilas, como Mt, Sep e Hal, apresentaram-se em maior número em pesquisas realizadas com PHBV.

Cabedo *et al.*⁴⁵ prepararam nanocompósitos PHBV/caulinita na proporção de 5% em massa de argila via processo de extrusão. Eles constataram que a adição da caulinita em PHBV não apresentou um aumento no espaçamento basal da argila, o que resultou na formação de aglomerados e baixa dispersão na matriz polimérica. Já a montmorilonita, que tem morfologia similar à da caulinita (plaquetas), exibiu uma boa dispersão na matriz polimérica e uma expansão na intergaléria da argila.

A formação de aglomerados e baixa dispersão de Kaol na matriz de PHBV também foi observado por da Costa *et al.*²¹ Segundo os autores, essa aglomeração é devido às fortes interações secundárias encontradas entre as lamelas. Embora a baixa dispersão, o nanocompósito PHBV/Kaol apresentou um aumento na estabilidade térmica e um acréscimo de 11% no grau de cristalinidade (X_c) do PHBV quando comparado ao filme de polímero puro (77% e 66%, respectivamente). Além da Kaol, o estudo também avaliou a interação do PHBV com Hal e Sep, onde as amostras PHBV/Sep e PHBV/Hal obtiveram um aumento na estabilidade térmica, a formação de esferulitos de menores tamanhos e X_c relativamente alto (80% e 77%, respectivamente). No entanto, o PHBV/Sep foi o que obteve uma melhor interação polímero/argila proporcionando uma boa dispersão.

Em estudo realizado por Kennouche *et al.*⁴⁹ a dispersão de diferentes concentrações de Hal foi investigada quando adicionadas à matriz de PHBV. Neste estudo, concentrações menores de argila (2,5% e 5% em massa) apresentaram uma dispersão homogênea, com nanotubos individuais. Para uma maior concentração (10% em massa), o nanocompósito exibiu grandes aglomerados de Hal devido às fortes ligações de hidrogênio entre as nanopartículas. Além disso, também foi constatado que a adição de 2,5% e 5% de argila na matriz polimérica aumentou a temperatura máxima de degradação (T_P igual a 285,3 °C e 287,2 °C, respectivamente) quando comparado ao PHBV puro (T_P igual a 282 °C).

Hasan *et al.*⁵⁰ incorporaram 3% em massa de nanotubos de haloisita no polímero e observaram um aumento em torno de 4 °C na temperatura de fusão (T_m) dos filmes resultantes em comparação com o PHBV puro devido ao fato da estrutura cristalina estar mais organizada. O estudo também demonstrou um aumento de 3 °C na T_P , o que pode ser atribuído à boa interação interfacial entre haloisita e PHBV. Além disso, uma redução na absorção de umidade nos filmes produzidos e uma maior taxa de biodegradação com o aumento da concentração (0-15%) dos nanotubos foi observada. O material obtido apresentou um grande potencial para aplicação na

área biomédica e de embalagens. Assim, no Quadro 1 é apresentado a sumarização dos trabalhos encontrados na literatura abordados nesta seção.

Quadro 1: Resumo dos trabalhos encontrados na literatura.

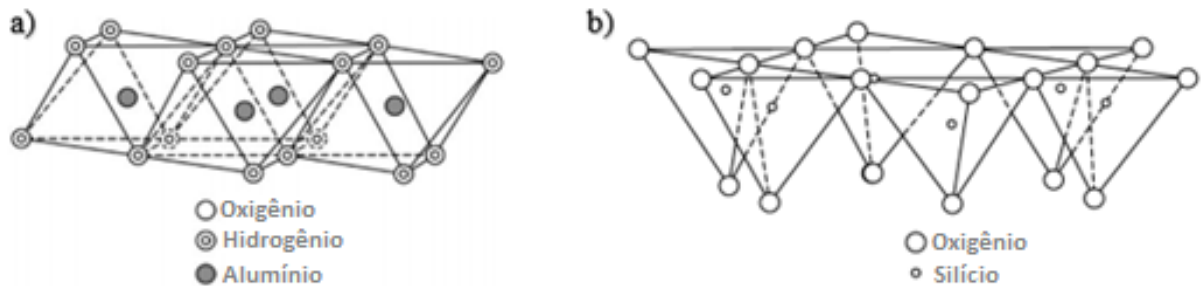
Nanocompósito	Percentual de argila (% em massa)	Efeitos das nanopartículas na matriz polimérica	Referência
PHBV/Kaol	5,0	Baixa dispersão e formação de aglomerado	Cabedo <i>et al.</i> ⁴⁵
PHBV/Mt	5,0	Boa dispersão e expansão na intergaleria	
PHBV/Kaol	3,0	Baixa dispersão e formação de aglomerados, aumento na estabilidade térmica e X_c	Da Costa <i>et al.</i> ²¹
PHBV/Hal	3,0	Formação de pequenos aglomerados, aumento na estabilidade térmica e X_c	
PHBV/Sep	3,0	Boa dispersão, formação de esferulitos menores, aumento na estabilidade térmica e X_c	
PHBV/Hal	2,5; 5,0; 10,0	Concentração de 2,5 e 5% apresentaram boa dispersão e aumento na T_p	Kennouche <i>et al.</i> ⁴⁹
PHBV/Hal	3,0	Aumento na T_m e na T_p	Hasan <i>et al.</i> ⁵⁰

2.3 NANOPARTÍCULAS DE ARGILA

As argilas são materiais naturais resultantes das alterações mecânicas e/ou químicas das rochas, compostas principalmente de minerais de granulometria fina, conhecidos como argilominerais, e impurezas, como hematita, goethita e matéria orgânica.^{22,51} Dependendo da área de estudo, a argila pode ter fração de sedimentos com partículas de diâmetro esférico equivalente a menor que 2 ou 4 μm .²²

Os argilominerais são minerais filossilicatos hidratados que podem proporcionar plasticidade à argila.^{22,51} Eles podem ser de origem natural ou sintética. Os filossilicatos são silicatos de Al, Fe, K, Ca e Mg hidratados que apresentam estrutura cristalina em camadas, as quais são constituídas pela alternância entre folhas bidimensionais tetraédricas e octaédricas (Figura 4).^{22,52,53}

Figura 4: Figura esquemática da estrutura (a) octaédrica e (b) tetraédrica. Adaptado de Murray.⁵³



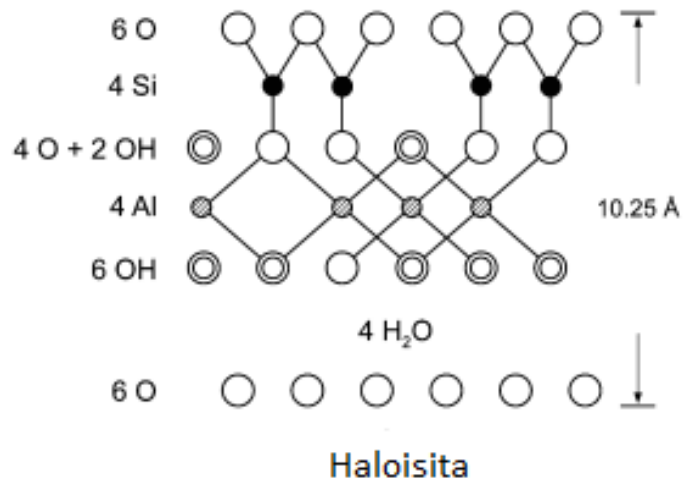
Os argilominerais apresentam estruturas e composições diferentes, mesmo cada um sendo composto por folhas bidimensionais. Dependendo do tipo de argilomineral, a estrutura pode ser do tipo 1:1 (uma folha tetraédrica e outra octaédrica) ou do tipo 2:1 (uma folha octaédrica entre duas folhas tetraédricas).^{53,54} A Kaol e Hal são exemplos de argilomineral do tipo 1:1 e a Mt e Sep do tipo 2:1.⁵⁴

As propriedades físicas e químicas de um determinado argilomineral dependem de sua estrutura e composição. De modo geral, as principais características das argilas são a anisotropia das camadas ou partículas, a estrutura de camada com espessura de cerca de 0,7 nm para o tipo 1:1 e 1 nm para o tipo 2:1, a existência de espaçamento basal na superfície externa e superfícies internas intercalares, o que facilita a modificação (a partir da adsorção, troca iônica ou enxerto), plasticidade, e algumas podem conferir endurecimento por secagem ou queima.⁵⁴ Devido às propriedades inerentes, como elevada área específica, intumescimento, boa adsorção e capacidade de difusão de carga, as argilas têm atraído atenção na área da ciência.^{54,55}

2.3.1 Haloisita

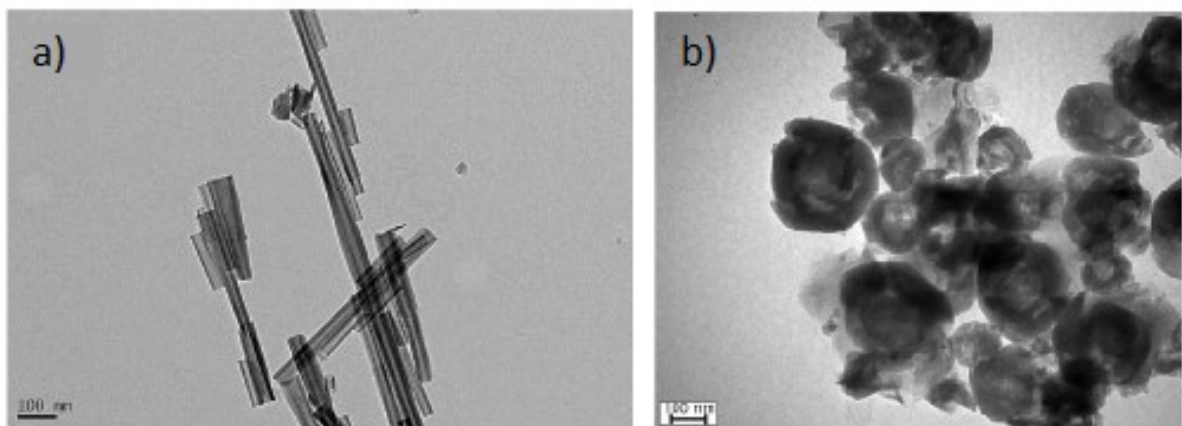
Haloisita é um argilomineral dioctaédrico de razão 1:1 (Al:Si) do grupo Caulim, com estequiometria $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, onde $n = 0$ e 2 , respectivamente, para a haloisita desidratada (com espaçamento basal $d_{001} = 7 \text{ \AA}$) e haloisita hidratada (com espaçamento basal $d_{001} = 10 \text{ \AA}$). As unidades da camada na haloisita são separadas por uma monocamada de moléculas de água (Figura 5), a qual atua na redução da interação eletrostática entre camadas adjacentes e facilita a curvatura das camadas para diminuir a diferença da dimensão das folhas tetraédricas de silício e octaédrica de alumina.^{53,56}

Figura 5: Estrutura da haloisita hidratada. Adaptado de Murray.⁵³



A haloisita pode apresentar duas morfologias, tubular ou esférica (Figura 6), de acordo com as condições de cristalização e geologia, sendo a haloisita tubular a mais comum.^{56,57} Em um estudo realizado por Pasbakhsh *et al.*⁵⁷ com haloisita tubular de diferentes locais e ambientes geológicos, foi observado que as partículas eram cilíndricas e abertas, apresentavam diâmetro externo entre 20-200 nm, diâmetro interno de 5-70 nm e comprimento entre 50-5000 nm.

Figura 6: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (a) haloisita tubular⁵⁷ (b) haloisita esferoidal.⁵⁸



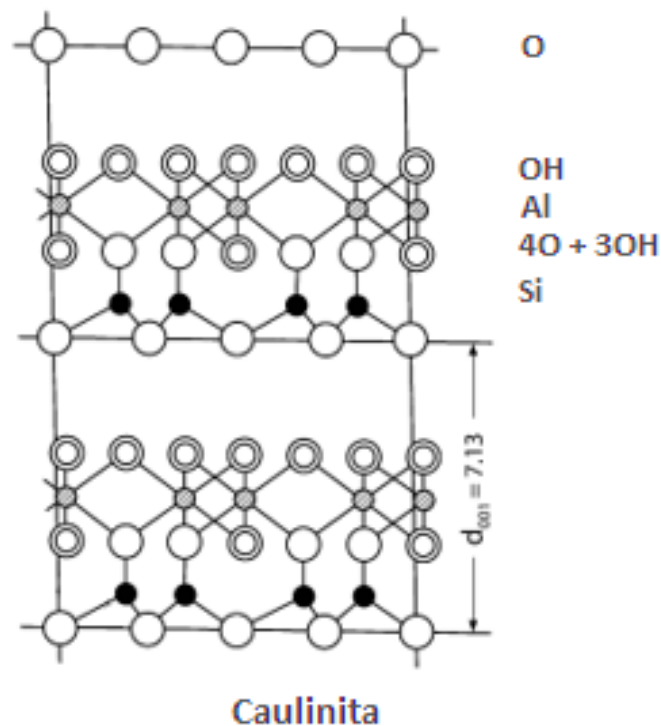
A haloisita tubular possui estrutura porosa, incluindo o lúmen cilíndrico na faixa de 2-50 nm, além de apresentar como propriedade física uma elevada área específica (50-80 m² g⁻¹), uma razão de aspecto de 10-50, e capacidade de troca catiônica (CEC) na faixa de 2-60 mmol/100 g.^{56,57} Devido a essas propriedades, juntamente com a disponibilidade de grupos

hidroxilas (OH) na sua estrutura, boa dispersão e interação com matriz polimérica hidrofílica, baixo impacto ambiental e à saúde,⁵⁷ os nanotubos de haloisita tem despertado grande interesse na aplicação de nanotecnologia, principalmente na formação de nanocompósitos^{50,59,60} e como recipiente de encapsulamento (usado para armazenar e controlar a liberação de agentes ativos).⁶¹⁻⁶³

2.3.2 Caulinita

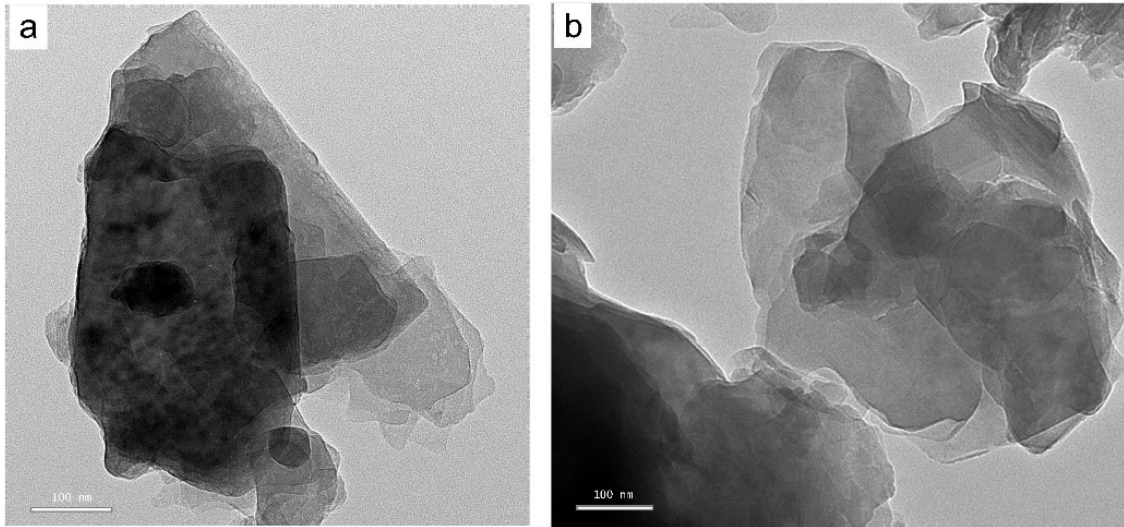
Caulinita é um aluminossilicato laminar de estrutura de camada dioctaédrico 1:1, distribuída por folha tetraédrica de Si-O ligada à folha octaédrica de alumina através de ligação de hidrogênio. A espessura da camada unitária é cerca de 7 Å (Figura 7). A sua fórmula molecular é $\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ e composição química teórica é 46,54% de SiO_2 , 39,50% de Al_2O_3 e 13,96% de H_2O .^{53,64}

Figura 7: Estrutura esquemática da caulinita. Adaptado de Murray⁵³



A caulinita apresenta morfologia em placas hexagonais ou pseudo-hexagonais em formas empilhadas (Figura 8). Pode conter partículas com tamanho micrométrico ou sub-micrométrico na faixa de 0,2 a 4,0 μm e espessura na ordem de 50-100 nm.⁶⁴⁻⁶⁶

Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, com escala de 100 nm, da caulinita.⁶⁷



Além disso, apresenta uma baixa capacidade de troca catiônica, na faixa de 1 a 15 mmol/100 g, uma área específica na faixa de 5-39 m² g⁻¹, e capacidade de adsorção de íons ou moléculas.^{56,68} A caulinita geralmente apresenta carga de superfície líquida neutra, no entanto, pequenas cargas negativas podem se desenvolver nas bordas da estrutura, que podem fornecer reatividade à caulinita.⁶⁹

2.4 EMBALAGENS ATIVAS

Embalagem ativa para alimentos é definida como um material que contém aditivos incorporados a fim de estender a vida útil dos produtos, reduzir o desperdício e melhorar a segurança alimentar.⁶² Essas embalagens se baseiam em propriedades intrínsecas do polímero ou nas propriedades do aditivo.⁶⁰

Ela atua através da interação com o alimento ou seu meio a partir dos processos de transferência de massa, que podem ocorrer via a migração, adsorção, absorção e permeação. No processo de migração, os compostos ativos, como os antioxidantes e antimicrobianos incluídos na matriz polimérica, podem ser transferidos para o produto ou o meio entre eles. No processo de adsorção, a embalagem tem a capacidade de capturar gases emitidos pelo alimento ou presente no espaço vazio entre este e o polímero, e esses gases são adsorvidos na superfície do polímero. Já na absorção, esses compostos são absorvidos na matriz polimérica. A permeação envolve a difusão de moléculas na forma líquida ou gasosa através da matriz polimérica.⁷⁰

A embalagem pode ser classificada de acordo com a propriedade desempenhada, como embalagem antimicrobiana, antioxidante, controladora dos níveis de etileno, oxigênio, umidade, absorvedora de sabores e odores, entre outras.⁷¹ Estudos relacionados à adição de agentes antimicrobianos para a produção de embalagem de alimento, principalmente os conservantes naturais, tem se desenvolvido a fim de aumentar a qualidade e prolongar a vida útil do alimento embalado.

Requena *et al.*⁷² avaliou o efeito antimicrobiano de filmes PHBV contendo eugenol e carvacrol, componentes presentes no óleo essencial de orégano e cravo, respectivamente, em cepas de *E. coli* e *L. innocua* em um período de seis dias, e observou que todos os filmes ativos tiveram efeito antimicrobiano significativo contra *E. coli* em amostras de queijo, carne de frango e abóbora. Em outro trabalho, produzido por Biddeci *et al.*⁹ no qual primeiro incorporou o óleo essencial de menta em nanotubos de haloisita para depois produzir compósito com pectina, foi observado que além da melhora no desempenho mecânico e na hidrofobicidade superficial do filme de pectina, a embalagem ativa apresentou uma liberação mais controlada dos aditivos antimicrobianos e uma boa inibição de microrganismos patogênicos, *E. coli* e *S. aureus*, em altas temperaturas.

Jang *et al.*⁷³ produziram embalagens de alimento contendo nanopartículas de argila carregada com óleo essencial de tomilho (OET). Observaram que a embalagem com nanotubos de haloisita carregadas com OET apresentou uma eficaz inibição do crescimento da bactéria *E. coli* durante um período de 10 dias. Essa inibição é devido à liberação rápida de cerca de 60% de OET durante esse período. Após 10 dias, observaram que o crescimento da população de bactérias aumentava rapidamente em consequência da baixa concentração (20%) e lenta liberação de OET no meio.

Hendessi *et al.*¹³ avaliaram a atividade antimicrobiana da embalagem ativa de poliuretano com nanotubos de haloisita carregados com carvacrol contra cepa bacteriana de *Aeromonas hydrophile*. Além do efeito de inibição do crescimento bacteriano contra *A. hydrophile*, os filmes apresentaram efeito de redução das células bacterianas entre 54-97% das células, durante 45 dias sob um recipiente hermético à temperatura ambiente. Esse efeito prolongado foi justificado pelos autores como resultado da liberação controlada de carvacrol ao longo do período de teste.

2.4.1 Óleos essenciais como agentes antimicrobianos

Os óleos essenciais (OE) são uma mistura de compostos orgânicos aromáticos e voláteis de consistência oleosa normalmente obtidos a partir de ervas e especiarias, que são produzidos como metabólitos secundários para desempenhar papel de defesa na planta.^{62,74} Várias técnicas – como destilação de água ou vapor, extração por solvente, prensagem a frio, entre outras – são utilizados para extraí-los de diferentes partes da planta aromática.⁷⁴

Na composição do óleo essencial, dois ou três componentes principais podem constituir até 85% do óleo.^{72,75} Quimicamente, os OE contêm compostos voláteis que são principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, como álcoois, ácidos, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas e fenóis.⁷⁵ A composição e qualidade dos OE depende da espécie, parte da planta utilizada e outros fatores, como cultivo, solo, condições climáticas, o tipo de extração, entre outros.⁷⁶

Estima-se que sejam conhecidos mais de 3000 tipos de óleos essenciais.⁷⁴ Alguns desses tipos, como o óleo essencial de orégano e de manjeriço, apresentam em sua composição compostos fenólicos (timol, carvacrol, eugenol e linolol) que proporcionam uma eficaz inibição do crescimento bacteriano.⁷² Essa inibição ocorre principalmente devido à natureza hidrofóbica dos óleos essenciais e de seus constituintes que interagem com as camadas lipídicas da membrana celular bacteriana, fazendo com que se rompam, inibindo efetivamente as propriedades funcionais da célula, e resultando no vazamento de íons e outros componentes celulares.^{9,77} Além disso, os compostos voláteis podem se ligar a estruturas proteicas da célula microbiana, causando alterações nos blocos de construção lipídica e proteica, resultando na inibição das proteínas enzimáticas e permeabilidade dos componentes celulares.^{76,77}

A utilização dos óleos e seus constituintes como aditivos vêm sendo crescente devido aos mesmos apresentarem propriedades antibacteriana, antifúngica, e antiviral, bem como propriedades inseticida e antioxidante. Além disso, são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (21CFR182.20), sendo considerados conservantes naturais aceitáveis pelo consumidor.

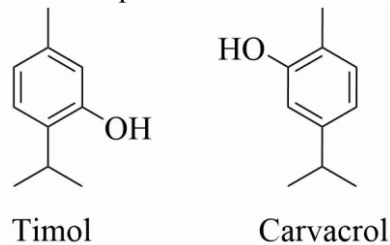
2.4.1.1 Óleo essencial de orégano

O óleo essencial de orégano é extraído da erva perene e aromática, comumente nomeada como orégano. Há uma variedade de espécies em todo o mundo que são denominadas

como orégano, sendo as mais comuns dos gêneros *Origanum Vulgare* e *Thymus Capitatus* (*Coridothymus Capitatus*), ambos pertencentes à família *Lamiaceae*.^{78,79}

A composição do óleo essencial de orégano, assim como outros tipos de óleos, dependerá da localização da coleta do material, condições climáticas durante o plantio e parte vegetal a ser extraída. De modo geral, os principais constituintes do *Thymus Capitatus* são carvacrol, timol, α -terpineol, acetato de carvacrol, γ -terpineno. Destes, o carvacrol ou timol (Figura 9) representam o maior percentual na composição do óleo, e são considerados os principais responsáveis pela propriedade antimicrobiana no óleo essencial.⁷⁸⁻⁸⁰

Figura 9: Compostos ativos presentes no óleo essencial de orégano.⁸¹



Bounatirou *et al.*⁷⁹ avaliaram a composição do óleo essencial da *Thymus capitatus* em diferentes fases do crescimento e observaram que o carvacrol foi o principal constituinte do óleo essencial, com cerca de 73%, 74% e 66% nas fases vegetativa, de floração e pós-floração, respectivamente, além de apresentar altos níveis de *p*-cimeno (5-17%), γ -terpineno (2-14%) e β -cariofileno (1-4%). O óleo essencial *Th. capitatus* das fases de floração e pós-floração demonstrou ser eficaz contra patógenos transmitidos por alimentos, como *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, e patógenos como *Staphylococcus aureus*. Além da propriedade antimicrobiana, o óleo essencial também apresentou propriedade antioxidante.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano (*Th. Capitatus*) também foi avaliada por Ehivet *et al.*⁸² em filmes de amido de batata-doce. O filme contendo 2 % (v/v) OE apresentou efeito inibitórios contra *Salmonella Enteritidis*, *E. coli* e *L. monocytogenes*, com zonas de inibição de $18,4 \pm 2,8 \text{ mm}^2$, $10,1 \pm 5,0 \text{ mm}^2$ e $9,0 \pm 4,7 \text{ mm}^2$, respectivamente.

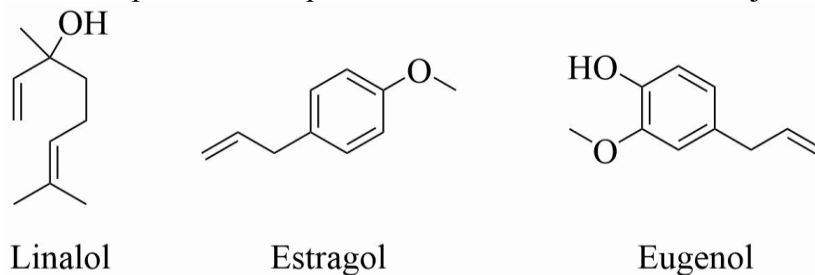
2.4.1.2 Óleo essencial de manjeriço

O óleo essencial de manjeriço (OEM) é extraído da planta aromática *Ocimum Basilicum L.*, popularmente conhecida como manjeriço, e pertencente à família *Lamiaceae*.⁸³

O gênero *Ocimum* compreende mais de 150 espécies, distribuídas por toda a região tropical da Ásia, África, América Central e do Sul, que diferem na composição química do óleo essencial.⁸⁴

De modo geral, os principais componentes presentes no OEM de *O. basilicum* são linalol, eugenol, metil eugenol, cinamato de metila, α -terpineol e estragol (também conhecido metil chavicol). Os constituintes menores compreendem pinheiros (α e β), α -bergamoteno, eucaliptol, terpinenos (α e γ), germacrene D, entre outros.^{75,83,84} Alguns desses compostos são considerados agentes antimicrobianos, como linalol, estragol e eugenol (Figura 10).

Figura 10: Compostos ativos presentes no óleo essencial de manjericão.^{85,86}



Em um estudo realizado por Baldim *et al.*⁷⁵ foi observado que as amostras de OEM, da espécie *Ocimum basilicum*, contendo elevada concentração de linalol (59,24 e 60,22%) apresentaram resultados antimicrobianos mais eficientes contra bactéria Gram-positiva (*Bacillus cereus*). No entanto, essa eficiência é devido à presença de linalol juntamente com outros constituintes com percentuais menores, como eugenol, terpinen-4-ol, visto que durante a ação antimicrobiana, o linalol aumentou a fluidez na membrana celular e alterou a permeabilidade celular, possibilitando que esses outros constituintes atingissem o citoplasma aumentando os danos ao patógeno.

Em um estudo realizado por Teneva *et al.*⁸⁷ foi observado que o metil chavicol (estragol) foi o principal constituinte do OEM, em torno de 36,81%, seguido por eugenol de metila (20,40%), β -linalol (14,35%) e eugenol (10,55%). O estudo comprovou atividade antibacteriana tanto para bactéria Gram-positiva quanto para Gram-negativa. No entanto, as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) foram mais sensíveis ao óleo essencial, enquanto que as bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*) foram menos sensíveis. Segundo os autores, isso é devido à diferença de composição e estrutura da parede celular dos dois grupos de bactérias, uma vez que a Gram-negativa tem uma membrana externa formada por lipopolissacarídeos e proteínas que revestem a camada de peptidoglicano. Além das bactérias, também foi estudada a atividade antifúngica

do OEM, onde foi possível observar um efeito inibitório contra os fungos *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*.

Amor *et al.*⁸⁸ relataram que filmes de quitosana contendo microcápsulas de OEM aumentaram e conferiram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. saprophyticus*, respectivamente. Assim, os filmes contendo microcápsulas de OEM, com diferentes concentrações (1%, 2% e 3% (m/v)), foram capazes de reduzir a viabilidade celular de ambas as cepas devido aos constituintes presentes no OEM. No Quadro 2 estão apresentados de forma sumarizada os trabalhos encontrados na literatura relatados nas seções 2.4.1.1 e 2.4.1.2.

Quadro 2: Principais componentes e propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e manjeriço.

Óleo essencial	Principal componente	Propriedade antimicrobiana	Referência
Orégano (<i>Thymus Capitatus</i>)	Carvacrol	Contra <i>Listeria innocua</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Samonella</i> , <i>S. aureus</i>	Bounatirou <i>et al.</i> ⁷⁹
Orégano (<i>Thymus Capitatus</i>)	-	Contra <i>Samonella enteritidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i>	Ehivet <i>et al.</i> ⁸²
Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>)	Linolol	Contra <i>Bacillus cereus</i>	Balidim <i>et al.</i> ⁷⁵
Manjeriço	Estragol	Contra <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Samonella sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	Teneva <i>et al.</i> ⁸⁷
Manjeriço	-	Contra <i>E. coli</i> e <i>S. saprophyticus</i>	Amor <i>et al.</i> ⁸⁸

2.5 MODIFICAÇÃO ORGÂNICA DE NANOPARTÍCULAS DE ARGILA

Um grande número de pesquisas vem crescendo na modificação de argilas com agentes ativos, como óleos essenciais e fármacos, a partir do encapsulamento ou adsorção, com ou sem o auxílio de surfactantes. Essa modificação da argila torna a liberação do composto ativo mais controlada, reduz a volatilização de óleos essenciais, além de garantir uma melhor dispersão polímero/argila.^{7,13,62} Alguns trabalhos relatam a adsorção de óleos essenciais na superfície de argilas a partir de um prévio tratamento alcalino ou ácido. Nakhli *et al.*⁶⁹ relataram que a

presença de grupos OH^- ou H^+ na superfície da caulinita favoreceram a adsorção de moléculas de sabineno, composto presente no óleo essencial de *Xylopiya aethiopica*, também conhecida como pimenta-da-África, uma vez que o tratamento da caulinita com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido sulfúrico (H_2SO_4) aumenta o caráter hidrofóbico desta argila e, conseqüentemente, aumenta a força de interação entre o adsorvente-adsorbato.

Em um outro estudo realizado por Lee *et al.*⁸⁹ foi observado que, após o tratamento com NaOH, a haloisita apresentou um aumento tanto no volume dos poros (de 0,17 para 0,22 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) quanto na área específica (de 31,1 para 62,8 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$). Foi também relatado um aumento de eficiência de encapsulação do óleo essencial de tomilho ($20,5 \pm 1,3\%$) quando comparado com a eficiência de encapsulação do óleo em argila sem tratamento ($15,4 \pm 1,0\%$). No ensaio de liberação do composto ativo em temperatura ambiente relatado nesse estudo, a haloisita tratada liberou de forma rápida em torno 40% do óleo nos três primeiros dias, devido ao aumento dos poros da nanopartícula, e de forma lenta no restante dos 18 dias de ensaio, devido à existência de óleo entre as camadas, demonstrando assim um bom desempenho tanto na incorporação quanto na liberação controlada do agente ativo.

A modificação das nanopartículas de argila, principalmente Hal, a partir do encapsulamento do agente ativo também pode ocorrer por processo a vácuo. O carregamento se baseia na difusão de moléculas em solução externa nos poros presentes nas nanopartículas devido ao gradiente de concentração.⁹⁰ Em um estudo realizado por Hendessi *et al.*¹³ da modificação de nanotubos de haloisita com carvacrol a partir do tratamento a vácuo resultou em $39,3 \pm 1,2 \%$ de eficiência de carregamento. No entanto, os autores alegam que esse valor alto pode estar relacionado não somente à presença de carvacrol no lúmen, mas também na superfície externa da argila. Assim, para saber o conteúdo no lúmen, as nanopartículas modificadas foram lavadas com etanol e a eficiência passou para $8,1 \pm 0,2 \%$. Além disso, em uma avaliação de liberação do composto ativo a partir da TGA em condições isotérmicas foi observado que as nanopartículas carregadas com carvacrol apresentaram perda gradual de massa de aproximadamente 17%, com uma liberação mais rápida na primeira hora, devido à liberação de carvacrol adsorvida à superfície, e uma taxa de liberação mais controlada ao restante do tempo.

No mesmo estudo, foi realizada a modificação das nanopartículas a partir de tratamento ultrassônico seguido por processo a vácuo. Foi observada uma melhor incorporação do carvacrol nas nanopartículas, obtendo eficiência de $47,8 \pm 1,8\%$ e, após a lavagem, de $18,4 \pm 1,6\%$. Em outro estudo utilizando a mesma metodologia, Tas *et al.*⁹¹ confirmaram que o

processo com a lavagem com etanol apresenta uma eficiência de 15% em massa de carregamento de carvacrol.

Em um estudo realizado por Saucedo-Zuñiga *et al.*⁹² Hal e Mt foram modificadas com solução saturada de etanol e óleo essencial de laranja (OEL) ou tomilho (OET) utilizando processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo. Eles observaram a partir da análise de difração de raios X (DRX) que a presença de OE nas argilas promoveu um aumento no espaçamento da interlamelar de 0,67 para até 0,80 nm para Hal e de 2,1 até 3,3 nm para Mt. Segundo os autores, a interação entre a argila e OE, principalmente OET, pode estar promovendo uma esfoliação de argila e a intercalação de OE dentro das galerias.

O aumento na distância interlamelar também foi observado por Proença *et al.*⁹³ Neste estudo, primeiramente a Mt e o óleo essencial de melaleuca foram homogeneizados por Ultraturrax[®] para depois passar pelo processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo. Os autores observaram um aumento na distância interlamelar após a modificação com OE, passando 2,55 nm para 3,53 nm na amostra contendo 10 g de OE e 4,01 nm na amostra contendo 20 g de OE.

Em um estudo realizado por Giannakas *et al.*⁹⁴ foi proposto a modificação da Mt com OEO, OEM e OET a partir do processo de evaporação do OE e adsorção na superfície da Mt, uma vez que esta é um material poroso inorgânico com capacidade de intumescimento e elevada área superficial. Os autores observaram que após a modificação as argilas apresentaram cerca de 5% a 15% em massa de OE adsorvido, e as amostras com maior teor de OE no início do processo tiveram maiores percentuais de OE adsorvido na superfície da argila. Além disso, também foi observado que ao utilizar a Mt modificada com dimetildialquilamina, a adsorção do OE proporcionou um aumento no espaçamento interlamelar da argila, comprovada por DRX, sugerindo que o OE foi incorporado na superfície interna da argila a partir da interação entre os grupos aromáticos do OE e os grupos amina presente na argila. Já a Mt pura modificada com OE não apresentou alteração no espaçamento basal da argila, indicando que a adsorção foi na superfície externa da argila a partir de ligações de hidrogênio dos grupos OH do OE com os grupos OH da superfície externa da Mt.

Outro estudo foi realizado por Essifi *et al.*⁹⁵ também utilizando o processo de evaporação/adsorção de óleo essencial de tomilho, timol e carvacrol em Mt, porém utilizando uma temperatura de 30 °C no processo. Neste estudo, o processo resultou em uma adsorção de aproximadamente 28,5%, 18,5%, e 17% em massa, respectivamente, de OET, timol e carvacrol na superfície da Mt. No entanto, assim como Giannakas *et al.*⁹⁴ a adsorção do composto ativo

ocorreu na superfície externa argila através da interação eletrostática entre adsorvente-adsorbato, uma vez que os resultados de padrão de DRX não apresentaram variações significativas no espaçamento basal entre a Mt modificada e Mt pura.

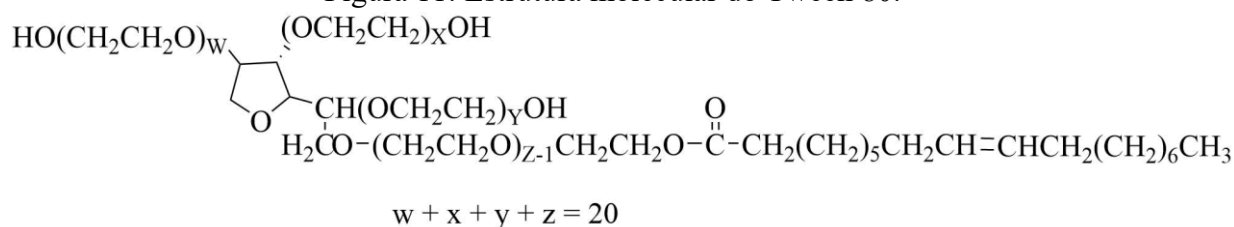
Visando obter embalagens ativas com resultados significativos no mecanismo de ação, assim como também no efeito antimicrobiano, optou-se pela modificação das nanopartículas de caulinita e haloisita com óleo essencial de orégano e manjeriço. Metodologias tradicionais utilizadas para incorporar aditivos na matriz polimérica obtiveram um curto período de tempo na liberação do composto ativo. Portanto, modificar previamente as nanopartículas de argila com o composto ativo para depois incorporar à matriz polimérica pode permitir uma taxa de liberação da molécula ativa mais controlada, fazendo com que este estudo possa contribuir para a ampliação do uso de polímeros e inovação na área da indústria alimentícia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

O PHBV foi fornecido pela Ningbo Tianan Biologic Material Co., Ltd. (ENMAT Y 1000) com uma massa molar viscosimétrica média de $450.000 \text{ g mol}^{-1}$ e um teor de valerato de 3,4 %mol (estimado por espectroscopia RMN ^1H em solução - CDCl_3). As nanopartículas de argila haloisita (Hal) na forma de pó, umidade de 4,01%, capacidade de troca catiônica (CEC) de 8 meq g^{-1} e densidade $2,53 \text{ g cm}^{-3}$, as nanopartículas de caulinita natural (Kaol) na forma de pó, com umidade de 0,27%, com CEC igual a 12 meq g^{-1} e densidade de $2,53 \text{ g cm}^{-3}$; o óleo essencial de orégano (OEO), com temperatura de ebulição em $239 \text{ }^\circ\text{C}$, densidade de $0,939 \text{ g mL}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e composição majoritária de 3-metil-4-isopropilfenol (estimada por cromatografia gasosa acoplado ao detector por espectrometria de Massa (CG/MS)- Apêndice A); o óleo essencial de manjerição (OEM), com temperatura de ebulição 215°C , densidade de $0,956 \text{ g mL}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e composição majoritária de estragol (1-metoxi-4-prop-2-enilbenzeno) (estimada por cromatografia gasosa acoplado ao detector por espectrometria de Massa (CG/MS) - Apêndice A); o Tween 80 (Figura 11), líquido viscoso não-iônico com $\geq 58\%$ de ácido oleico (ácido (Z)-octadec-9-enóico), temperatura de ebulição em $100 \text{ }^\circ\text{C}$, pH entre 5,5 – 7,5, densidade de $1,064 \text{ g mL}^{-1}$, concentração micelar crítica (CMC) de $0,012 \text{ mmol L}^{-1}$ ($20\text{-}25^\circ\text{C}$) e equilíbrio hidrofílico-lipofílico em 15; o álcool etílico 95% PA ACS (etanol), densidade de $0,789 \text{ g mL}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pressão de vapor $44,6 \text{ mmHg}$ a 20°C e temperatura de ebulição 78°C , foram todos obtidos da Sigma-Aldrich.

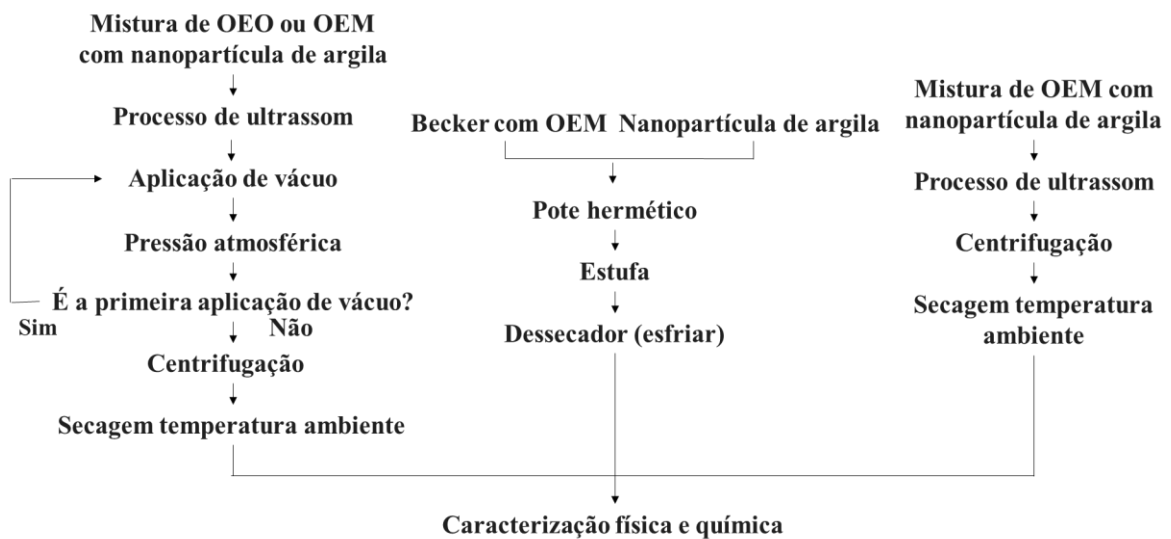
Figura 11: Estrutura molecular do Tween 80.



3.2 MODIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ARGILA COM ÓLEO ESSENCIAL

As técnicas de modificação das nanopartículas de Kaol e Hal com OE a partir dos métodos de ultrassom seguido de vácuo (U), evaporação/adsorção (EA) e Ultra-Turrax® (UT), estão descritas nesta seção e esquematizada na Figura 12.

Figura 12: Imagem esquemática das três metodologias utilizadas para modificação das nanopartículas de argilas com OE.

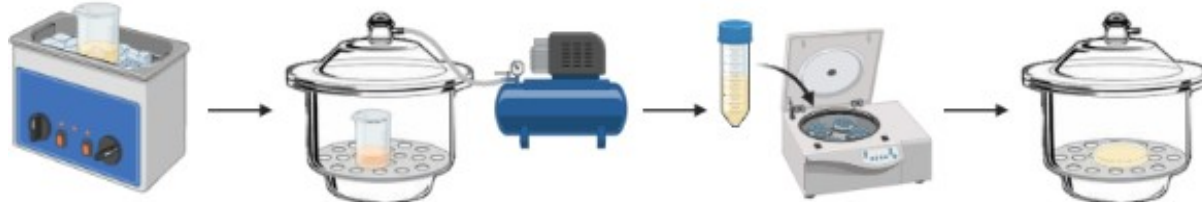


3.2.1 Processo de ultrassom seguido de vácuo

As modificações das nanopartículas de argila com OEO e OEM a partir do processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo foram realizadas conforme descrito em Hendessi *et al.*¹³ com algumas alterações. A Figura 13 traz um esquema ilustrativo do processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo. Primeiramente, foram misturadas nanopartículas de argila (Hal ou Kaol) com de OE na proporção de 1:10 em massa. Em seguida, a mistura foi submetida ao processo de ultrassom por 30 min, utilizando um equipamento Ultrassônico Elma S40H (Elmasonic) com a função de pulso *degas* em banho de gelo. A amostra foi transferida para um dessecador conectado a uma bomba a vácuo. Submeteu-se a mesma a uma pressão de 30 mmHg por 30 min. Em seguida, mantendo a amostra no dessecador, foi removido o vácuo e deixada a mesma sob pressão atmosférica por 10 min. O ciclo foi repetido mais uma vez a fim de aumentar a eficiência de incorporação. A fase sólida na suspensão foi separada por centrifugação a 7000 rpm por 5 min e o excesso de óleo essencial foi removido. As amostras

foram secas à temperatura ambiente em dessecador com sílica sob vácuo por 4 dias antes das análises (amostras Hal/OEO_U, Kaol/OEO_U, Hal/OEM_U e Kaol/OEM_U).

Figura 13: Esquema ilustrativo do Processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo.



Fonte: Do autor, criado com BioRender.com.

Em seguida foram realizadas seis variações do processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo, sendo estas:

- Na primeira variação, foi adicionado Tween 80 (T80) na mistura de nanopartículas de argila e OEO na proporção de argila:OEO:T80 de 1:10:10 em massa (amostras Hal/OEO/T80_U e Kaol/OEO/T80_U);

- Na segunda variação, foi adicionada metade da quantidade de Tween 80 da primeira variação (proporção de argila:OEO:T80 de 1:10:5 em massa) (Hal/OEO/0.5T80_U e Kaol/OEO/0.5T80_U);

- Na terceira variação, foi alterada apenas a proporção de argila:OEO para 1:20 em massa (amostras Hal/2OEO_U e Kaol/2OEO_U);

- Na quarta variação, as nanopartículas de argilas foram previamente secas a 150 °C por 3 h em estufa com circulação e renovação de ar (NI 1513-CR, NOVA INSTRUMENTS), e submetidas ao processo de ultrassom com aquecimento de 50 °C (amostras Hal/OEO_U.Δ e Kaol/OEO_U.Δ);

- Na quinta variação, a proporção de argila:OE foi alterada para 1:4 em massa (amostras Hal/0.4OEO_U, Kaol/0.4OEO_U, Hal/0.4OEM_U e Kaol/0.4OEM_U);

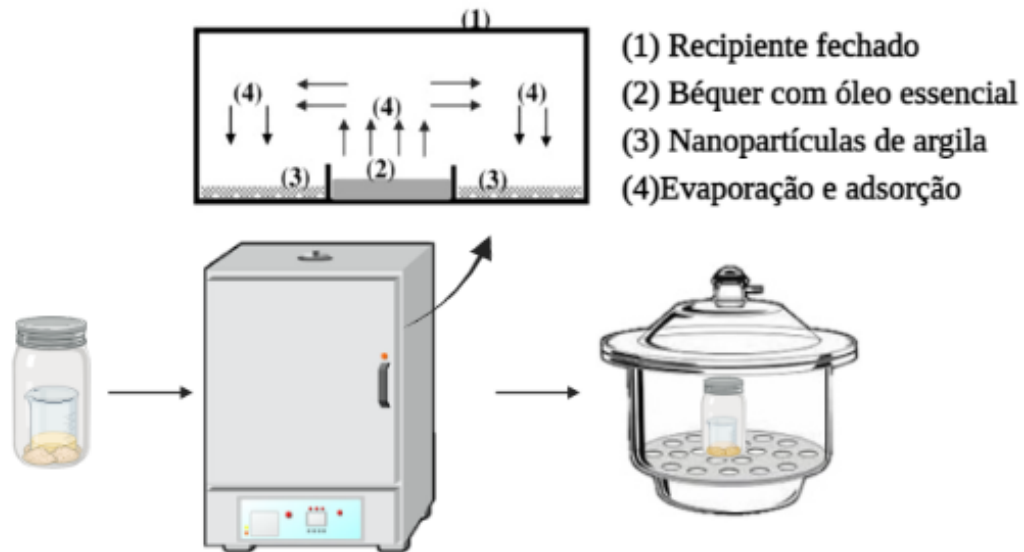
- Na sexta variação, foi adicionado etanol na mistura de argila e OEM na proporção de argila:OEM:etanol de 1:4:1 (amostras Hal/0.4OEM/EtOH_U e Kaol/0.4OEM/Et_OH_U).

3.2.2 Processo de evaporação/adsorção (EA)

O método de evaporação/adsorção, esquematizado na Figura 14, foi realizado conforme descrito em Giannakas *et al.*⁹⁴ com algumas alterações. As nanopartículas de argila (Kaol ou Hal) foram espalhadas em um recipiente de vidro hermético de forma equitativa. No

meio do recipiente, foi colocado um béquer e preenchido com OEM. Em seguida, colocou-se a amostra em estufa com circulação e renovação de ar a 120 °C por 24 h. Após resfriadas, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente. Nesta metodologia, a proporção de argila e OEM foi de 1:4 em massa (amostras Hal/0.4OEM_E.A e Kaol/0.4OEM_E.A).

Figura 14: Esquema ilustrativo do Processo de evaporação e adsorção. Adaptado Giannakas *et al.*⁹⁴

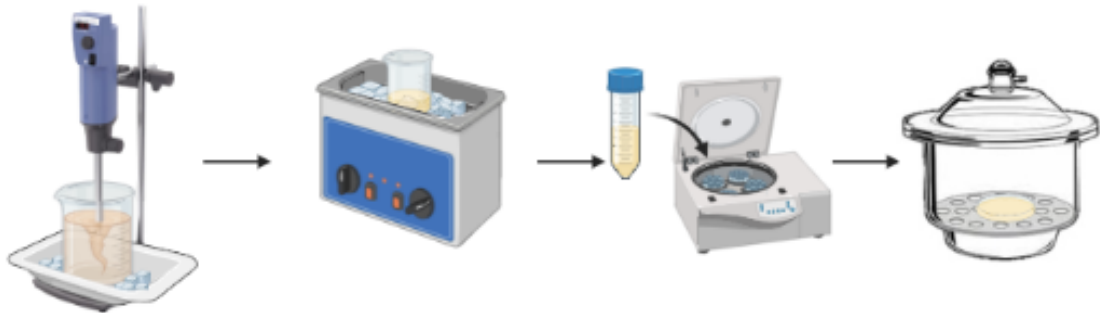


Fonte: Do autor, criado com BioRender.com.

3.2.3 Processo Ultra-turrax® (UT)

O processo, esquematizado na Figura 15, foi realizado de acordo com Proença *et al.*⁹³ com algumas alterações. A mistura de argila:OEM:etanol foi dispersa água destilada na proporção de 1:4:1:50 em massa. Em seguida, a dispersão foi agitada por 1 min utilizando um equipamento Ultra-turrax® (T 18 DI com elemento de dispersão S 18 N) a 19000 rpm em um ambiente fechado e sob banho de gelo. A suspensão foi submetida ao processo de ultrassom por 30 min sob banho de gelo. Em seguida, amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 5 min e retirado o sobrenadante. A amostra foi colocada para secar em um dessecador com sílica sob vácuo por 4 dias em temperatura ambiente (amostras Hal/0.4OEM_E.A e Kaol/0.4OEM_E.A).

Figura 15: Esquema ilustrativo do Processo Ultra-turrax®.



Fonte: Do autor, criado com BioRender.com.

Na Tabela 1 estão descritas de forma resumida as nomenclaturas das amostras de argila modificada de acordo com cada metodologia e as proporções de cada constituinte empregado na modificação.

Tabela 1: A nomenclatura e proporção em massa das nanopartículas modificadas com OE pelos processos de ultrassom seguido de aplicação de vácuo (U) ou evaporação/adsorção (EA) ou Ultra-Turrax® (UT).

Amostras	Processos	Hal	Kaol	OE	Tween 80	Etanol
Hal/OEO_U		1	-	10	-	-
Kaol/OEO_U		-	1	10	-	-
Hal/OEM_U		1	-	10	-	-
Kaol/OEM_U		-	1	10	-	-
Hal/OEO/T80_U	Ultrassom seguido de aplicação de vácuo	1	-	10	10	-
Kaol/OEO/T80_U		-	1	10	10	-
Hal/OEO/0.5 T80_U		1	-	10	5	-
Kaol/OEO/0.5T80_U		-	1	10	5	-
Hal/2OEO_U		1	-	20	-	-
Kaol/2OEO_U		-	1	20	-	-
Hal/OEO_U.Δ*		1	-	10	-	-
Kaol/OEO_U.Δ*		-	1	10	-	-
Hal/0.4OEO_U		1	-	4	-	-
Kaol/0.4OEO_U		-	1	4	-	-
Hal/0.4OEM_U		1	-	4	-	-
Kaol/0.4OEM_U		-	1	4	-	-
Hal/0.4OEM/ EtOH_U		1	-	4	-	1
Kaol/0.4OEM EtOH_U		-	1	4	-	1
Hal/0.4OEM_EA	Evaporação/	1	-	4	-	-
Kaol/0.4OEM_EA	Adsorção	-	1	4	-	-
Hal/0.4OEM_UT	Ultra-	1	-	4	-	1
Kaol/0.4OEM_UT	Turrax®	-	1	4	-	1

*O símbolo Δ significa o processo de ultrassom com aquecimento

3.3 PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS

A partir dos resultados obtidos da caracterização das nanopartículas de argila modificadas com OE, a amostra Hal/OEO_U foi escolhida para ser incorporada na matriz polimérica de PHBV, visto que essa apresentou melhores resultados de incorporação do OEO e taxa de evaporação do OE mais controlada.

Os nanocompósitos poliméricos foram preparados por meio de mistura no estado fundido.²¹ Primeiramente, o PHBV em pó foi seco a 80 °C por 6 h em estufa com circulação de ar. Posteriormente, cada amostra – PHBV puro e misturas de PHBV com 3% (em massa) de argila e 8% (em massa) de óleo essencial (misturados diretamente ou utilizando argila previamente modificada) – foi adicionada em um misturador interno (Roller-Rotors R600 - Rheomix 6002C) a uma velocidade de 100 rpm a temperatura de 165 °C – para as amostras que contêm OEO – e a 170°C – para o filme de PHBV puro – por 6 min. Em seguida, todos os materiais foram fragmentados utilizando moinho de facas (Solab SL-32). Por último, filmes foram moldados por compressão em uma prensa hidráulica (Solab SL-11). O material (3,5 g) foi aquecido a 190 °C por 90 s sem aplicação de pressão e mais 30 s a uma pressão de 1 t para formação do filme. A Tabela 2 apresenta a composição de cada filme e o código de identificação utilizado em cada condição.

Tabela 2: Composição dos filmes poliméricos

Amostra	PHBV (g)	Hal (g)	OEO (g)	Hal/OEO_U
PHBV	50,0	-	-	-
PHBV/OEO	46,0	-	4,0	-
PHBV/Hal/OEO	44,5	1,5	4,0	-
PHBV/Hal/OEO_U	47,3	-	-	2,7*
PHBV/Hal/OEO_U / OEO	44,5	-	2,8**	2,7

* quantidade equivalente a 1,5 g de argila (3%*m*)

** quantidade adicionada para totalizar 4,0 g de OEO na mistura (8%*m*)

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

As técnicas de caracterização empregadas, assim como os equipamentos utilizados na caracterização dos materiais obtidos, estão descritas nesta seção.

3.4.1 Caracterização química

A modificação química das nanopartículas de argilas foi investigada a partir da análise de FTIR por reflectância total atenuada (FTIR-ATR) e análise elementar. As análises de FTIR-ATR foram realizadas em um espectrômetro PerkinElmer Frontier, presente na UFSC, na faixa de número de onda de 4000 a 450 cm^{-1} , com resolução 4 cm^{-1} e 16 varreduras. A análise elementar foi realizada a partir do equipamento analisador elementar CHNS/O PerkinElmer PE 2400 series II pertencente a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para a caracterização da estrutura química dos nanocompósitos também foi utilizada a técnica de FTIR-ATR, com o mesmo equipamento e parâmetros descritos anteriormente. Neste caso, a comparação entre os espectros permite apenas a análise qualitativa das bandas da matriz polimérica. Para a análise quantitativa dos espectros, os resultados de transmitância dos filmes preparados foram normalizados em um intervalo de 1 a 100%. Os gráficos de cada amostra foram construídos de modo que os valores de transmitância das amostras fossem comparados com o filme de PHBV puro com auxílio de uma regressão linear pelo método de mínimos quadrados, obtendo os valores do coeficiente de determinação (R^2) e do erro médio quadrático (RMSE).²¹

3.4.2 Estrutura e morfologia

O espaçamento basal das nanopartículas de argila modificadas foi determinado pela técnica de difração de raios X pelo método do pó em um difratômetro Rigaku MiniFlex600 DRX presente no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN) – UFSC. Para a análise, foi utilizada radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, 40 kV e 15 mA) em um intervalo de $1^\circ < 2\theta < 80^\circ$ e passo de $10^\circ \text{ min}^{-1}$. O espaçamento basal da nanopartícula de argila foi determinado pela Lei de Bragg (Equação 1):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Equação 1}$$

Onde: n é um inteiro, λ é o comprimento de onda de raios X (nm), d é a distância interplanar (nm), e θ é o ângulo de difração (graus).

A morfologia das nanopartículas modificadas com óleo essencial foi avaliada via microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para este estudo, foi utilizado o equipamento

JEOL JSM-6390LV, presente no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC, operando a uma tensão de 10 kV com ampliação 2500 e 10000 vezes. Antes da observação, as amostras foram colocadas em um porta amostra com fita de carbono e metalizadas com ouro.

3.4.3 Teste de evaporação do óleo essencial

O teste de evaporação do óleo essencial incorporado nas nanopartículas de argila foi realizado conforme descrito em Bernardos *et al.*⁹⁶ com algumas alterações. A taxa de evaporação foi monitorada a 25 °C (temperatura adequada para o crescimento de fungos) e a 37 °C (temperatura adequada para o crescimento bacteriano). No teste, 60 mg das amostras modificadas (Hal/OEO_U, Kaol/OEO_U, Hal/OEM_U e Kaol/OEM_U), correspondendo a aproximadamente 24 mg de OEO puro, foram pesados em placa de Petri, em duplicata. As mudanças de massa foram monitoradas após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 dias para 25 °C e após 1, 3, 5, 7, 9, 24, 26, 28, 30 e 32 h para 37 °C. A mudança de massa de cada amostra expressa como a porcentagem do composto evaporado foi calculado usando a taxa de evaporação média das duas repetições.

3.4.4 Propriedades térmicas

As nanopartículas de argila pura e modificadas foram caracterizadas por análise termogravimétrica (TGA) para determinação do percentual de incorporação de óleo essencial e temperatura máxima de degradação. Para a análise foram utilizados dois equipamentos – PerkinElmer TGA 8000 e TGA QA-50, pertencentes a UFSC e Universidade Caxias do Sul (UCS), respectivamente. Para o primeiro equipamento, as nanopartículas puras e modificadas, Tween 80 e o OE foram aquecidos de 30 a 900°C a uma taxa de 20 °C min⁻¹ sob atmosfera de argônio, com vazão de 20 mL min⁻¹. No segundo, as nanopartículas modificadas com óleo essencial foram aquecidas de 0 a 910°C a uma taxa de 10°C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio, com vazão de 50 mL min⁻¹. A eficiência de incorporação (EI) foi calculada a partir da Equação 2, sendo a perda de massa obtida de acordo com as temperaturas correspondentes determinadas experimentalmente por TGA.

$$EI (\%) = 100\% - (Massa (\%)) \quad \text{Equação 2}$$

A estabilidade térmica e a temperatura máxima de degradação dos nanocompósitos poliméricos foram avaliadas por TGA, utilizando o equipamento PerkinElmer TGA 8000 pertencente a UFSC e seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, com alteração na temperatura de aquecimento de 30 a 700°C.

As características de cristalização dos nanocompósitos foram investigadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) utilizando o equipamento NETZSCH DSC 214 *Polyma*, pertencente a UFSC. As amostras foram analisadas de 40 °C a 200 °C a uma taxa de aquecimento e resfriamento de 10°C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹). A história térmica das amostras foi apagada por um ciclo de aquecimento preliminar a 10 °C min⁻¹. As medidas foram realizadas no primeiro ciclo de resfriamento e no segundo ciclo de aquecimento. O grau de cristalinidade (X_c) foi determinado a partir da Equação 3:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{f_p \cdot \Delta H_m^0} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde ΔH_m (J g⁻¹) é a entalpia de fusão da matriz polimérica, f_p é a fração em massa do polímero na amostra e ΔH_m^0 é a entalpia de fusão do PHBV cristalino puro, cujo valor é 146 J g⁻¹.⁴⁰

3.4.5 Permeabilidade ao oxigênio

A permeabilidade ao oxigênio foi estudada a fim de verificar a influência Hal na propriedade de barreira nos filmes de PHBV preparados. O teste foi conduzido a 23 °C com fluxo de oxigênio de 100 cm³ min⁻¹, de acordo com a norma ASTM F1927-07. O equipamento utilizado foi o L100-5000 Systech Illinois, presente na UCS. Os dados coletados são referentes à permeabilidade ao oxigênio (PO_2) em mL m⁻² dia⁻¹. Os resultados para cada filme são obtidos após a medida de espessura média dos filmes (l), em mm, conforme a Equação 4, obtendo-se o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$), em mL mm m⁻² dia⁻¹.

$$P'O_2 = PO_2 \times l \quad \text{Equação 4}$$

3.4.6 Ensaios de liberação do óleo essencial

Para realização dos ensaios de liberação do OEO dos filmes em meio simulador de alimentos, foi primeiramente obtida a curva de calibração a partir da regressão linear da curva de concentração *versus* absorbância. A curva de calibração foi construída a partir da análise de espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), usando soluções de OEO de concentrações de 0,002 - 0,2 mg mL⁻¹ e com varreduras de absorbância entre 200 a 400 nm.⁹¹

Para a determinação da taxa de liberação do óleo essencial de orégano dos filmes foi considerado apenas um dos tipos de simuladores alimentares, de acordo com o Regulamento n° 10/2011 da União Europeia: B (ácido acético 3% (v/v)) que simula alimentos com pH inferior a 4,5, como leites fermentados, natas, sucos contendo polpa de fruta, queijos em conserva aquoso (queijos frescos e muçarela).⁹⁷ Assim, as amostras de filmes (150 mg) foram colocadas em cada erlenmeyer com tampa e misturadas com 30 mL do meio simulador. Cada sistema foi mantido sob agitação de 100 rpm a aproximadamente 25 °C ao longo do tempo de ensaio. Alíquotas de 2 mL foram retiradas em diferentes tempos (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 30, 48 e 72 h) e medida a absorbância. A concentração do óleo essencial em cada simulador ao longo do tempo foi determinada pela medição de absorbância usando a curva de calibração padrão correspondente. Para isso, a absorbância foi obtida utilizando espectrofotômetro UV-Vis 1800 (Shimadzu) a 272 nm, presente na UFSC. Todas as análises foram realizadas em triplicata.⁹⁸

A cinética de liberação do OEO foi avaliada utilizando o software DDSolver®, ajustando o perfil de liberação ao modelo Korsmeyer-Peppas a partir da Equação 5:

$$F = k \times t^n \quad \text{Equação 5}$$

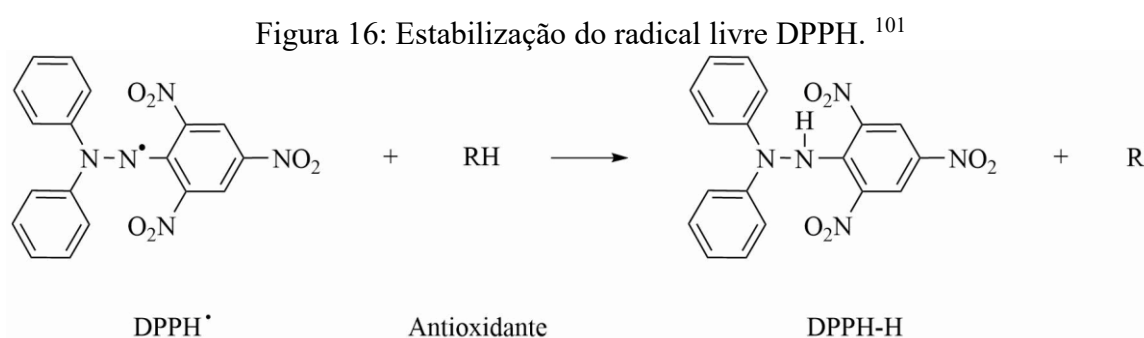
Onde: k é a constante de proporcionalidade que incorpora características da rede polimérica e do composto ativo, t é o tempo e n é o expoente de difusão que indica o mecanismo de liberação do composto ativo.⁹⁹

3.4.7 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos nanocompósitos foi investigada pelos métodos de eliminação de radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazin-1-il) e ABTS•⁺ (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)).

3.4.7.1 Método DPPH

O Método DPPH[•] é baseado na captura do radical livre estável DPPH por um antioxidante. O mecanismo de reação entre o antioxidante e DPPH[•] dependerá da conformação estrutural do antioxidante, mas de maneira geral o mecanismo pode ser representado conforme mostrado na Figura 16. Neste mecanismo, o antioxidante atua como doador de átomo de hidrogênio estabilizando o DPPH[•] e reduzindo-o a hidrazina (DPPH-H).^{100,101}



O método de eliminação do radical DPPH[•] foi aplicado de acordo com de Carvalho *et al.*¹⁰² usando etanol. Após 48 h de ensaio de liberação em meios de ácido acético 3% e etanol 50%, foi retirada uma alíquota (0,05 mL) e adicionada a 1,45 mL de solução de DPPH[•] (0,1 mmol L⁻¹). A mistura foi mantida no escuro por 3 h. Após esse período, a absorção foi determinada em 515 nm no espectrofotômetro UV-Vis. A atividade antioxidante (AA) foi calculada utilizando a Equação 6:

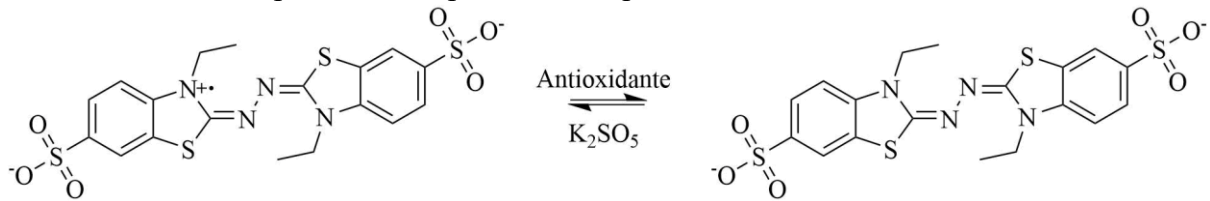
$$AA(\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{amostra}}{A_{DPPH}} * 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde A_{DPPH} = absorbância do DPPH puro e $A_{amostra}$ = absorbância da amostra, ambos em $\lambda = 515$ nm.

3.4.7.2 Método ABTS

O método ABTS consiste na capacidade de um antioxidante capturar o cátion radical ABTS^{•+}, sendo que o antioxidante pode ter tanto caráter hidrofílico quanto lipofílico.¹⁰³ A Figura 17 mostra o principal mecanismo de estabilização e formação do radical ABTS.

Figura 17: Estabilização do radical livre ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptado de Rufino *et al.* ¹⁰³



O método ABTS utilizado foi de acordo com Re *et al.* ¹⁰⁴ com algumas modificações. Inicialmente, uma solução de contendo radical ABTS^{•+} (7 mmol L⁻¹) e persulfato de potássio (2,45 mmol L⁻¹) (1:0,5) foi mantida no escuro por 16 h. Uma alíquota dessa solução (2 mL) foi diluída em água destilada (98 mL) para obter a solução de trabalho ABTS^{•+}. Uma alíquota (0,02 mL) do ensaio de liberação em ácido acético 3% (v/v) após 48 h foi adicionada à solução de trabalho ABTS^{•+} (0,98 mL). A mistura foi deixada em repouso por 10 min no escuro e depois medido a absorvância no espectrofotômetro UV-Vis 1800 (Shimadzu) à 734 nm. A atividade antioxidante (AA) foi calculada a partir da Equação 7:

$$AA (\%) = \frac{A_{ABTS} - A_{amostra}}{A_{ABTS}} * 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde A_{ABTS} = absorvância do ABTS puro e $A_{amostra}$ = absorvância da amostra, ambos em $\lambda = 734$ nm.

3.4.8 Atividade antibacteriana

A análise microbiológica dos filmes foi realizada de acordo com *The Japanese Industrial Standard* (JIS Z 2801:200), com algumas adaptações.¹⁰⁵ As amostras foram testadas contra a bactéria *Escherichia coli*. Cada amostra foi cortada nas dimensões de 4 × 4 cm⁻¹ e os filmes inertes de 3 × 3 cm⁻¹. Todas as amostras foram previamente submetidas a luz UV-C (200 a 280 nm) por 15 min cada lado do filme, totalizando 30 min de esterilização. Em seguida, cada amostra de teste foi colocada em uma placa de Petri esterilizada, de modo que a superfície do teste seja exibida, sendo adicionado 0,4 mL de inóculo microbiano (1,6 × 10⁴ unidades formadoras de colônias (UFC) por mL) e coberto com o filme inerte, garantindo contato próximo à superfície microbiana. A amostra na placa de Petri foi incubada a 35 °C e uma umidade relativa de 90% por 24 h. Após a incubação, os filmes foram lavados cuidadosamente

com 10 mL de solução de 0,1% de peptona com 0,7% de Tween 80. Para a contagem de células viáveis, 1 mL foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de peptona e diluído em série. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade antibacteriana foi calculada a partir da Equação 2:

$$R = \log(A/B) \quad \text{Equação 2}$$

Onde R é o valor da atividade antibacteriana (UFC mL⁻¹), A é a média das contagens bacterianas da amostra controle após 24 h (inóculo) e B é a média das contagens bacterianas de teste após 24 h.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ARGILA

Os resultados apresentados nesta seção são referentes às diferentes metodologias de modificações da Hal e Kaol com OEO ou OEM. O objetivo foi avaliar eficiência de incorporação dos OE, as mudanças na morfologia, estrutura química da argila ocasionada pela adição de OE e no controle da volatilização de OE.

4.1.1 Eficiência de incorporação dos óleos essenciais nas nanopartículas de argilas

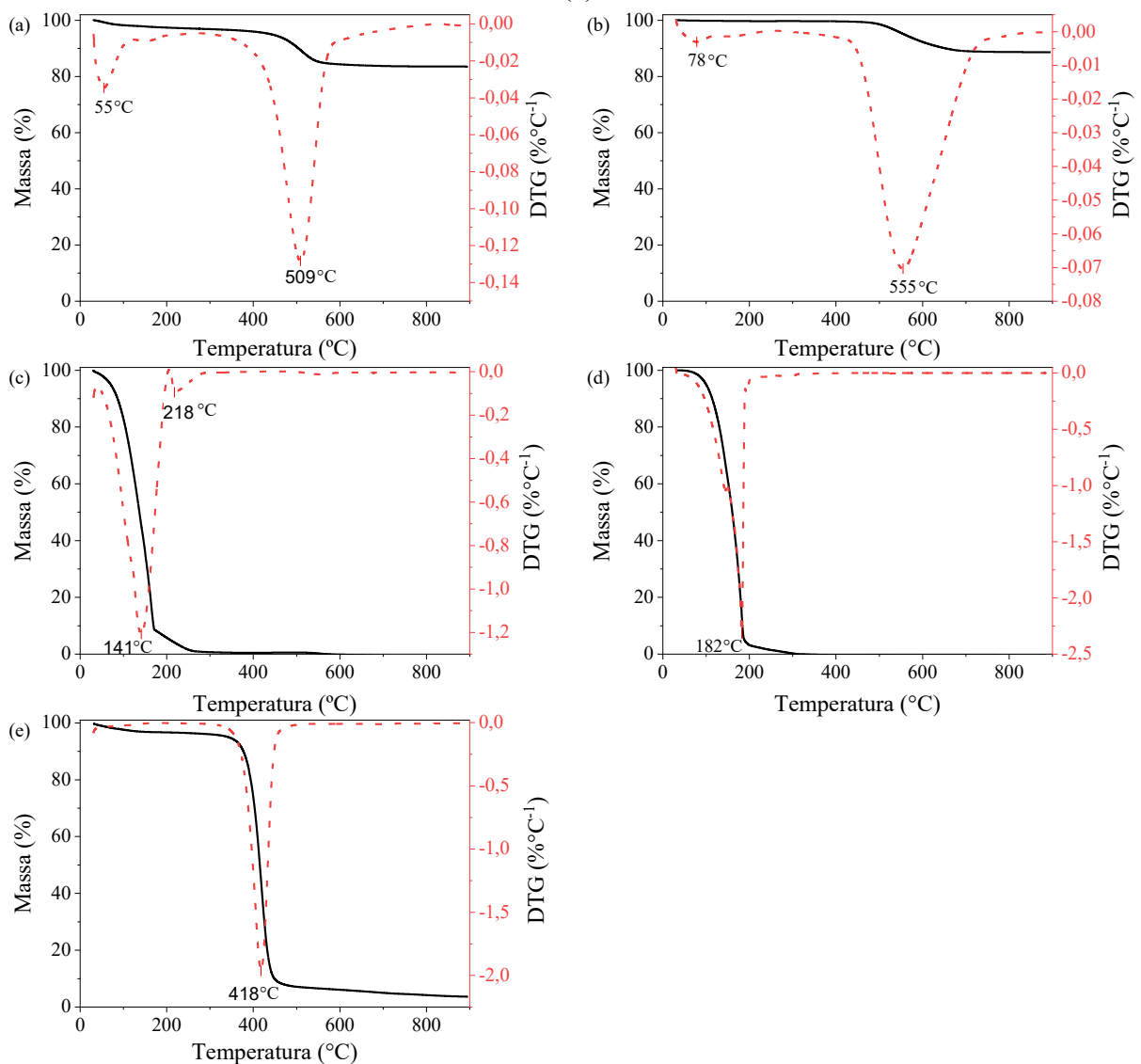
A eficiência de incorporação dos óleos essenciais nas nanopartículas foi determinada a partir da análise de TGA. Para isso, primeiramente os materiais de partida foram caracterizados a fim de se obter as principais perdas de massa de cada componente e suas respectivas temperaturas de degradação. Com base na comparação entre a argila modificada e o material de partida, a eficiência de incorporação foi determinada a partir da perda de massa correspondente ao OE.

A Figura 18 mostra as curvas de TGA/DTG de todos os materiais de partida em função da temperatura. Na análise de degradação térmica da Hal (Figura 18(a)), verificou-se dois eventos térmicos: a primeira perda de massa próxima de 30 – 100°C, correspondente a liberação de moléculas de água fisicamente adsorvidas na superfície, e a segunda perda de massa entre 430 – 600°C relacionada à desidroxilação dos grupos OH.^{13,59} No entanto, a degradação térmica não foi totalizada até a temperatura final da análise (900°C), gerando uma massa residual de 83%. Na Kaol (Figura 18(b)) foram observadas duas perdas de massas: a primeira em 30 – 159°C relacionada à umidade presente na argila, e a segunda entre 439 – 600°C que se refere à eliminação dos grupos OH durante o processo de desidroxilação.¹⁰⁶ Também foi observado que não houve degradação total, constituindo uma massa residual de 87%.

Na curva correspondente ao OEO (Figura 18(c)), foi possível observar apenas dois eventos: a primeira perda de massa na faixa de temperatura de 40 – 178°C relacionada à volatilização dos compostos como (+)- α -pineno, β -terpineno, γ -terpineno, *m*-cimeno e cariofileno e a segunda entre 178 – 210°C que corresponde a volatilização completa dos compostos como timol, 1-(4-metilfenil)etanol e 3-metil-4-isopropilfenol.¹⁰⁷ Já a curva de TGA do OEM (Figura 18 (d)) apresentou apenas um evento térmico na faixa de 41 – 270°C

correspondente à volatilização completa dos diferentes compostos químicos presentes em sua composição. Para o Tween 80 (Figura 18 (e)), foi observado também um evento térmico principal na faixa de temperatura de 360 – 456 °C atribuído à sua degradação e massa residual igual a 3%.¹⁰⁸

Figura 18: Curvas de TGA e DTG das amostras de (a) Hal pura; (b) Kaol pura; (c) OEO; (d) OEM; (e) T80.



A partir da análise de TGA das nanopartículas modificadas foi possível determinar a eficiência de incorporação dos OE e do Tween 80 através da perda de massa de cada amostra em função da temperatura, nas temperaturas de degradação características de cada componente. As curvas de TGA/DTG de cada amostra encontram-se no Apêndice B.

A Tabela 3 apresenta a eficiência de incorporação (EI) dos OE nas nanopartículas de argila. A partir dos resultados obtidos, foi observado que as amostras obtidas pelo ultrassom seguido de aplicação de vácuo sem a adição de Tween 80 ou etanol apresentaram valores significativos de incorporação do OEO e OEM. Essa maior incorporação pode ser justificada pela possível presença de OE tanto na superfície interna quanto externa das nanopartículas, propiciada pelo excesso de OE durante a modificação.¹³ Este comportamento está relacionado com o processo de modificação. O ultrassom pode aumentar a dispersão de partículas através do processo de cavitação, que auxilia na desaglomeração das nanopartículas.¹⁰⁹ Já a aplicação do vácuo permite a difusão de moléculas do meio mais concentrado (OE) para o menos concentrado (lúmen das nanopartículas de argila).⁹⁰

Tabela 3: Eficiência de incorporação do OEO, OEM e T80 nas nanopartículas.

Modificação da Hal	EI do OEO (%)	EI do OEM (%)	EI do Tween 80 (%)	Modificação da Kaol	EI do OEO (%)	EI do OEM (%)	EI de Tween 80 (%)
Hal/OEO_U	45	-	-	Kaol/OEO_U	43	-	-
Hal/2OEO_U	44	-	-	Kaol/2OEO_U	30	-	-
Hal/OEO/T80_U	24	-	30	Kaol/OEO/T80_U	14	-	37
Hal/OEO/0.5T80_U	26	-	20	Kaol/OEO/0.5T80_U	22	-	20
Hal/OEO_U.Δ	47	-	-	Kaol/OEO_U.Δ	38	-	-
Hal/0.4OEO_U	43	-	-	Kaol/0.4OEO_U	42	-	-
Hal/OEM_U	-	41	-	Kaol/OEM_U	-	36	-
Hal/0.4OEM_U	-	37	-	Kaol/0.4OEM_U	-	36	-
Hal/0.4OEM/EtOH_U	-	5	-	Kaol/0.4OEM/EtOH_U	-	3	-
Hal/0.4OEM_EA	-	13	-	Kaol/0.4OEM_EA	-	3	-
Hal/0.4OEM_UT	-	5	-	Kaol/0.4OEM_UT	-	2	-

Hal – haloisita; Kaol – caulinita; OEO – óleo essencial de orégano; OEM – óleo essencial de manjeriço; T80 – Tween 80; EtOH – etanol; Δ – aquecimento; U – Ultrassom; EA – Evaporação/Adsorção; UT – Ultra-turrax®

As amostras Hal/OEO/T80_U e Kaol/OEO/T80_U apresentaram valores menores que as amostras Kaol/OEO_U e Hal/OEO_U. A utilização do Tween 80 visava promover uma mistura homogênea entre as nanopartículas de argila (hidrofílica) e o OEO (hidrofóbico), devido ao surfactante apresentar comportamento anfifílico. No entanto, ao invés de promover essa mistura, possivelmente o Tween80 atuou competindo com o OEO por interação química, como ligações de hidrogênio, com as nanopartículas de argila. Essa competição é comprovada quando analisada a amostra Kaol/OEO/0.5T80_U, onde ao diminuir a quantidade de Tween 80 pela metade, o valor do percentual de incorporação do OEO nas argilas praticamente dobra.

Na amostra Hal/2.0OEO_U, mesmo com o dobro de OEO adicionado, obteve-se uma eficiência de incorporação próxima da amostra Hal/OEO_U, 44% e 45% respectivamente, indicando que 45% é o máximo de OEO que a Haloisita consegue adsorver em sua superfície

externa e em seu lúmen, por esse processo. Embora a amostra de Kaol/2.0OEO_U tenha obtido uma boa eficiência de incorporação (30% OEO), foi ligeiramente inferior ao Kaol/OEO_U. Já na amostra com o processo de ultrassom e aquecimento, Hal/OEO_U.Δ e Kaol/OEO_U.Δ, não houve mudança significativa no percentual de incorporação do OEO quando comparado ao sem aquecimento, Hal/OEO_U e Kaol/OEO_U.

As amostras Hal/0.4OEM/EtOH_U e Kaol/0.4OEM/EtOH_U apresentaram 5% e 3% de OEM, respectivamente. Embora o OE seja bastante solúvel em etanol (99,95%), a adição do reagente não contribui para um aumento significativo da eficiência de incorporação do OEM. Possivelmente o OEM foi eliminado após a centrifugação, uma vez que estudos anteriores realizados por Hendessi *et al.*¹³ e Tas *et al.*⁹¹ utilizaram etanol para eliminar o excesso de composto ativo incorporado em Hal. . Em estudo realizado por Saucedo-Zuniga *et al.*⁹² foram obtidos resultados parecidos, com aproximadamente 5% de óleo essencial de tomilho (OET) incorporados em haloisita (proporção de 1:3 de Hal e OET).

As amostras Hal/0.4OEM_EA e Kaol/0.4OEM_EA apresentaram baixa adsorção do OEM, 13% e 3% respectivamente. O pouco de OEM incorporado possivelmente está adsorvido na superfície externa da argila, uma vez que o processo se baseia na evaporação do OE e adsorção do mesmo nos poros das superfícies das argilas. Giannakas *et al.*⁹⁴ realizaram esse mesmo procedimento com OEM e montmorilonita e obtiveram entre 3,4 – 14% de OEM adsorvido. No entanto, essa adsorção não apresentou aumento no espaçamento basal da nanopartícula, sugerindo que possivelmente o OE esteja adsorvido na superfície externa.

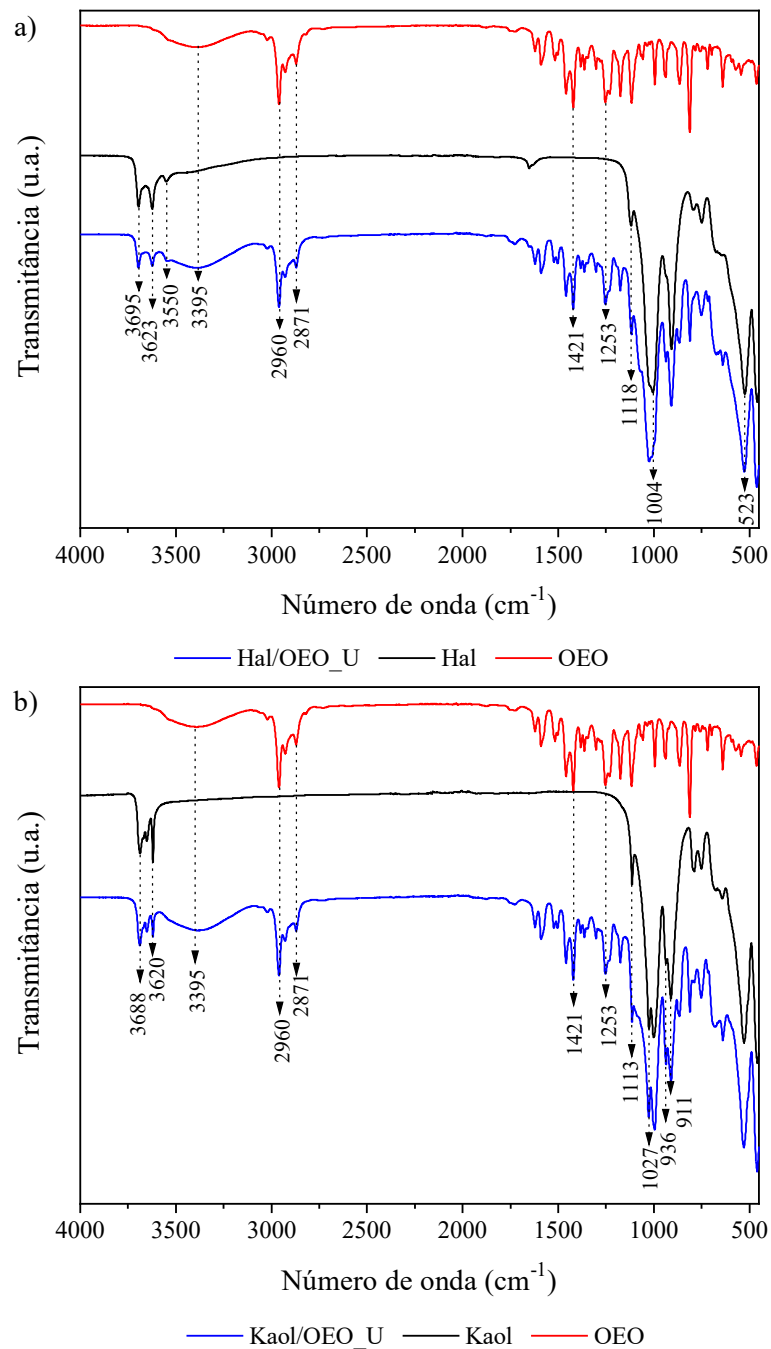
Nas amostras Hal/0.4OEM_UT e Kaol/0.4OEM_UT, a incorporação do óleo essencial foi de 5% e 2%, respectivamente. Essa baixa incorporação foi devido à baixa quantidade de óleo e elevada quantidade de água durante o processamento, dificultando a interação do óleo (hidrofóbico) com a argila (hidrofílica).

Em vista dos resultados obtidos, optou-se por continuar as caracterizações apenas com as nanopartículas modificadas pelo processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo na proporção de 1:10, que são as amostras Hal/OEO_U, Kaol/OEO_U, Hal/OEM_U e Kaol/OEM_U. Adicionalmente, estes óleos apresentam composições diferentes e valores altos de incorporação por esse processamento, o que é um fator que pode trazer diferenças no comportamento destes materiais para a aplicação proposta.

4.1.2 Caracterização química

A característica química das nanopartículas de argila com óleos essenciais foi investigada por FTIR-ATR e análise elementar. A Figura 19 mostra os espectros de FTIR-ATR dos materiais de partida e da Hal e Kaol modificadas com OEO.

Figura 19: Espectros de FTIR-ATR das amostras: a) Hal pura, OEO e Hal/OEO_U e b) Kaol pura, OEO e Kaol/OEO_U



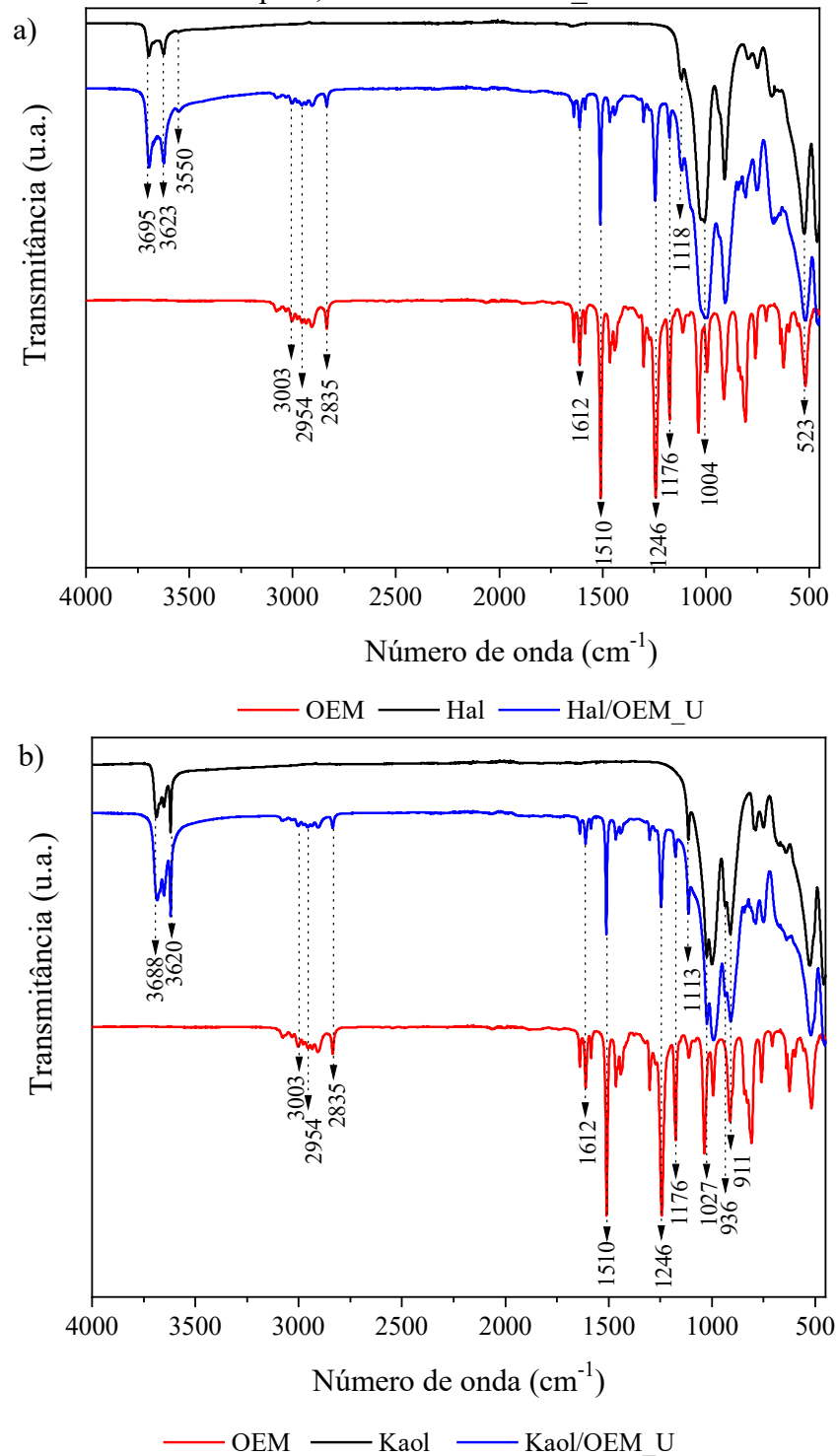
No espectro de Hal pura foram observadas na região 3695-3623 cm^{-1} as vibrações de alongamento dos grupos hidroxilas da superfície interna entre as folhas tetraédricas e octaédricas. Uma banda fraca próxima a 3550 cm^{-1} , referente à água adsorvida,^{110,111} também é observada. As vibrações em 1118-1004 cm^{-1} correspondem à energia absorvida pelos grupos Si-O na superfície e Al-O-H nas bordas da Hal, enquanto que na região 523 - 460 cm^{-1} são relacionadas à vibração dos grupos Si-O-Si e Si-O-Al.^{8,43,110}

No espectro de OEO, observam-se as bandas de vibração do grupamento O-H em 3395 cm^{-1} e do grupamento C-O em 1253 cm^{-1} do grupo fenólico característico do óleo essencial, do mesmo modo que as bandas em 2960-2871 cm^{-1} referentes ao estiramento de C-H e em 1421 cm^{-1} à deformação angular de CH_2 .^{112,113} Na amostra Hal/OEO_U, observou-se tanto as bandas características da Hal quanto do OEO.

No espectro de Kaol, observam-se em 3688 e 3620 cm^{-1} vibrações de estiramento dos grupamentos O-H localizados na parte interna entre as folhas octaédricas e tetraédricas. As bandas em 1113 e 1027 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, às vibrações de estiramento fora do plano e no plano do grupamento Si-O, e as bandas de 936 e 911 cm^{-1} à deformações angulares Al-O-H presentes na Kaol.^{114,115} Na Kaol/OEO-U é possível notar bandas características tanto da Kaol quanto do OEO, confirmando assim a presença de OEO nas nanopartículas em ambas modificações.

A Figura 20 apresenta os espectros de FTIR-ATR dos materiais de partida e das nanopartículas modificadas com OEM. Nos espectros das Hal/OEM_U e Kaol/OEM_U é possível constatar tanto as bandas características das nanopartículas de argila pura, citadas anteriormente, quanto as bandas relacionadas ao OEM. Para OEM, a banda em 3003 cm^{-1} é atribuída a vibração de estiramento de $=\text{CH}_2$ e as bandas em 2954 a 2835 cm^{-1} ao estiramento -CH. A banda em 1612 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento de C=C, a banda 1510 cm^{-1} refere-se à vibração de estiramento O- CH_3 e C-O em 1246 cm^{-1} , e na banda de 1176 cm^{-1} as vibrações de estiramento assimétrico C-O-C.^{113,116}

Figura 20: Espectros de FTIR-ATR das amostras: (a) Hal pura, OEM e Hal/OEM_U e (b) Kaol pura, OEM e Kaol/OEM_U



A presença de OE nas nanopartículas também foi comprovada pela análise elementar das argilas antes e depois das modificações, conforme indicado na Tabela 4. Nota-se que tanto para a Kaol quanto para a Hal há um aumento significativo no percentual de carbono (%C) e

hidrogênio (%H) com a adição de ambos os óleos. Além disso, as amostras com OEO apresentaram aumentos mais significativos de %C, cerca de 10% a mais quanto comparado ao OEM. Estes resultados coincidem com os encontrados no percentual de incorporação do OE nas nanopartículas, dado que para OEO o valor foi de 45% para Hal e 43% para a Kaol.

Tabela 4: Composição elementar das nanopartículas de argila puras e modificadas com OE.

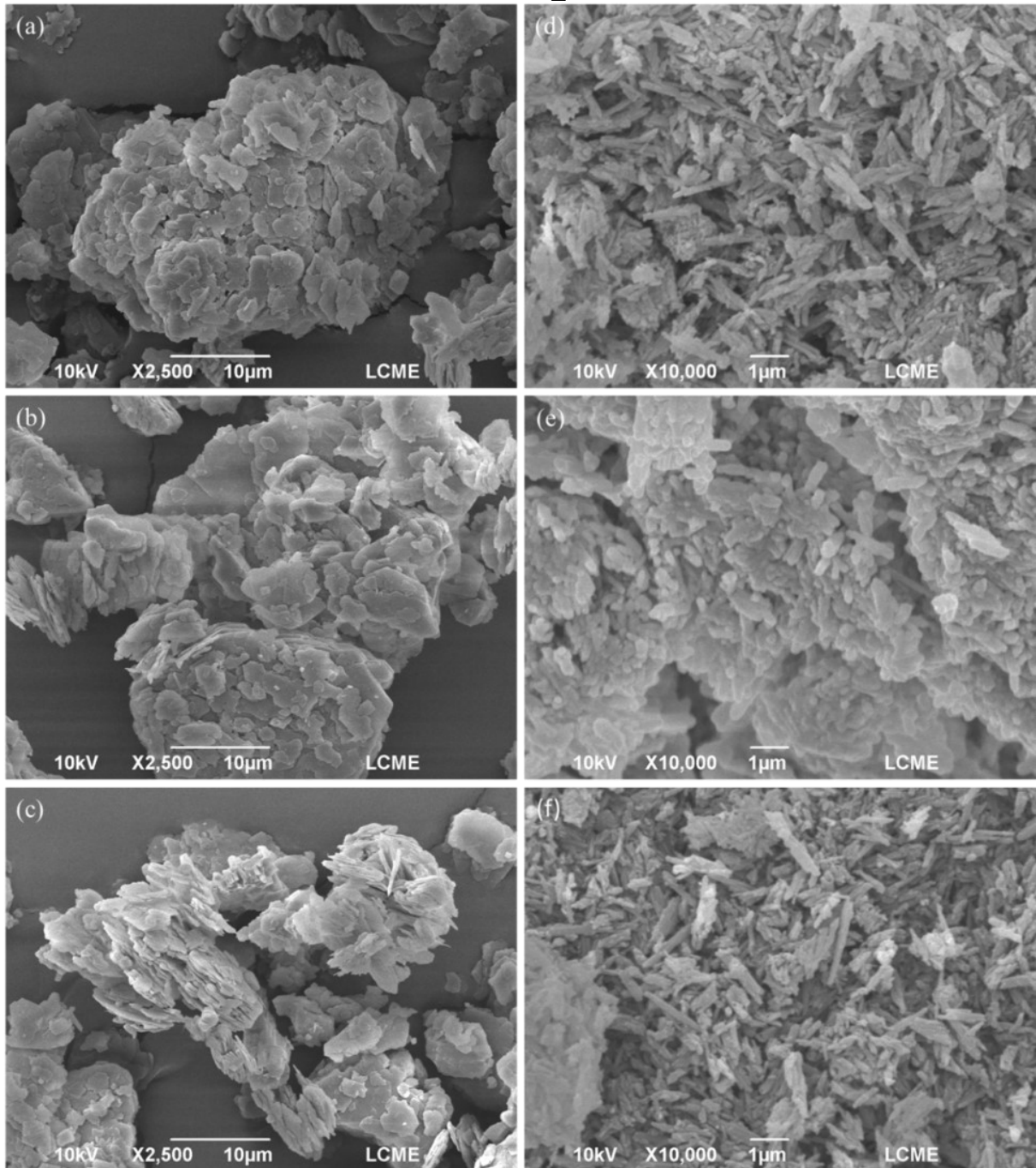
Amostra	%C	%H	%N
Kaol	0,50	1,19	0,00
Hal	0,00	1,29	0,00
Kaol/OEO_U	41,86	5,96	0,00
Kaol/OEM_U	30,82	4,05	0,00
Hal/OEO_U	39,09	5,35	0,00
Hal/OEM_U	26,62	4,16	0,00

4.1.3 Morfologia

A morfologia das nanopartículas puras e modificadas foram investigadas pelo MEV e estão apresentadas na Figura 21. A Kaol pura (Figura 21 (a)) exibiu uma estrutura laminar no formato pseudo-hexagonal, com lâminas empilhadas interagindo por fortes interações secundárias.¹¹⁷ Para Kaol/OEO_U e Kaol/OEM_U (Figura 21 (b) e (c)), a presença do OE não ocasionou mudanças significativas na superfície da argila e na desaglomeração das argilas que seria ocasionada pelo processo de ultrassom, que visava desaglomerar as nanopartículas pelo processo de cavitação,¹⁰⁹ indicando que possivelmente o OE esteja interagindo fracamente com a argila, uma vez que todas as amostras foram secas antes da análise para evaporação do excesso de OE.

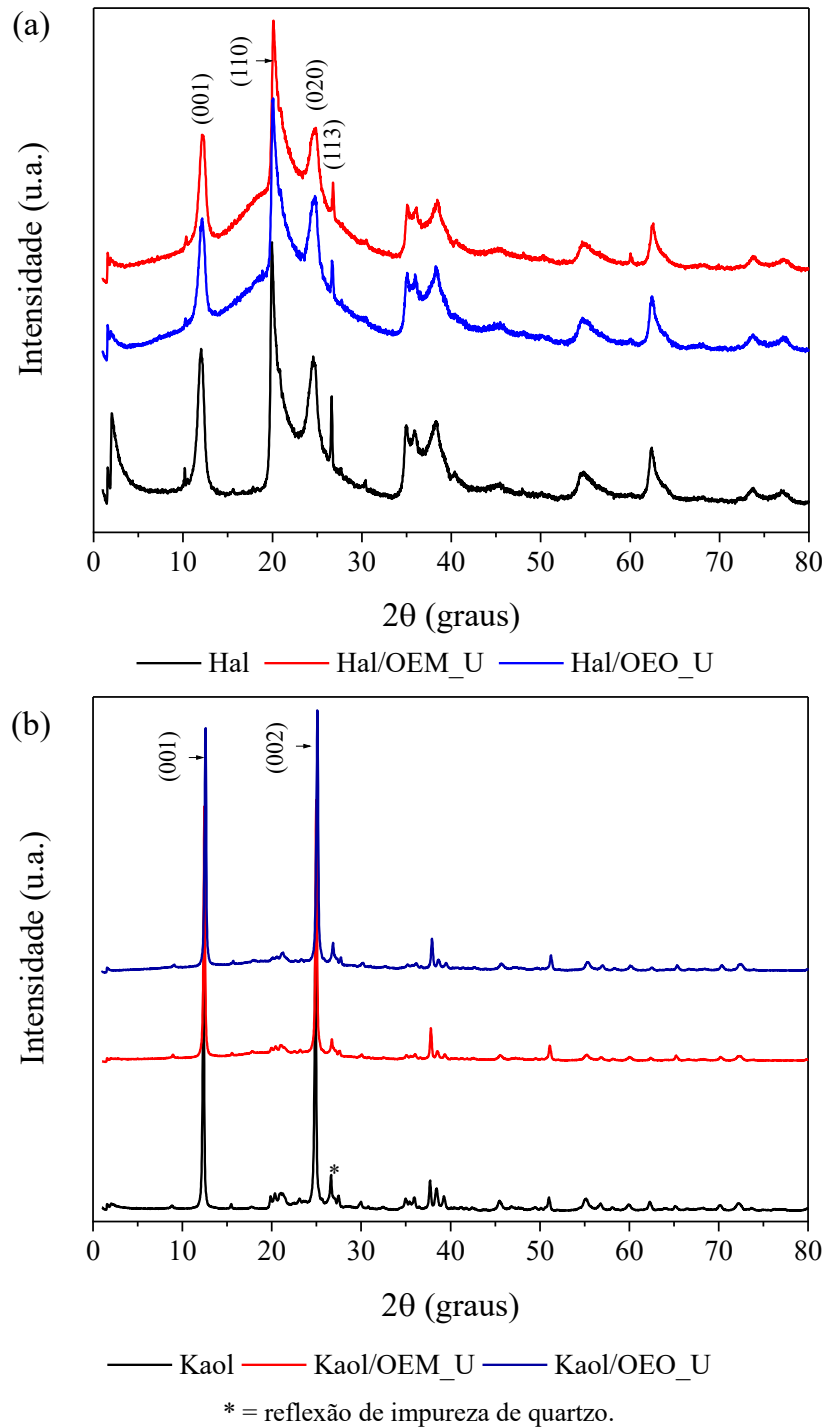
A Hal pura (Figura 21 (d)) apresentou estrutura de nanotubos finos individuais. A estrutura de nanotubos possui galerias com lúmens ocupados pelo ar que podem ser utilizados para aprisionamento de aditivos, além de possuir grupos silanol e aluminol que podem interagir por meio de ligação de hidrogênio com grupos polares.⁹² Na amostra de Hal contendo OEO (Figura 21 (e)), a haloisita manteve sua estrutura, mas o aspecto dos nanotubos ficou intumescido, sugerindo uma eficiência de adsorção deste composto ativo pelo filossilicato tanto na superfície externa quanto em seu lúmen, ocasionada pela aplicação de vácuo, que visou a retirada do ar e incorporação do OE. No entanto, para a amostra Hal/OEM_U (Figura 21(f)), pouca alteração na superfície da argila foi observada. Isso pode ser atribuído à menor interação entre o OEM com a argila e a maior volatilidade do OEM.

Figura 21: Imagens MEV mostrando a morfologia típica da argila pura, (a) Kaol e (d) Hal, e após a adsorção do OE, (b) Kaol/OEO_U, (c) Kaol/OEM_U, (e) Hal/OEO_U, (f) Hal/OEM_U.



A análise por DRX foi realizada a fim de verificar a mudança no espaçamento basal das amostras de Hal ou Kaol puras e modificadas com óleo essencial de orégano ou manjeriço. Na Figura 22 são apresentados os difratogramas dos sólidos Kaol, Kaol/OEO_U, Kaol/OEM_U, Hal, Hal/OEO_U e Hal/OEM_U.

Figura 22: Padrões de DRX das amostras (a) Hal pura, Hal/OEO_U e Hal/OEM_U e (b) Kaol pura, Kaol/OEO_U e Kaol/OEM_U.



O padrão de DRX da haloisita não modificada (Figura 22 (a)) mostrou espaçamento interplanar de 0,736 nm ($2\theta = 12,02^\circ$) associado ao plano (001). Uma pequena reflexão foi encontrada em 2θ igual $10,2^\circ$ revelando uma haloisita parcialmente hidratada, e um pico intenso em 2θ igual a 20° associado ao plano (110), que caracteriza haloisita de morfologia tubular, o

que está de acordo com o resultado obtido pelo MEV.¹¹¹ Além disso, é possível observar um pico de impureza de quartzo em 2θ igual a $26,6^\circ$ relacionado ao plano (113).¹¹⁸

Todas as Hal modificadas com OE apresentaram os picos característicos da Hal pura citadas anteriormente, o que condiz com os resultados obtidos no MEV, onde Hal manteve sua estrutura tubular mesmo após a modificação. A incorporação do OE na sua estrutura não provocou mudança significativa no espaçamento do plano (001), conforme apresentado na Tabela 5. Isso indica que tanto para Hal/OEO_U quanto para Hal/OEM_U a adsorção do OE ocorreu principalmente na superfície externa a partir da ligação de hidrogênio e interação eletrostática. Além disso, houve uma diminuição na intensidade da reflexão em 2θ igual $10,2^\circ$, demonstrando uma possível eliminação de moléculas de água após o tratamento da Hal com ambos os OE. Também foi observada alteração na área do pico em $2\theta = 20,0^\circ$ da Hal, indicando uma possível estrutura amorfa que pode ter sido ocasionada pelo processo de ultrassom utilizado durante a modificação do filossilicato com OE.

Tabela 5: Resultados do ângulo 2θ e espaçamentos da interplanar (d001) encontrados a partir dos padrões de DRX da Hal pura, Kaol pura, Hal/OEO_U, Hal/OEM.

Amostra	2θ ($^\circ$)	d001 (nm)	Amostra	2θ ($^\circ$)	d001 (nm)
Hal	12,0	0,736	Kaol	12,4	0,715
Hal/OEO_U	12,1	0,729	Kaol/OEO_U	12,6	0,702
Hal/OEM_U	12,1	0,729	Kaol/OEM_U	12,5	0,709

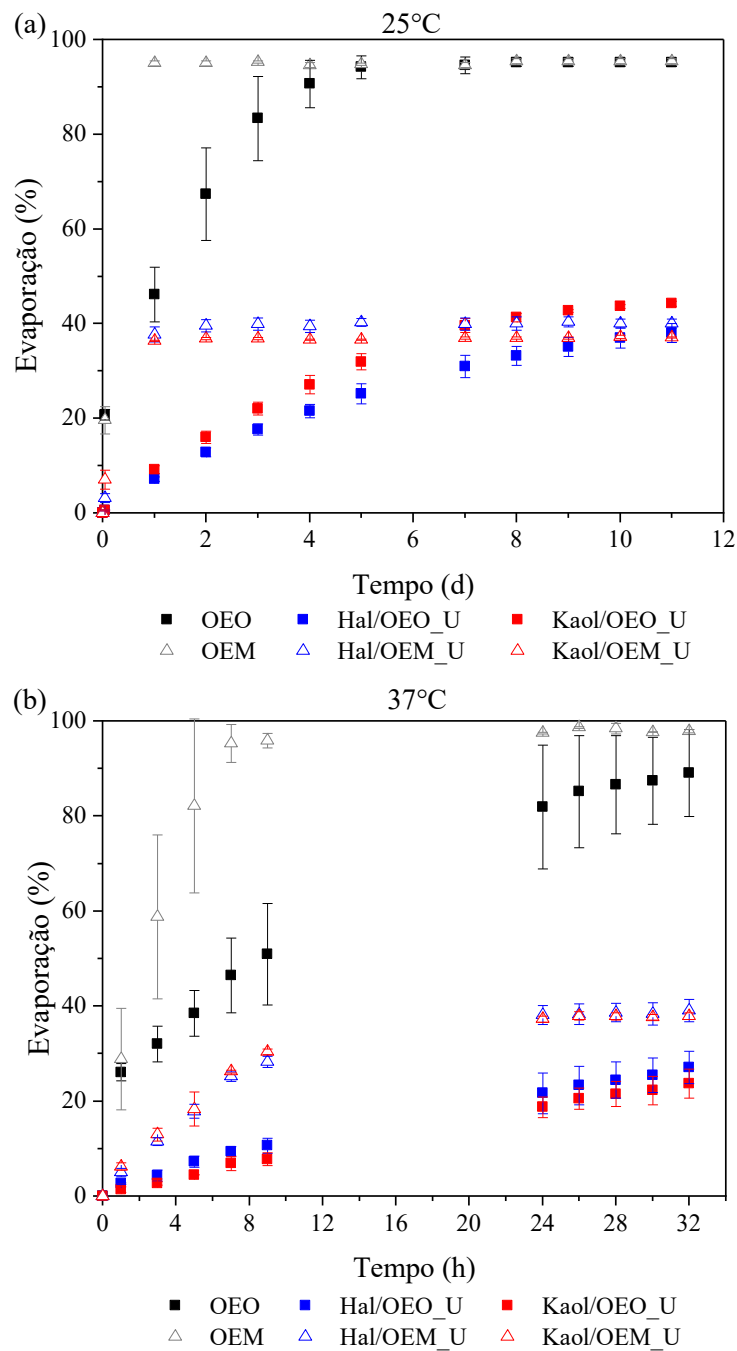
O difratograma da Kaol sem modificação (Figura 22 (b)) apresentou duas reflexões intensas – em 2θ igual a $12,4^\circ$, correspondente ao plano (001) e espaçamento basal $d_{001} = 0,715$ nm, e em 2θ igual a $24,9^\circ$, correspondente ao plano (002) e $d_{002} = 0,357$ nm. Além dos picos característicos da Kaol, o difratograma exibiu pico em 2θ igual a $26,6^\circ$ correspondente a impureza de quartzo.^{119,120}

Nos padrões de DRX das Hal/OEO_U e Kaol/OEM_U, é possível observar que a incorporação de OE na estrutura da Kaol não provocou mudança significativa no espaçamento do plano (001), como observado na Tabela 5. Isso deve-se às fortes ligações de hidrogênio entre as duas superfícies adjacentes e à presença de dipolos permanentes nas camadas individuais que garante a forte interação entre as lamelas, dificultando a intercalação de compostos.¹¹⁷ Estes resultados sugerem que a modificação ocorreu na superfície externa da argila. Além disso, é possível observar que a modificação não proporcionou alteração na estrutura do material, permanecendo uma estrutura lamelar, corroborando os resultados de MEV.

4.1.4 Teste de evaporação do óleo essencial

Os perfis de evaporação dos OE livres e adsorvidos nas temperaturas de 25°C e 37°C, que são ideais para o crescimento de bactérias e fungos, respectivamente, são apresentados na Figura 23.

Figura 23: Percentual de evaporação OE incorporado em Kaol e Hal e em forma livre a: (a) 25°C, temperatura adequada para o crescimento fúngico, e (b) 37 °C, temperatura adequada para o crescimento bacteriano.



Com base nos resultados, nota-se que, independentemente da temperatura, a volatilização do OEM livre é mais rápida do que a do OEO em um mesmo período de tempo, em consequência de uma maior pressão de vapor do OEM quando comparado à do OEO. Enquanto que o estragol, principal componente do OEM, tem pressão de vapor igual a 0,165 mmHg a 25°C, o 3-metil-4-isopropilfenol, principal componente do OEO, tem pressão de vapor igual 0,0175 mmHg a 25°C.^{121,122}

Para as nanopartículas modificadas, é possível observar que, embora os OE não estejam adsorvidos na superfície interna das nanopartículas, comprovada pelos resultados de DRX, a adsorção dos OE na superfície externa, possivelmente devido à presença de poros e ligações de hidrogênio,⁹⁵ contribui para uma liberação mais lenta quando comparado ao OE livre. Portanto, a evaporação do OE em forma livre na temperatura de 25°C foi aproximadamente 50% maior do que em forma adsorvida. Em 37°C, os efeitos foram semelhantes aos observados a 25°C.

Em virtude do elevado percentual de incorporação, modificação da superfície e menor volatilização do OE, a amostra Hal/OEO_U foi escolhida para ser incorporada na matriz polimérica de PHBV.

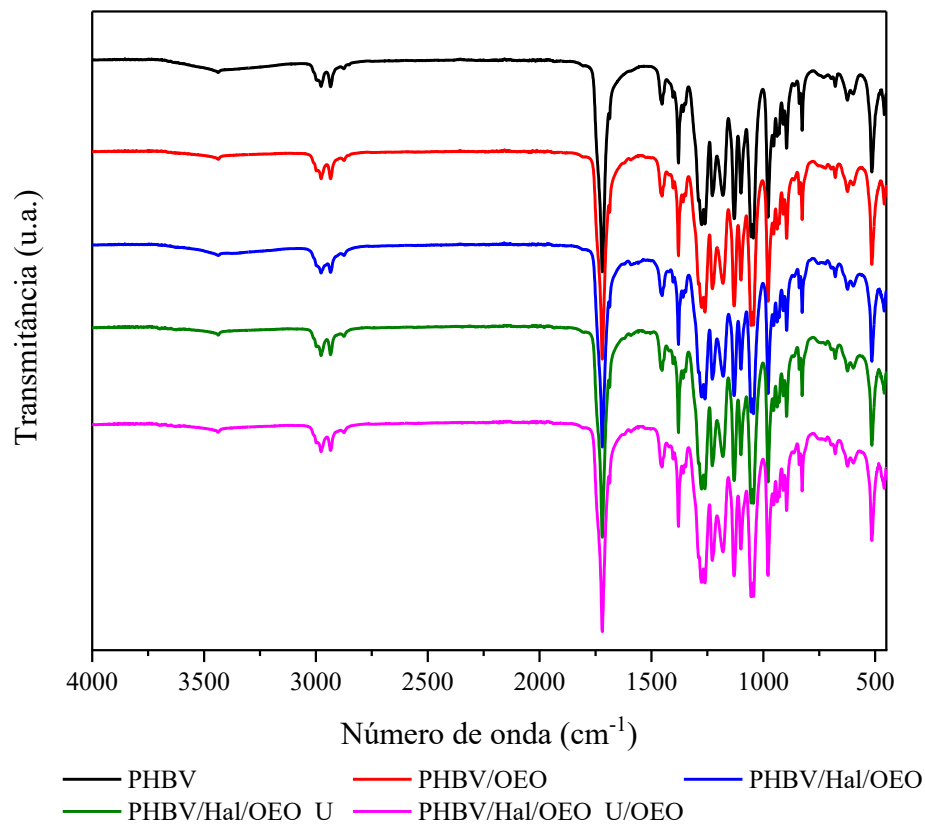
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS

Os resultados apresentados nesta seção são referentes aos filmes de PHBV preparados com haloisita e óleo essencial de orégano com ou sem modificação. O objetivo foi comparar a incorporação direta dos aditivos com o uso da argila modificada, com ou sem complementação do teor de óleo, de acordo com as propriedades térmicas, antioxidante, antimicrobiana, e avaliar a taxa de liberação do OEO nos filmes de PHBV.

4.2.1 Caracterização química

Os espectros FTIR-ATR do PHBV puro e dos nanocompósitos de PHBV são mostrados na Figura 24. No espectro do PHBV, as bandas em 2977 e 2934 cm^{-1} representam as vibrações assimétrica e simétrica da ligação CH, e a banda intensa em 1710 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C = O da carbonila do éster. As bandas em 1456 e 1375 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento de ligação de CH, CH₂ e CH₃.⁶

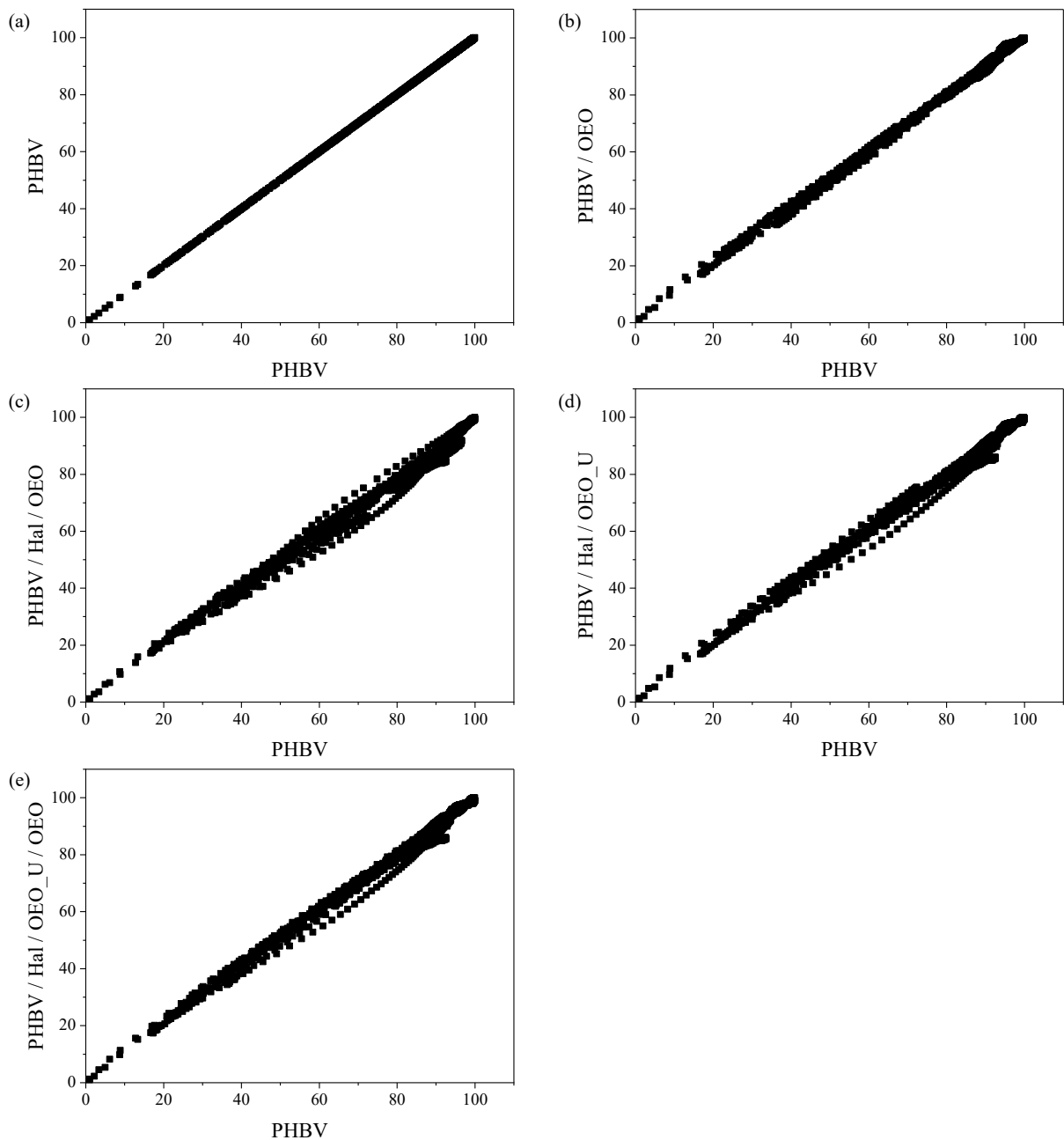
Figura 24: Espectro FTIR-ATR das diferentes composições de filmes de PHBV, sem e com Hal modificada com OEO.



Nos espectros de FTIR-ATR dos nanocompósitos de PHBV não há alterações nítidas entre as bandas resultantes da incorporação do OEO, Hal, Hal/OEO_U e a da matriz de PHBV. Assim, as interações entre os componentes foram determinadas pelo método dos mínimos quadrados. Por ser uma análise quantitativa, permite calcular o erro médio quadrático (RMSE) entre cada composição dos nanocompósitos e o filme de PHBV puro.

As curvas obtidas a partir da comparação entre a normalização da transmitância do filme PHBV puro com as dos nanocompósitos são apresentadas na Figura 25. Essa comparação fornece o desvio de linearidade entre as diferentes composições de filme, que permite verificar a presença destes aditivos no polímero e possíveis interações entre os componentes da mistura.²¹

Figura 25: Análise comparativa das transmitâncias dos filmes de PHBV versus os de (a) PHBV puro, (b) PHBV/OEO, (c) PHBV/Hal/OEO, (d) PHBV/Hal/OEO_U e (e) PHBV/Hal/OEO_U/OEO.



A Figura 25 (a) apresenta a relação entre a normalização da transmitância do filme de PHBV com o próprio filme, fornecendo valores de R^2 igual a 1,0 e RMSE igual a 0,0, valores apresentados na Tabela 6. A partir da Figura 25 (b) é possível observar um desvio da linearidade entre as transmitâncias do filme PHBV/OEO e PHBV puro, o que resulta em valor de R^2 de 0,9948 e um valor de RSME de 0,861.

Tabela 6: Valores do coeficiente de determinação (R^2) e do erro médio quadrático (RMSE) do filme de PHBV e os nanocompósitos.

Amostra	R^2	RMSE
PHBV	1,0000	0,000
PHBV/OEO	0,9948	0,861
PHBV/Hal/OEO	0,9892	1,829
PHBV/Hal/OEO_U	0,9938	1,375
PHBV/Hal/OEO_U/OEO	0,9944	1,300

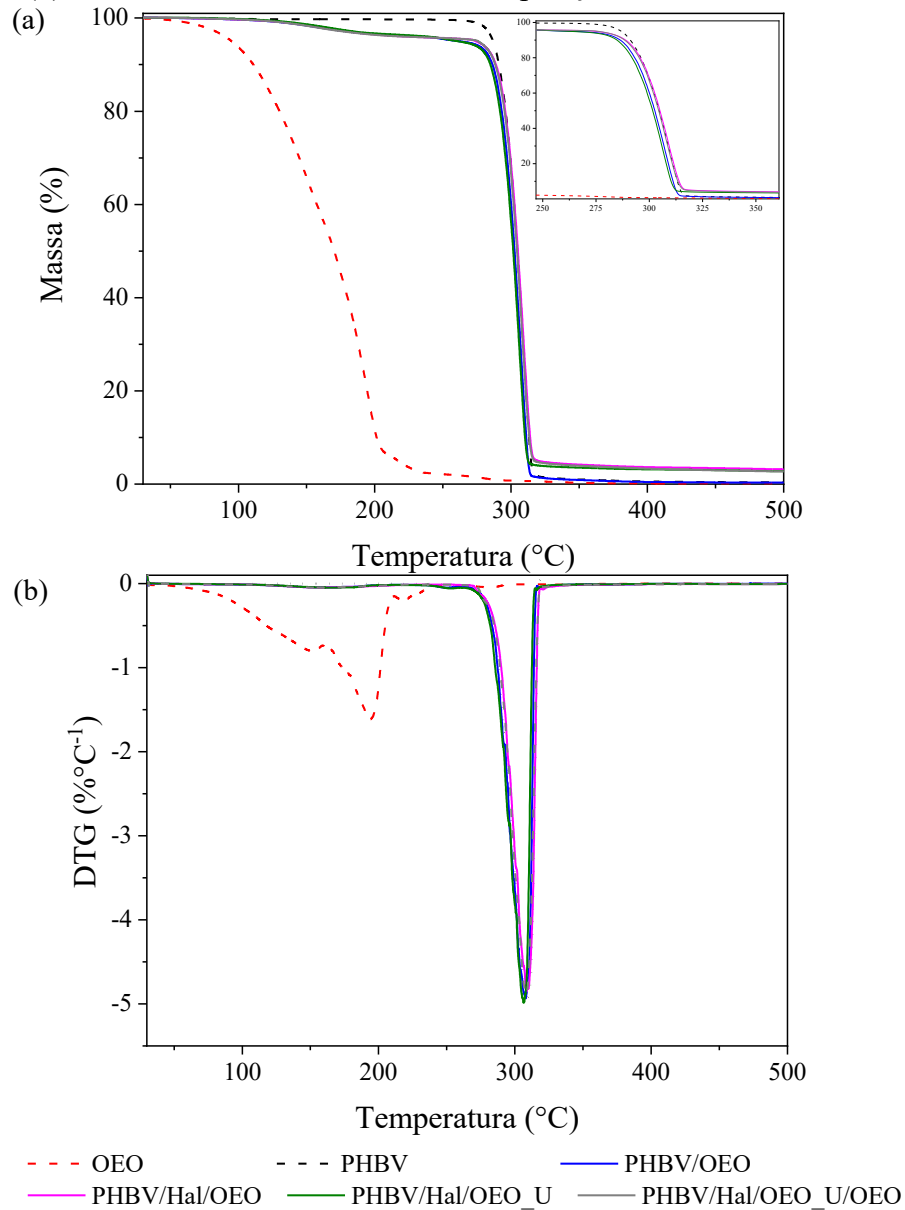
A incorporação direta de OEO na matriz PHBV resulta em um pequeno aumento no RSME, de 0,0 para PHBV para 0,861 para PHBV/OEO, o que pode estar relacionada à pouca interação entre o OE e a matriz. A adição de Hal na matriz de PHBV é o parâmetro que provoca maior desvio de linearidade, obtendo valor de RSME igual 1,829, indicando que a amostra PHBV/Hal/OEO apresentou uma menor interação entre os aditivos e a matriz polimérica quanto comparado aos outros filmes.

O resultado semelhante é encontrado nos nanocompósitos com as argilas modificadas (PHBV/Hal/ OEO_U e PHBV/Hal/OEO_U/OEO), no qual quando comparado ao filme puro apresentaram maiores valores de RSME. No entanto, apresentaram uma maior linearidade quando comparado ao PHBV/Hal/OEO, possivelmente ocasionada por uma melhor dispersão dos aditivos na matriz polimérica, devido ao OEO estar presente na superfície externa da nanopartícula de argila, fornecendo uma superfície organofílica.

4.2.2 Propriedades térmicas

Os resultados da análise de TGA para filme de PHBV e os nanocompósitos encontram-se na Figura 26. Para o PHBV puro, observa-se apenas uma perda de massa, na faixa de 270 – 318 °C, associado à degradação da matriz polimérica, que ocorre de acordo com o mecanismo de cisão aleatória de cadeia.²¹ O PHBV apresentou massa residual igual a 0,4%. Para os nanocompósitos contendo OEO, é possível verificar duas perdas de massa: a primeira referente ao percentual de OEO nos estágios iniciais da análise até 240°C e a segunda em na faixa de 270 – 320°C associada ao comportamento de degradação do PHBV.

Figura 26: Curvas de (a) TGA e parte ampliada correspondente à perda de massa do PHBV, e (b) DTG do OEO e das diferentes composições do filme de PHBV.



Todos os nanocompósitos apresentaram comportamento térmico similar e os resultados estão apresentados na Tabela 7. De modo geral, os nanocompósitos de PHBV iniciaram a decomposição em temperatura mais baixa que o filme de PHBV puro, conforme observado nos resultados de $T_{5\%}$ (temperatura de decomposição inicial onde ocorreu 5% da perda de massa). As temperaturas máximas de degradação (T_p) dos nanocompósitos também foram ligeiramente menores que o PHBV puro. Embora tenha aumentado a faixa de degradação, houve uma pequena diminuição na estabilidade térmica do polímero quando adicionadas as nanopartículas modificadas.

Tabela 7: Temperaturas de degradação, massa de OEO incorporado no filme e massa residual em 600 °C.

Amostra	T _{5%} (°C)	T _P (°C)	Massa de OEO (%)	Massa residual (%)
PHBV	287	310	-	0,4
OEO	95	194	100	0,0
Hal	443	509	-	83*
PHBV/OEO	261	307	4,3	0,2
PHBV/Hal/OEO	274	309	4,6	3,1
PHBV/Hal/OEO_U	260	307	2,4	2,7
PHBV/Hal/OEO_U/OEO	275	308	3,5	2,6

*Massa residual em 800 °C

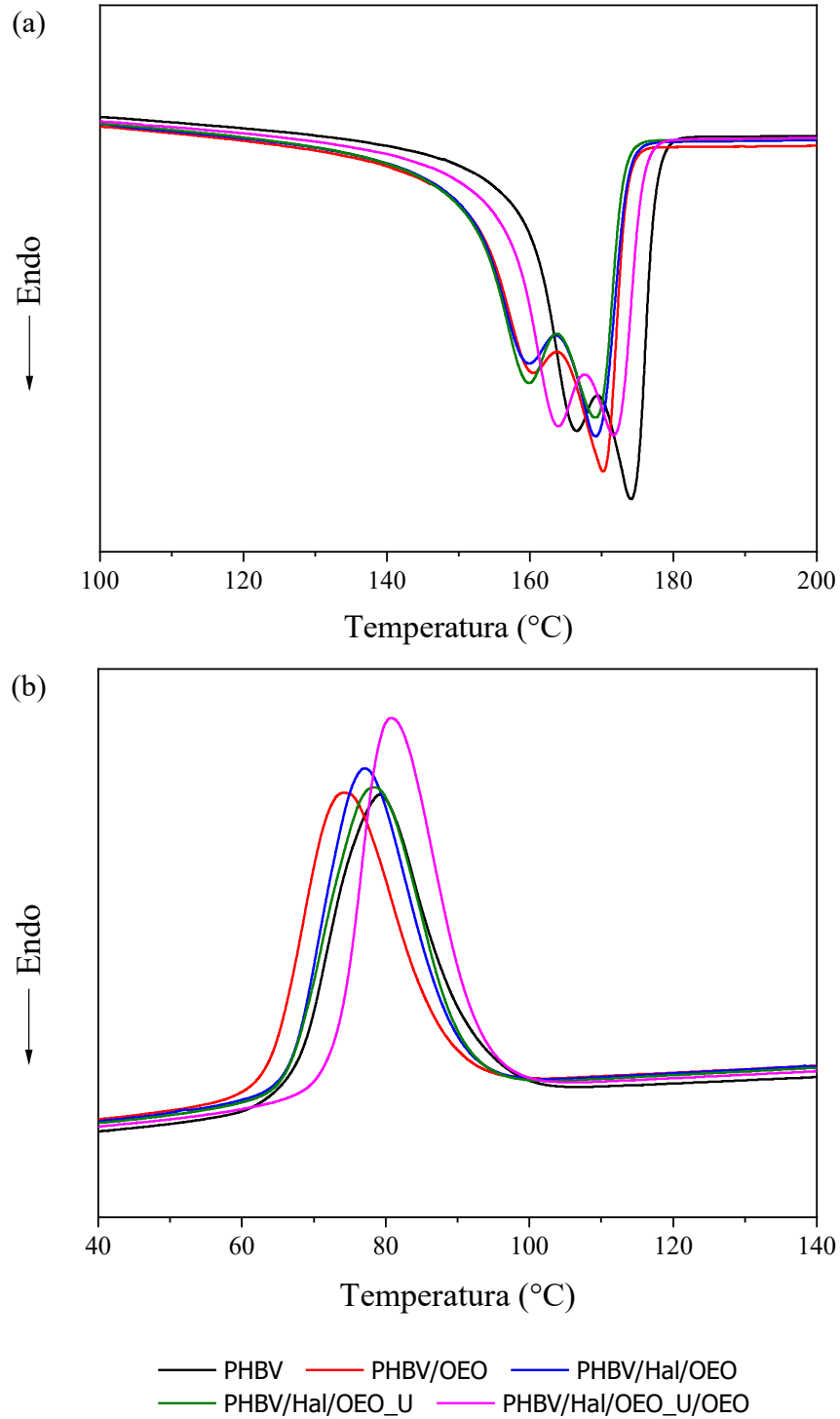
Na Tabela 7 também é possível observar que, após o processamento, as amostras contendo Hal (PHBV/Hal/OEO, PHBV/Hal/OEO_U e PHBV/Hal/OEO_U/OEO) apresentaram massa residual próxima à formulação original (3% em massa de Hal), indicando que não houve perda significativa de argila durante o processamento e boa homogeneidade dos sistemas. Além disso, também foi observado que as amostras PHBV/OEO e PHBV/Hal/OEO, onde inicialmente havia sido incorporado 8% em massa de OEO na matriz polimérica, apresentaram aproximadamente 4% de incorporação após o processamento. Essa perda possivelmente foi devido à volatilização do OEO durante o processamento, uma vez que as misturas foram processadas a uma temperatura de 165 °C.

A amostra PHBV/Hal/OEO_U não apresentou perda significativa após processamento, obtendo um valor parecido com o percentual no início do processo (2,4% de OEO), isso devido ao óleo essencial estar adsorvido na superfície da argila dificultando a perda de OEO por volatilização durante o processamento. Já a amostra PHBV/Hal/OEO_U/OEO, que tem a argila modificada mais o acréscimo de óleo de maneira direta na matriz polimérica para completar os 8% originais, apresentou apenas 3,5% de incorporação do OEO, sendo que destes possivelmente a maior parte (~2%) corresponda ao óleo adsorvido na argila, visto que a amostra anterior teve uma incorporação completa.

Na Figura 27 são apresentadas as curvas de fusão (Figura 27 (a)) obtidas a partir do segundo ciclo de aquecimento, e as curvas de cristalização (Figura 27 (b)) obtidas a partir do primeiro ciclo de resfriamento. Na Figura 27 (a) é possível observar que todos os filmes apresentaram dois picos de fusão (T_{m1} e T_{m2}). Em trabalho realizado por da Costa *et al.*,²¹ foi relatado que esses dois picos endotérmicos, por apresentar temperaturas muito próximas uma da outra, podem estar relacionados a fusão de diferentes tamanhos de esferulitos presentes na matriz polimérica de PHBV. Além disso, também é possível observar uma diminuição na T_m

ao adicionar a Hal, que pode ser resultado da formação de esferulitos menores e menos perfeitos.

Figura 27: Curvas de (a) fusão e (b) cristalização dos filmes de PHBV.



Na Figura 27 (b) é possível verificar uma diminuição na temperatura de cristalização (T_c) para quase todos os filmes, com exceção do filme de PHBV/Hal/OEO_U/OEO que obteve um aumento na T_c indicando que neste caso pode ter havido um efeito nucleante da argila na cristalização do PHBV.

A Tabela 8 apresenta as temperaturas de fusão e cristalização, a entalpia e o grau de cristalinidade dos filmes de PHBV com diferentes composições obtidas a partir do termograma do DSC (Figura 27). Nota-se que a adição de OEO, Hal pura ou Hal modificada proporcionou uma diminuição na temperatura de fusão (T_{m1} e T_{m2}) para todas as amostras. Além da formação de esferulitos menores, outro fator que pode ter influenciado na diminuição da T_m foi que o OE pode ter atuado como plastificante.

Tabela 8: Propriedades térmicas (temperatura de fusão (T_{m1} e T_{m2}), temperatura de cristalização (T_c), variação de entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (X_c)) para PHBV puro, PHBV/OEO, PHBV/Hal/OEO, PHBV/Hal/OEO_U e PHBV/Hal/OEO_U/OEO.

Amostra	T_c (°C)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	ΔH_m (J g ⁻¹)	X_c (%)
PHBV	79	166	174	85	58
PHBV/OEO	74	161	170	81	56
PHBV/Hal/OEO	77	160	169	86	59
PHBV/Hal/OEO_U	78	160	169	84	57
PHBV/Hal/OEO_U/OEO	81	164	172	87	60

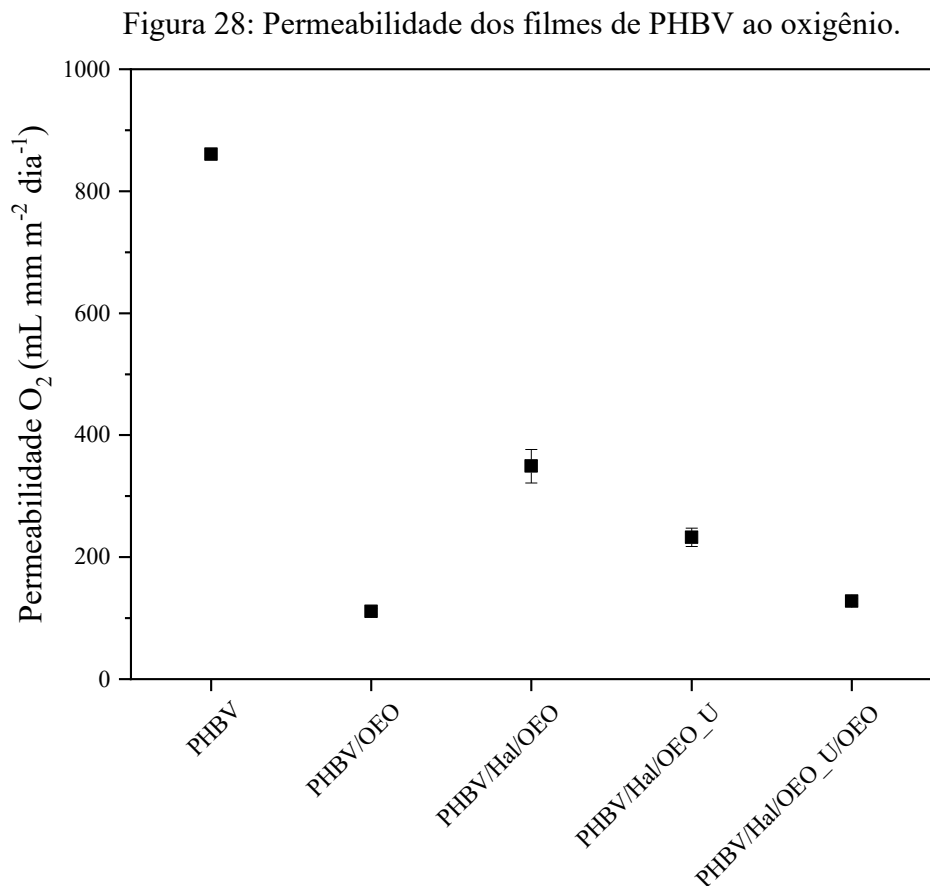
A presença do OEO na matriz polimérica proporcionou uma tendência de redução no grau de cristalinidade do filme e na temperatura de cristalização. Esse efeito que ocorre com óleos essenciais indica que os componentes do óleo interagiram com a matriz polimérica, alterando sua mobilidade e afetando o seu comportamento térmico. No trabalho realizado por Requena *et al.*¹²³, a incorporação de óleo essencial de orégano na matriz polimérica de PHBV diminuiu o grau de cristalinidade de 66,5% para 50,7%.

Para as amostras PHBV/Hal/OEO e PHBV/Hal/OEO_U, a temperatura de cristalização ficou próxima ao PHBV puro, indicando que as argilas não atuaram como agentes nucleantes, o que faria com que a temperatura de cristalização a partir do estado fundido aumentasse e conseqüentemente o processo de cristalização fosse mais rápido com formação de esferulitos menores. Essa diminuição também pode ser um indicativo de uma má dispersão das argilas no PHBV.⁵ Além disto, pode-se verificar que não houve alterações significativas no grau de cristalinidade dos polímeros. Esses resultados também foram encontrados em trabalhos semelhantes onde foram utilizadas Mt e Hal.¹²⁴⁻¹²⁶

4.2.3 Permeabilidade ao oxigênio

O oxigênio é responsável pela deterioração dos alimentos durante o armazenamento e manuseio. A alta concentração de O_2 pode resultar em alterações químicas nos alimentos, como oxidação, descoloração e mudança no sabor. Além de contribuir no crescimento microbiano, a presença de oxigênio acelera a produção de eteno, principal responsável pelo amadurecimento de alimentos, como frutas. Portanto, a produção de embalagens com barreira ao oxigênio adequada pode ajudar a melhorar a qualidade e estender a vida útil dos produtos ali acondicionados.^{127,128}

A Figura 28 apresenta os resultados da análise de permeabilidade ao O_2 dos filmes PHBV puro, PHBV/OEO e das diferentes composições de nanocompósitos. O PHBV puro exibiu valor de permeabilidade de $860,6 \pm 0,0 \text{ mL mm m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. Ao adicionar o OEO com ou sem a presença de Hal pura ou Hal modificada, o valor de permeabilidade ao O_2 diminuiu em mais de 60%, indicando que a adição desses aditivos promoveu um aumento na propriedade de barreira do filme.



O filme PHBV/OEO foi que apresentou maior barreira ao oxigênio. Possivelmente, essa melhoria na propriedade foi devido ao fato de o OE estar nos espaços vazios do material, dificultando a difusão das moléculas de O₂. Em trabalho anterior realizado por da Costa *et al.*²¹ também foram obtidas reduções significativas na barreira a gases ao adicionar OEO à matriz polimérica de PHBV, diminuindo em aproximadamente 80% a permeabilidade ao oxigênio quando comparado ao filme de PHBV puro. No entanto, em outro trabalho realizado por Souza *et al.*¹²⁹ a adição de óleo essencial de alecrim (OEA) em filme de quitosana proporcionou um aumento de aproximadamente 15% na permeabilidade ao oxigênio quando comparado ao filme de quitosana pura. Segundo os autores, o OEA estaria atuando como plastificante, aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas, assim facilitando a difusão das moléculas de O₂ através do filme.

Todos os nanocompósitos produzidos apresentaram uma redução significativa na permeabilidade a oxigênio comparados ao filme de PHBV puro. Esta melhoria na propriedade de barreira observada para os nanocompósitos pode ser atribuída ao aumento de caminhos tortuosos para a difusão de moléculas de O₂ induzidas pela adição das nanopartículas de argila na matriz polimérica, uma vez que os valores do grau de cristalinidade dos nanocompósitos se encontram próximos ao do polímero puro (Tabela 8). Assim, as nanopartículas atuam como obstáculos para a transferência de moléculas de O₂.⁶⁰ A melhoria na propriedade de barreira proporcionada pela presença de Hal também foi observada em estudo realizado por Risyon *et al.*⁶⁰ onde ao adicionar 3% em massa de Hal na matriz de PLA, a propriedade de barreira melhorou aproximadamente 33%.

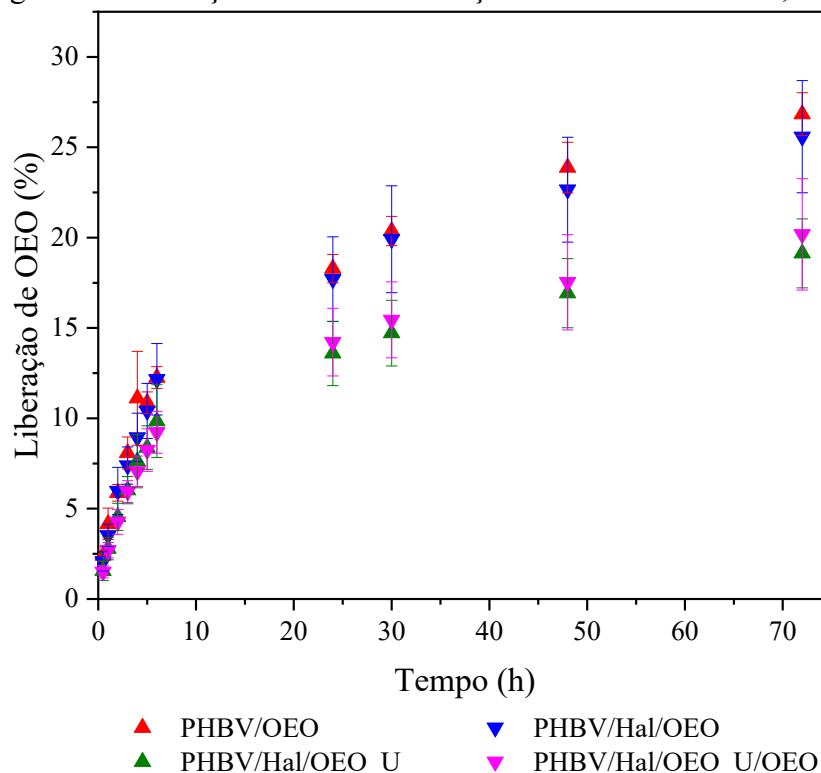
No entanto, a amostra de PHBV/Hal/OEO apresentou uma menor propriedade de barreira ao oxigênio quando comparada às amostras PHBV/Hal/OEO_U e PHBV/Hal/OEO_U/OEO. Apesar da presença do OEO na amostra PHBV/Hal/OEO, a compatibilidade entre a nanopartícula de argila e a matriz polimérica é limitada, em razão da Hal ser de natureza hidrofílica, o que implica na formação de aglomerados e geração de caminhos preferenciais de difusão, levando a uma maior permeabilidade.¹²⁵ Assim, nas amostras PHBV/Hal/OEO_U e PHBV/Hal/OEO_U/OEO, a modificação prévia da superfície da argila com OEO proporcionou uma característica organofílica na argila e provavelmente uma melhor dispersão na matriz, melhorando a interação entre polímero e argila e diminuindo a permeabilidade ao oxigênio.

4.2.4 Ensaio de liberação do OEO

Os nanocompósitos e filmes de PHBV contendo OEO foram utilizados para analisar a liberação do óleo essencial em meio simulador de alimentos. O meio utilizado neste trabalho foi de ácido acético 3% (v/v), que simula meios aquosos e de alimentos com pH inferior a 4,5, como leite fermentado, natas, queijo, vinagre, frutas sob forma de conserva ou pastosa e carnes em conserva em meio aquoso, conforme o Regulamento n° 10/2011 da União Europeia.⁹⁷ Este meio foi utilizado pois, segundo alguns estudos, os compostos do OE tem uma liberação satisfatória em um período de 24 h, com concentração necessária para inibição bacteriana nestes casos.^{21,98}

As taxas de liberação do OE podem ser influenciadas pela polaridade do meio simulador de alimento. Assim, para compostos apolares – como OEO – haverá uma liberação maior em meios apolares.⁹⁸ O perfil de liberação do OEO em meio de ácido acético 3% está apresentado na Figura 29.

Figura 29: Liberação de OEO em solução de ácido acético 3%, a 25 °C.



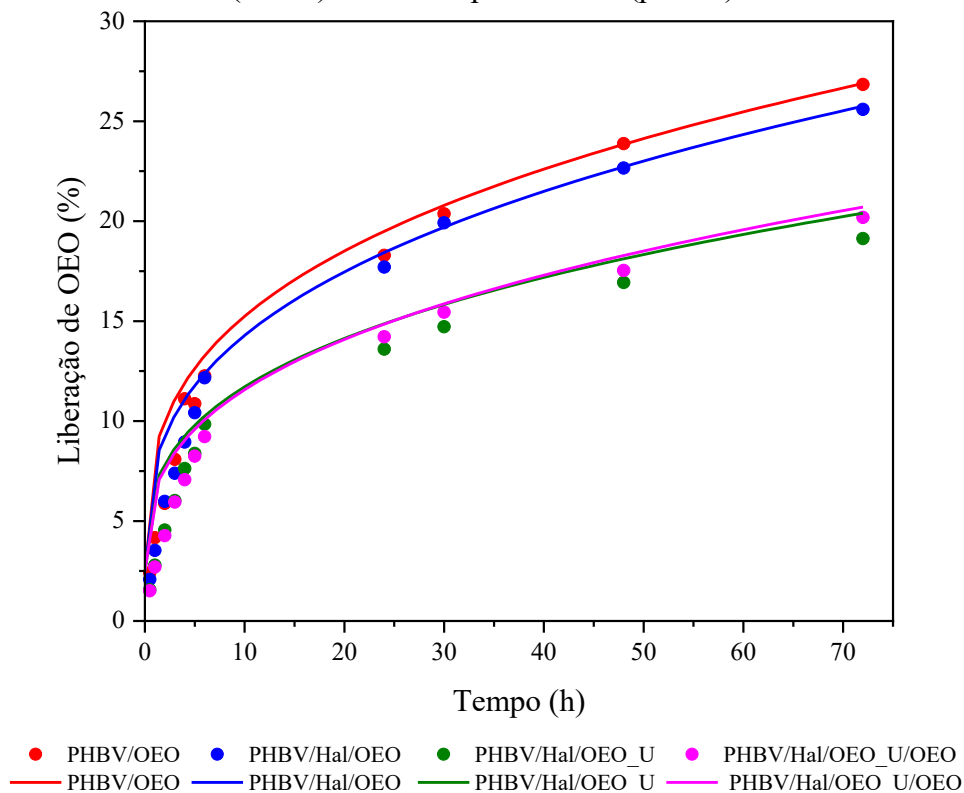
Embora o meio de simulador seja de caráter polar, os resultados obtidos apresentaram uma liberação gradual do OEO para todos os filmes. O filme de PHBV/OEO apresentou um

perfil de liberação mais rápida quando comparado aos outros sistemas, com um percentual de 27% de OEO liberado em um período de 72 h. Para PHBV/Hal/OEO, o perfil de liberação foi um pouco mais lento que o PHBV/OEO, devido à presença da argila que dificulta a difusão das moléculas de OEO para o meio, resultando neste mesmo período à liberação de 25% de OEO.

Os nanocompósitos com a argila modificada com OEO (PHBV/Hal/OEO_U e PHBV/Hal/OEO_U/OEO) apresentaram um perfil de liberação mais lento quando comparado aos outros sistemas, com uma liberação de aproximadamente 19% para ambos. Essa liberação mais lenta pode ser justificada pelo óleo estar aprisionado na Hal, dificultando a sua difusão para o meio.

A fim de determinar o mecanismo da difusão do soluto através do polímero para o meio, os dados obtidos experimentalmente foram submetidos ao modelo matemático de Korsmeyer-Peppas a partir do software DDSolver®. A Figura 30 apresenta o perfil de liberação de cada amostra juntamente com os ajustes realizado pelo modelo Korsmeyer-Peppas.

Figura 30: Concentração prevista de OEO liberado utilizando o modelo Korsmeyer-Peppas (linhas) e dados experimentais (pontos)



A partir dos resultados obtidos, é possível observar que para todas as amostras o modelo matemático apresentou um bom ajuste na liberação do OEO, com um R^2 acima de 0,94

(Tabela 9). Além disso, expoente de difusão (n) foi menor que 0,5, indicando que a liberação do OEO ocorreu predominantemente por difusão Fickiana, onde o tempo de relaxação da cadeia polimérica é maior do que a difusão do OEO.^{130,131} Também é possível observar que as amostras de PHBV/OEO e PHBV/Hal/OEO exibiram uma taxa de liberação mais rápida – k igual 5,98 e 5,34, respectivamente – quando comparadas ao PHBV/Hal/OEO_U e PHBV/Hal/OEO_U/OEO (4,24 e 4,02).

Tabela 9: Parâmetros do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas para liberação de OEO em ácido acético 3%.

Amostra	R ²	k	n
PHBV/OEO	0,95	5,98	0,33
PHBV/Hal/OEO	0,94	5,34	0,34
PHBV/Hal/OEO_U	0,94	4,24	0,34
PHBV/Hal/OEO_U/OEO	0,94	4,02	0,35

R² - o coeficiente de determinação; K - constante de proporcionalidade; n – expoente de difusão.

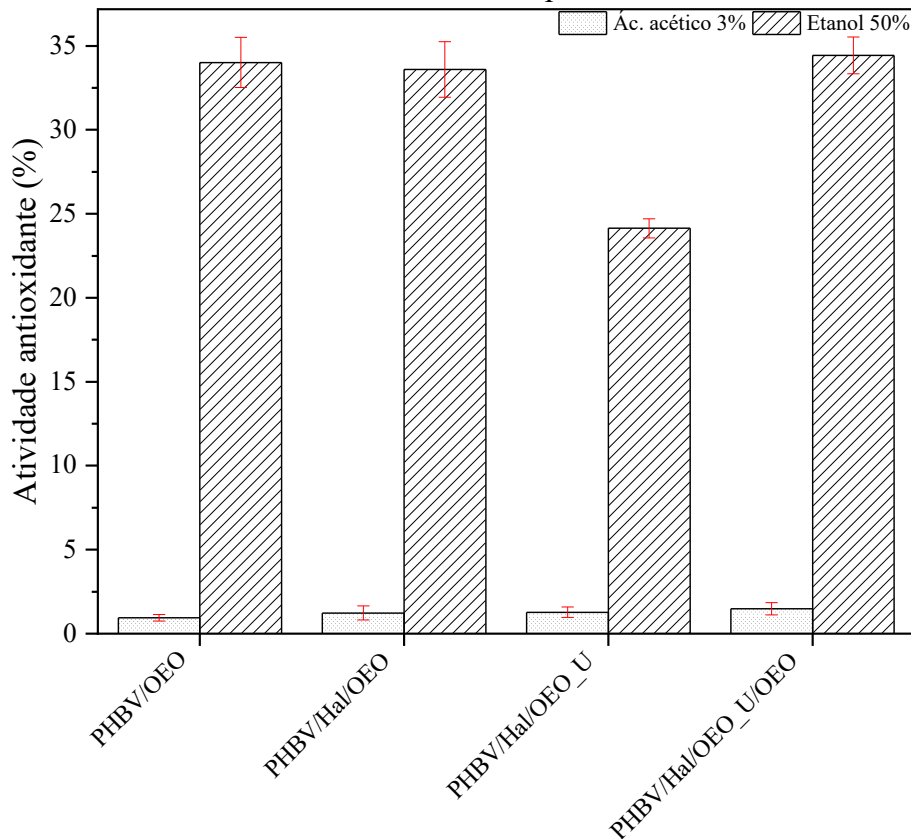
4.2.5 Atividade antioxidante

O método de DPPH' baseia-se na redução da solução alcoólica de DPPH na presença de um antioxidante doador de hidrogênio. Assim, a atividade antioxidante de um único composto ou extratos de plantas pode ser determinada pela medição do consumo de oxigênio ou produção de hidroperóxidos ou outros produtos da degradação.¹³²

A capacidade antioxidante de diferentes composições de filme de PHBV pelo método DPPH' está indicado na Figura 31. O filme de PHBV puro não apresentou atividade antioxidante significativa para os meios de etanol 50% (v/v) e ácido acético 3% (v/v), resultados não apresentados no gráfico.

Para o meio de etanol 50% (v/v), é possível observar que os filmes PHBV/OEO, PHBV/Hal/OEO e PHBV/Hal/OEO_U/OEO, com mesma quantidade de OEO adicionada (8% em massa), apresentaram em torno de 34% de capacidade antioxidante. Enquanto para o nanocompósito com a argila modificada sem acréscimo de OEO (2,4% em massa de OEO), apresentou uma capacidade antioxidante um pouco inferior dos outros nanocompósitos, aproximadamente 28%. Essa menor atividade pode ser devido à menor concentração de OEO presente no filme, uma vez que no caso da argila modificada com acréscimo de OEO (PHBV/Hal/OEO_U/OEO), esta atividade ficou próxima do PHBV/Hal/OEO.

Figura 31: Capacidade antioxidantes de simuladores alimentares após exposição às amostras de filmes de PHBV contendo OEO, a partir do método de DPPH.



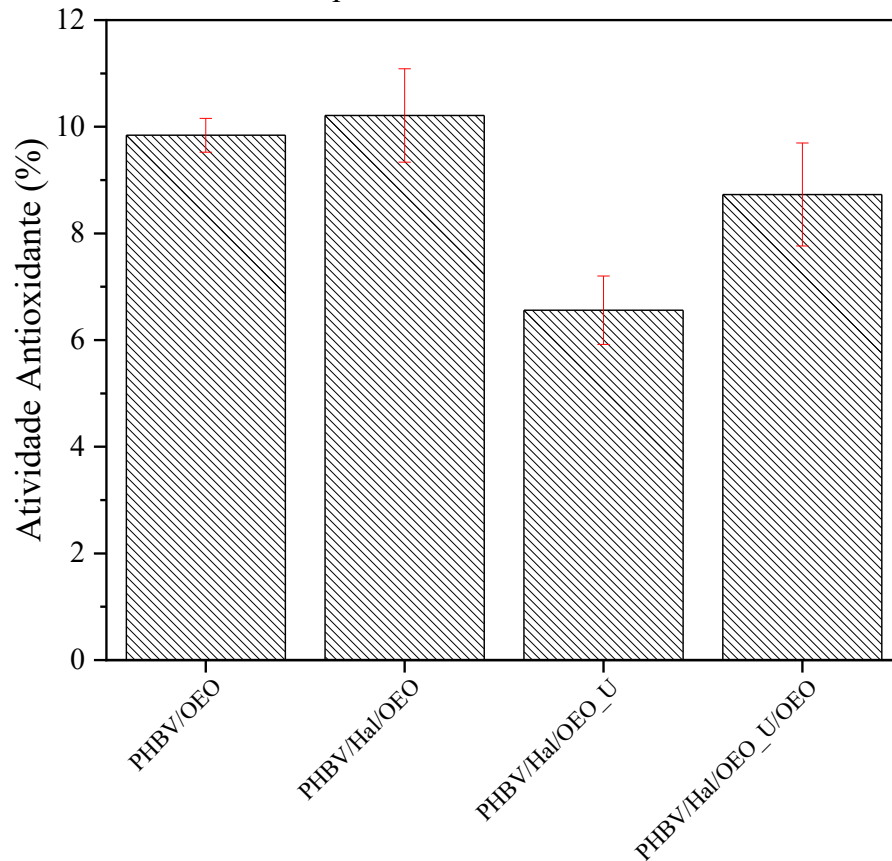
Para o meio de ácido acético 3%, todos os filmes apresentaram baixa capacidade antioxidante. Isso possivelmente em razão do meio ter baixa concentração de OEO, conforme observado no ensaio de liberação. Em estudo realizado por Requena *et al.*⁹⁸ foi observado que compostos apolares, como carvacrol, tiveram uma liberação mais rápida em meio de etanol 50% do que em meio de ácido acético. Este resultado também foi encontrado no trabalho realizado por Ramos *et al.*¹³³ onde foram preparados filmes de polipropileno (PP) com timol e carvacrol, em que não foi observada inibição de DPPH* em meio de ácido acético 3%, devido ao pH deste simulador. Geralmente o aumento da concentração de íons de hidrogênio leva uma diminuição da taxa de reação de eliminação do radical, enquanto em condições básicas a desprotonação de polifenólicos aumentaria a capacidade redutora dos compostos.

Essa diferença entre os dois meios também foi observada em outro estudo realizado por Muriel – Galet *et al.*¹³⁴ onde um filme do copolímero de etileno e álcool vinílico com óleo essencial de orégano apresentou liberação mais rápida em meios de etanol 50% do que em ácido acético 3% em um mesmo período de tempo, devido à maior compatibilidade química entre os

componentes. Esse aumento na migração do OEO em etanol 50% resultou em uma maior atividade antioxidante.

A capacidade antioxidante dos filmes em meio de ácido acético 3% também foi determinada pelo método ABTS^{•+}. Os resultados estão apresentados na Figura 32.

Figura 32: Atividade antioxidantes dos filmes contendo OEO em meio de ácido acético 3% pelo método ABTS^{•+}.



Para todos os filmes contendo OEO, o resultado da atividade antioxidante foi maior quando comparado aos resultados obtidos pelo método DPPH[•] em meio de ácido acético 3%. Essa diferença é, provavelmente, por razão do método ABTS^{•+} ser aplicado à medição da atividade antioxidante em soluções aquosas enquanto o DPPH[•] se aplica a soluções alcoólicas.^{104,135} Essa diferença entre os métodos também foi observada por Llana-Ruiz-Cabello *et al.*¹³⁶ onde filmes de PLA contendo 5% de OEO apresentaram em torno 60% de atividade antioxidante para método de ABTS^{•+} enquanto para o método de DPPH[•] obteve em torno de 20% de atividade antioxidante.

Para as amostras PHBV/Hal/OEO_U e PHBV/Hal/OEO_U/OEO a atividade foi um pouco menor comparada às amostras PHBV/Hal/OEO e PHBV/OEO, possivelmente devido à

menor concentração de OEO livre para migração ao meio simulador. Esse resultado condiz com o ensaio de liberação, onde os nanocompósitos com argila modificadas tiveram liberação mais lenta de OEO em meio ácido.

4.2.6 Atividade antimicrobiana dos filmes

A atividade antimicrobiana dos filmes de PHBV contendo diferentes composições de OEO foi avaliada a partir da metodologia JIS Z 2801:2000 e os resultados estão apresentados na Tabela 10. De acordo com o método JIS, a eficácia antimicrobiana deve permitir uma redução de $R \geq 2$ nos materiais avaliados, onde R é valor da atividade antibacteriana.²¹

Tabela 10: Carga microbiana em filmes de PHBV contendo OEO calculados por ensaio de contato direto contra *E. coli*.

Amostra	Após a inoculação (UFC mL ⁻¹)	Depois de 24 h (UFC mL ⁻¹)	R**
Referência*	$1,6 \times 10^4$	$5,5 \times 10^7$	-
PHBV/OEO	-	$1,3 \times 10^5$	$5,7 \pm 2,5$
PHBV/Hal/OEO	-	Sem crescimento	$7,6 \pm 0,0$
PHBV/Hal/OEO_U	-	$9,0 \times 10^6$	$0,6 \pm 0,1$
PHBV/Hal/OEO_U/OEO	-	$8,3 \times 10^5$	$1,7 \pm 0,2$

* Filme controle sem agente antibacteriano

** \pm valores determinados a partir de testes realizados em triplicada.

O filme PHBV/OEO apresentou uma redução satisfatória na contagem bacteriana de 5,7 unidades de log na contagem de *E. coli*. Em estudo realizado por Figueroa-Lopez *et al.*¹³⁷ utilizando a mesma metodologia de JIS Z 2801:2000, foi observado que os filmes PHBV contendo OEO apresentaram inibição de até 3 unidades de log após o período de 15 dias para bactéria *E. coli*.

A amostra PHBV/Hal/OEO, onde o OEO foi adicionado diretamente na matriz polimérica, apresentou inibição de 7,6 unidades de log na contagem de *E. coli*. Este valor é superior ao encontrado em estudos realizados por da Costa *et al.*²¹ de 2,3 unidades de log na contagem de *E. coli*. Essa boa inibição está relacionada à difusão do óleo para o meio com um leve impedimento ocasionado pela cristalinidade do PHBV e/ou argila pura. Embora essa amostra (PHBV/Hal/OEO) tenha apresentado boa inibição, ela atuaria em um período de tempo mais curto quando comparado a amostra PHBV/Hal/OEO_U/OEO, uma vez que a liberação do OE ocorre mais rapidamente, conforme apresentado no ensaio de liberação, diminuindo assim o tempo de ação microbiana.

Para o filme contendo a argila modificada (PHBV/Hal/OEO_U) não foi observada uma redução significativa na contagem bacteriana, obtendo como resultado 0,6 unidades de log na contagem de *E. coli*, possivelmente causado em razão do óleo estar adsorvido na superfície externa da argila, retardando a difusão do OEO para o meio. No entanto, a amostra PHBV/Hal/OEO_U/OEO, com acréscimo de OEO, se mostrou ser promissora, uma vez que seu resultado foi próximo a uma redução de 2 log, indicando que uma correção no teor de óleo livre poderia atingir o efeito desejado, com uma liberação mais rápida no início do processo ocasionada pelo óleo livre presente na matriz e uma liberação mais lenta do restante do óleo retido na argila que poderia prolongar o tempo de prateleira do alimento.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, diferentes metodologias foram utilizadas para a modificação de argilas com óleos essenciais. Dentre todos os processos testados, o que mais se mostrou promissor foi a modificação da Hal com OEO pelo processo de ultrassom seguido de aplicação de vácuo, atingindo um percentual de incorporação máximo de 45%. Embora tenham sido realizadas algumas variações nesta metodologia, aparentemente chegou-se a uma saturação do material com o óleo. Portanto, a amostra que apresentou melhores resultados foi utilizando a argila haloisita (Hal/OEO_U) com uma adsorção majoritária do OEO na superfície externa do material, bem como no seu lúmen. Além disso, esta amostra Hal/OEO_U apresentou uma maior retenção do óleo incorporado, comprovada pelo perfil de evaporação mais lento e gradual. Sendo assim, esta foi selecionada para a continuidade dos estudos com a formação dos nanocompósitos de PHBV.

Embora a presença da Hal modificada tenha promovido uma pequena diminuição na estabilidade térmica do polímero nas duas composições preparadas, ela contribuiu para uma melhor propriedade de barreira ao oxigênio quando comparada às demais amostras. Isso é resultado da modificação da superfície da argila com OEO, proporcionando uma maior característica organofílica que resultou em uma melhor interação com o polímero e, conseqüentemente, uma melhor dispersão.

A composição em que foi utilizada argila modificada com acréscimo de OEO durante o processamento (PHBV/Hal/OEO_U/OEO) apresentou-se como a mais promissora, com uma liberação lenta e gradual do óleo em meio simulador de alimentos. Além disso, esta composição demonstrou uma boa atividade antioxidante em um período de 48 h e uma inibição bacteriana próxima ao valor necessário para cumprimento da norma JIS Z 2801:2000. Portanto, um ajuste no teor de óleo livre permitiria uma rápida e maior liberação no período das primeiras 24 h. Por conter OEO imobilizado em sua estrutura, este efeito poderia se prolongar, assim aumentando o tempo de vida útil do produto.

REFERÊNCIAS

1. European Bioplastic. Bioplastics market data update. Berlin: **European Bioplastics**, 2021. <https://www.european-bioplastics.org/market/>. Acesso: 04 maio 2022.
2. SHAKIL, O.; MASOOD, F.; YASIN, T. Characterization of physical and biodegradation properties of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate/sepiolite nanocomposites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 173–183, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.193>.
3. LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1–8, 2005. <https://doi.org/10.1021/bm049700c>.
4. ANJUM, A.; ZUBER, M.; ZIA, K. M.; NOREEN, A.; ANJUM, M.N.; TABASUM, S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 161–174, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>.
5. BRANDOLT, S. D. F.; DAITX, T. S.; MAULER, R.; ORNAGHI JUNIOR, H. L.; CRESPO, J. S.; CARLI, L. N. Synergistic effect between different clays and plasticizer on the properties of PHBV nanocomposites. **Polymer Composites**, v. 40, p. 3835–3843, 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/pc.25242>.
6. AJMAL, A. W.; MASOOD, F.; YASIN, T. Influence of sepiolite on thermal, mechanical and biodegradation properties of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 156, p. 11–19, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.01.010>.
7. GORRASI, G. Dispersion of halloysite loaded with natural antimicrobials into pectins: Characterization and controlled release analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 47–53, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.050>.
8. TORNUK, F.; SAGDIC, O.; HANCER, M.; YETIM, H. Development of LLDPE based active nanocomposite films with nanoclays impregnated with volatile compounds. **Food Research International**, v. 107, p. 337–345, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.036>.
9. BIDDECI, G.; CAVALLARO, G.; DI BLASI, F.; LAZZARA, G.; MASSARO, M.; MILIOTO, S.; PARISI, F.; RIELA, S.; SPINELLI, G. Halloysite nanotubes loaded with peppermint essential oil as filler for functional biopolymer film. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 548–557, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.041>.
10. JORGE, N. Embalagens para alimentos. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-reitoria de Graduação, 2013. p. 194. ISBN 978-85-7983-394-6.
11. MA, J.; ZHANG, J.; XIONG, Z.; YONG, Y.; ZHAO, X. S. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-modified graphene oxide. **Journal of**

Materials Chemistry, v. 21, p. 3350–3352, 2011. <https://doi.org/10.1039/C0JM02806A>.

12. FORTUNATI, E.; ARMENTANO, I.; ZHOU, Q.; IANNONI, A.; SAINO, E.; VISAI, L.; BERGLUND, L. A.; KENNY, J. M. Multifunctional bionanocomposite films of poly(lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1596–1605, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.066>.

13. HENDESSI, S.; SEVINIS, E. B.; UNAL, S.; CEBECI, F. C.; MENCELOGLU, Y. Z.; UNAL, H. Antibacterial sustained-release coatings from halloysite nanotubes/waterborne polyurethanes. **Progress in Organic Coatings**, v. 101, p. 253–261, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.porgcoat.2016.09.005>.

14. FERNÁNDEZ, M. A.; ROQUE, L. B.; ESPINOSA, E. G.; DEYÁ, C.; BELLOTTI, N. Organo-montmorillonite with biogenic compounds to be applied in antifungal coatings. **Applied Clay Science**, v. 184, p. 105369 2020. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105369>.

15. ASTM - American Society for Testing and Materials. ASTM D 883-12: Standard Terminology Relating to Plastics. West Conshohocken: **ASTM International**, 2012. doi:10.1520/D0883-12.2.

16. RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, v. 50, p. 962–1079, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2005.05.002>.

17. ZHONG, Y.; GODWIN, P.; JIN, Y.; XIAO, H. Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, v. 3, p. 27–35, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002>.

18. BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 125–155, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.10.002>.

19. MELENDEZ-RODRIGUEZ, B.; FIGUEROA-LOPEZ, K. J.; BERNARDOS, A.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; CABEDO, L.; TORRES-GINER, S.; LAGARON, J. M. Electrospun antimicrobial films of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) containing eugenol essential oil encapsulated in mesoporous silica nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 9, p. 227, 2019. <https://doi.org/10.3390/nano9020227>.

20. ZHAO, X.; JI, K.; KURT, K.; CORNISH, K.; VODOVOTZ, Y. Optimal mechanical properties of biodegradable natural rubber-toughened PHBV bioplastics intended for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 21, p. 100348, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100348>.

21. da COSTA, R. C.; DAITX, T. S.; MAULER, R. S.; DA SILVA, N. M.; MIOTTO, M.; CRESPO, J. S.; CARLI, L. N. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-based nanocomposites for antimicrobial active food packaging containing oregano essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, p. 100602, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100602>.

22. RAUTUREAU, M.; GOMES, C. S. F.; LIEWIG, N.; KATOUZIAN-SAFADI, M. Clay and Clay Mineral Definition. **Clays and Health: Properties and Therapeutic Uses**, p. 5–31, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42884-0_2.
23. LI, W.; ZALOGA, J.; DING, Y.; YUFANG, L.; JANKO, C.; PISCHETSRIEDER, M.; ALEXIOU, C.; BOCCACCINI, A. R. Facile preparation of multifunctional superparamagnetic PHBV microspheres containing SPIONs for biomedical applications. **Scientific Reports**, v. 6, p. 23140, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep23140>.
24. LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 536–583, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003>.
25. RAGAERT, P.; BUNTINX, M.; MAES, C.; VANHEUSDEN, C.; PEETERS, R.; WANG, S.; D'HOOGHE, D. R.; CARDON, L. Polyhydroxyalkanoates for Food Packaging Applications. **Reference Module in Food Science**, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22502-X>.
26. TAGUCHI, S.; DOI, Y. Evolution of Polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by ‘enzyme evolution’: Successful case studies of directed evolution. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 145–156, 2004. <https://doi.org/10.1002/mabi.200300111>.
27. ALDOR, I.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composition in recombinant *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 76, p. 108–114, 2001. <https://doi.org/10.1002/bit.1150>.
28. SATO, H.; ANDO, Y.; DYBAL, J.; IWATA, T.; NODA, I.; OZAKI, Y. Crystal structures, thermal behaviors, and C-H...O=C hydrogen bondings of poly(3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate) studied by infrared spectroscopy and X-ray diffraction. **Macromolecules**, v. 41, p. 4305–4312, 2008. <https://doi.org/10.1021/ma702222a>.
29. BLUHM, T. L.; HAMER, G. K.; MARCHESSAULT, R. H.; FYFE, C. A.; VEREGIN, R. P. Isodimorphism in bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). **Macromolecules**, v. 19, p. 2871–2876, 1986. <https://doi.org/10.1021/ma00165a035>.
30. ORTS, W. J.; MARCHESSAULT, R. H.; BLUHM, T. L. Thermodynamics of the Melting Point Depression in Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) Copolymers. **Macromolecules**, v. 24, p. 6435–6438, 1991. <http://dx.doi.org/10.1021/ma00024a010>.
31. YOSHIE, N.; SAITO, M.; INOUE, Y. Structural Transition of Lamella Crystals in a Isomorphous Copolymer, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Macromolecules**, v. 34, p. 8953–8960, 2001. <http://dx.doi.org/10.1021/ma0113071>.
32. AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E.; RAIMO, M. Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. **Journal of Materials Science**, v. 35, p. 523–545, 2000. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1004740522751>.

33. SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503–1555, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700\(00\)00035-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700(00)00035-6).
34. HA, C. S.; CHO, W. J. Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 759–809, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700\(01\)00050-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700(01)00050-8).
35. HUSSAIN, C. M. Polymer nanocomposites-An intro. **New Polymer Nanocomposites for Environmental Remediation**, p. XXI–XXV, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811033-1.09997-2>.
36. PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**, v. 49, p. 3187–3204, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2008.04.017>.
37. KARAK, N. Fundamentals of Nanomaterials and Polymer Nanocomposites. **Nanomaterials and Polymer Nanocomposites: Raw Materials to Applications**, Cap. 1, p. 1-45, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814615-6.00001-1>.
38. PASSADOR, F. R.; RUVOLO-FILHO, A.; PESSAN, L. A. Nanocomposites of polymer matrices and lamellar clays. **Nanostructures**, Cap 7, p. 187-207, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49782-4.00007-3>.
39. LAJARRIGE, A.; GONTARD, N.; GAUCEL, S.; SAMSON, M. F.; PEYRON, S. The mixed impact of nanoclays on the apparent diffusion coefficient of additives in biodegradable polymers in contact with food. **Applied Clay Science**, v. 180, p. 105170, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105170>.
40. CARLI, L. N.; CRESPO, J. S.; MAULER, R. S. PHBV nanocomposites based on organomodified montmorillonite and halloysite: The effect of clay type on the morphology and thermal and mechanical properties. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 42, p. 1601–1608, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2011.07.007>.
41. PUGLIA, D.; FORTUNATI, E.; D'AMICO, D. A.; MIRI, V.; STOCLET, G.; MANFREDI, L. B.; CYRAS, V. P.; KENNY, J. M. Influence of Processing Conditions on Morphological, Thermal and Degradative Behavior of Nanocomposites Based on Plasticized Poly(3-hydroxybutyrate) and Organo-Modified Clay. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 24, p. 12–22, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-015-0744-5>.
42. SANCHEZ-GARCIA, M. D.; LAGARON, J. M. Novel Clay-Based Nanobiocomposites of Biopolyesters with Synergistic Barrier to UV Light, Gas, and Vapour. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, p. 188–199, 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/app.31986>.
43. CARLI, L. N.; DAITX, T. S.; SOARES, G. V.; CRESPO, J. S.; MAULER, R. S. The effects of silane coupling agents on the properties of PHBV/halloysite nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 87, p. 311–319, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.032>.

44. GARCIA-GARCIA, D.; GARCIA-SANOQUERA, D.; FOMBUENA, V.; LOPEZ-MARTINEZ, J.; BALART, R. Improvement of mechanical and thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) blends with surface-modified halloysite nanotubes (HNT). **Applied Clay Science**, v. 162, p. 487–498, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.06.042>.
45. CABEDO, L.; PLACKETT, D.; GIMÉNEZ, E.; LAGARÓN, J. M. Studying the degradation of polyhydroxybutyrate-*co*-valerate during processing with clay-based nanofillers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, p. 3669–3676, 2009. <https://doi.org/10.1002/app.29945>.
46. SANCHEZ-GARCIA, M. D.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M. Morphology and barrier properties of nanobiocomposites of poly(3-hydroxybutyrate) and layered silicates. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, p. 2787–2801, 2008. <https://doi.org/10.1002/app.27622>.
47. ZHANG, Q.; LIU, Q.; MARK, J. E.; NODA, I. A novel biodegradable nanocomposite based on poly (3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) and silylated kaolinite/silica core-shell nanoparticles. **Applied Clay Science**, v. 46, p. 51–56, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2009.07.008>.
48. HE, G.; WANG, C.; CAO, J.; FAN, L.; ZHAO, S.; CHAI, Y. Carboxymethyl chitosan-kaolinite composite hydrogel for efficient copper ions trapping. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, p. 102953, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102953>.
49. KENNOUCHE, S.; DEHOUCHE, N.; KACI, M.; LOPEZ-CUESTA, J.M. Morphological and Properties Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate-*co*-3-Hydroxyvalerate)/Halloysite Nanotubes Bionanocomposites. **Advances in Bionanomaterials II**, p. 16–23, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-47705-9_2.
50. HASAN, S. K.; ZAINUDDIN, S.; TANTHONGSACK, J.; HOSUR, M.; ALLEN, L. A study of poly (3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) biofilms' thermal and biodegradable properties reinforced with halloysite nanotubes. **Journal of Composite Materials**, v. 52, p. 3199–3207, 2018. <https://doi.org/10.1177/0021998318763246>.
51. GUGGENHEIM, S.; MARTIN, R. T. Definition of Clay and Clay Mineral: Joint Report of the AIPEA Nomenclature and CMS Nomenclature Committees. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 255–256, 1995. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1995.0430213>.
52. BIBI, I.; ICENHOWER, J.; NIAZI, N. K.; NAZ, T.; SHAHID, M.; BASHIR, S. Clay Minerals: Structure, Chemistry, and Significance in Contaminated Environments and Geological CO₂ Sequestration. **Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention**, Cap 21, p. 543–567, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803837-6.00021-4>.
53. MURRAY, H. H. Structure and Composition of the Clay Minerals and their Physical and Chemical Properties. **Developments in Clay Science**, Cap. 2, v. 2, p. 7-31, 2006. [https://doi.org/10.1016/0169-1317\(91\)90014-Z](https://doi.org/10.1016/0169-1317(91)90014-Z).
54. BERGAYA, F.; LAGALY, G. General introduction: Clays, clay minerals, and clay

science. **Developments in Clay Science**, Cap. 1, v. 5, p. 1–19, 2013.
[https://doi.org/10.1016/S1572-4352\(06\)02002-2](https://doi.org/10.1016/S1572-4352(06)02002-2).

55. BATISTA, F. A.; NASCIMENTO, S. Q.; SOUSA, A. B.; JÚNIOR, E. F.R.; PEREIRA, P. I. de A; FONTENELE, V. M.; SILVA FILHO, E. C.; MAGALHÃES, J. L.; LUZ, R. A.S.; CANTANHÊDE, W.; MENDES, A. N. Synthesis, characterization and electrochemical properties of composites synthesized from silver-tannic acid hybrid nanoparticles and different clays. **Applied Clay Science**, v. 181, p. 105219, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105219>.

56. JOUSSEIN, E.; PETIT, S.; CHURCHMAN, J.; RIGHI, D.; DELVAUX, B. Halloysite clay minerals - a review. **Clay Minerals**, v. 40, p. 383-426, 2005.
<https://doi.org/10.1180/0009855054040180>.

57. PASBAKSH, P.; CHURCHMAN, G. J.; KEELING, J. L. Characterisation of properties of various halloysites relevant to their use as nanotubes and microfibre fillers. **Applied Clay Science**, v. 74, p. 47–57, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.06.014>.

58. CRAVERO, F.; MAIZA, P. J.; MARFIL, S. A. Halloysite in Argentinian deposits: origin and textural constraints. **Clay Minerals**, v. 47, p. 329–340, 2012.
<https://doi.org/10.1180/claymin.2012.047.3.04>.

59. DAITX, T. S.; CARLI, L. N.; CRESPO, J. S.; MAULER, R. S. Effects of the organic modification of different clay minerals and their application in biodegradable polymer nanocomposites of PHBV. **Applied Clay Science**, v. 115, p. 157–164, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2015.07.038>.

60. RISYON, N. P.; OTHMAN, S. H.; BASHA, R. K.; TALIB, R. A. Characterization of polylactic acid/halloysite nanotubes bionanocomposite films for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, p. 100450, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100450>.

61. LEE, M. H.; KIM, S. Y.; PARK, H. J. Effect of halloysite nanoclay on the physical, mechanical, and antioxidant properties of chitosan films incorporated with clove essential oil. **Food Hydrocolloids** **84**, 58–67 (2018).

62. TORNUK, F.; HANCER, M.; SAGDIC, O.; YETIM, H. LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 540–546, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.030>.

63. KREPKER, M.; ZHANG, C.; NITZAN, N.; PRINZ-SETTER, O.; MASSAD-IVANIR, N.; OLAH, A.; BAER, E.; SEGAL, E. Antimicrobial LDPE/EVOH layered films containing carvacrol fabricated by multiplication extrusion. **Polymers**, v. 10, p. 864, 2018.
<http://dx.doi.org/10.3390/polym10080864>.

64. KHAN, T. A.; DAHIYA, S.; ALI, I. Use of kaolinite as adsorbent : Equilibrium , dynamics and thermodynamic studies on the adsorption of Rhodamine B from aqueous solution. **Applied Clay Science**, v. 69, p. 58–66 ,2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2012.09.001>.

65. MIKOWSKI, A.; SOARES, P.; WYPYCH, F.; GARDOLINSKI, J. E. F. C.; LEPIENSKI, C. M. Mechanical properties of kaolinite ‘macro-crystals’. **Philosophical Magazine**, v. 87, p. 4445–4459, 2007. <https://doi.org/10.1080/14786430701550394>.

66. JOHNSTON, C. T. Probing the nanoscale architecture of clay minerals. **Clay Minerals**, v. 45, p. 245–279, 2010. <https://doi.org/10.1180/claymin.2010.045.3.245>.

67. NIU, J.; QIANG, Y.; LI, X.; LIU, Z.; ZHANG, S.; FENG, P.; OU, X. Morphology and orientation of curling of kaolinite layer in hydrate. **Applied Clay Science**, v. 101, p. 215–222, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2014.08.003>.

68. CHENG, H.; ZHOU, Y.; LIU, Q. Kaolinite Nanomaterials: Preparation, Properties and Functional Applications. i **Nanomaterials from Clay Minerals: A New Approach to Green Functional Materials**, Cap. 6, p. 285–334, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814533-3.00006-5>.

69. NAKHLI, A.; MBOUGA, M. G. N.; BERGAOUI, M.; KHALFAOUI, M.; CRETIN, M.; HUGUET, P. Modeling of essential oils adsorption onto clays towards a better understanding of their interactions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 249, p. 132–143, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.11.012>.

70. SALGADO, P. R.; ORTIZ, C. M.; MUSSO, Y. S.; DI GIORGIO, L.; MAURI, A. N. Edible films and coatings containing bioactives. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 86–92, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.004>.

71. VERMEIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN BEEST, M.; DE KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 77–86, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244\(99\)00032-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244(99)00032-1).

72. REQUENA, R.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Eugenol and carvacrol migration from PHBV films and antibacterial action in different food matrices. **Food Chemistry**, v. 277, p. 38–45, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.093>.

73. JANG, S.; JANG, S.; LEE, G.; RYU, J.; PARK, S.; PARK, N. Halloysite Nanocapsules Containing Thyme Essential Oil: Preparation, Characterization, and Application in Packaging Materials. **Journal of Food Science**, v. 82, p. 2113–2120, 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13835>.

74. BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989–4006, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>.

75. BALDIM, J. L.; SILVEIRA, J. G. F.; ALMEIDA, A. P.; CARVALHO, P. L. N.; ROSA, W.; SCHRIPSEMA, J.; CHAGAS-PAULA, D. A.; SOARES, M. G.; LUIZ, J. H. H. The synergistic effects of volatile constituents of *Ocimum basilicum* against foodborne pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 821–829, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.016>.

76. CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>.
77. BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722–734, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.052>.
78. ECONOMOU, G.; PANAGOPOULOS, G.; TARANTILIS, P.; KALIVAS, D.; KOTOULAS, V.; TRAVLOS, I. S.; POLYSIOU, M.; KARAMANOS, A. Variability in essential oil content and composition of *Origanum hirtum* L., *Origanum onites* L., *Coridothymus capitatus* (L.) and *Satureja thymbra* L. populations from the Greek island Ikaria. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 236–241, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.021>.
79. BOUNATIROU, S.; SMITI, S.; MIGUEL, M. G.; FALEIRO, L.; REJEB, M. N.; NEFFATI, M.; COSTA, M. M.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. **Food Chemistry**, v. 105, p. 146–155, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.059>.
80. SKENDI, A.; IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 6, p. 62–69, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.02.001>.
81. 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. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
82. EHIVET, F. E.; MIN, B.; PARK, M. K.; OH, J. H. Characterization and Antimicrobial Activity of Sweetpotato Starch-Based Edible Film Containing *Origanum* (*Thymus capitatus*) Oil. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 178–184, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01961.x>.
83. FILIP, S.; VIDOVIĆ, S.; VLADIĆ, J.; PAVLIĆ, B.; ADAMOVIĆ, D.; ZEKOVIĆ, Z. Chemical composition and antioxidant properties of *Ocimum basilicum* L. extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction: Drug exhausting method. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 109, p. 20–25, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.11.006>.
84. BEATOVIĆ, D.; KRSTIĆ-MILOŠEVIĆ, D.; TRIFUNOVIĆ, S.; ŠILJEGOVIĆ, J.; GLAMOČLIJA, J.; RISTIĆ, M.; JELACIĆ, S. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia. **Records of Natural Products**, v. 9, p. 62–75, 2015.
85. LI, A. S.; IIJIMA, A.; HUANG, J.; LI, Q. X.; CHEN, Y. Putative Mode of Action of the Monoterpenoids Linalool, Methyl Eugenol, Estragole, and Citronellal on Ligand-Gated Ion Channels. **Engineering**, v. 6, p. 541–545, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.07.027>.
86. MILENKOVIĆ, L.; STANOJEVIĆ, J.; CVETKOVIĆ, D.; STANOJEVIĆ, L.;

LALEVIĆ, D.; ŠUNIC, L.; FALLIK, E.; ILIĆ, Z. S. New technology in basil production with high essential oil yield and quality. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111718, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111718>.

87. TENEVA, D.; DENKOVA, Z.; DENKOVA-KOSTOVA, R.; GORANOV, B.; KOSTOV, G.; SLAVCHEV, A.; HRISTOVA-IVANOVA, Y.; UZUNOVA, G.; DEGRAEVE, P. Biological preservation of mayonnaise with *Lactobacillus plantarum* LBRZ12, dill, and basil essential oils. **Food Chemistry**, v. 344, p. 128707, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128707>.

88. Amor, G.; SABBAH, M.; CAPUTO, L.; IDBELLA, M.; DE FEO, V.; PORTA, R.; FECHTALI, T.; MAURIELLO, G. Basil Essential Oil: Composition, Antimicrobial Properties, and Microencapsulation to Produce Active Chitosan Films for Food Packaging. **Foods**, v. 10, p. 121, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10010121>.

89. LEE, M. H.; SEO, H.; PARK, H. J. Thyme Oil Encapsulated in Halloysite Nanotubes for Antimicrobial Packaging System. **Journal of Food Science**, v. 82, p. 922–932, 2017. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13675>.

90. ABDULLAYEV, E.; LVOV, Y. Halloysite Clay Nanotubes for Controlled Release of Protective Agents. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 10007–10026, 2011. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.5724>.

91. TAS, B. A.; SEHIT, E.; TAS, C. E.; UNAL, S.; CEBECI, F. C.; MENCELOGLU, Y. Z.; UNAL, H. Carvacrol loaded halloysite coatings for antimicrobial food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 20, p. 100300, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.004>.

92. SAUCEDO-ZUÑIGA, J. N.; SÁNCHEZ-VALDES, S.; RAMÍREZ-VARGAS, E.; GUILLEN, L.; RAMOS-DEVALLE, L. F.; GRACIANO-VERDUGO, A.; URIBE-CALDERÓN, J. A.; VALERA-ZARAGOZA, M.; LOZANO-RAMÍREZ, T.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J. A.; BORJAS-RAMOS, J. J.; ZULUAGA-PARRA, J. D. Controlled release of essential oils using laminar nanoclay and porous halloysite / essential oil composites in a multilayer film reservoir. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 316, p. 110882, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2021.110882>.

93. PROENÇA, L. B.; PENA, C. A. P.; DA SILVA, G. V.; CAMARGO, I. L. B. DA C.; BRANCIFORTI, M. C. Study of the Antibacterial Property of Tea Tree Oil and Its Incorporation Into Poly(Lactic Acid)-montmorillonite Clay Bionanocomposites. **Macromolecular Symposia**, v. 394, p. 2000073, 2020. <https://doi.org/10.1002/masy.202000073>.

94. GIANNAKAS, A.; TSAGKALIAS, I.; ACHILIAS, D. S.; LADAVOS, A. A novel method for the preparation of inorganic and organo-modified montmorillonite essential oil hybrids. **Applied Clay Science**, v. 146, p. 362–370, 2017. <https://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2017.06.018>.

95. ESSIFI, K.; HAMMANI, A.; BERRAAOUAN, D.; EL BACHIRI, A.; FAUCONNIER, M. L.; TAHANI, A. Montmorillonite nanoclay based formulation for controlled and selective

release of volatile essential oil compounds. **Materials Chemistry and Physics**, v. 277, p. 125569, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.125569>.

96. BERNARDOS, A.; BOZIK, M.; ALVAREZ, S.; SASKOVA, M.; PEREZ-ESTEVE, E.; KLOUCEK, P.; LHOTKA, M.; FRANKOVA, A.; MARTINEZ-MANEZ, R. The efficacy of essential oil components loaded into montmorillonite against *Aspergillus niger* and *Staphylococcus aureus*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, p. 151–162, 2019. <https://doi.org/10.1002/ffj.3488>.

97. UNIÃO EUROPEIA. Regulamento n.º 10/2011 da Comissão, de 14 de janeiro de 2011, relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. *Jornal Oficial da União Europeia*, 2011. p.89. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011R0010&from=pt>.

98. REQUENA, R.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Release kinetics of carvacrol and eugenol from poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) films for food packaging applications. **European Polymer Journal**, v. 92, p. 185–193, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.05.008>.

99. ZHANG, Y.; HUO, M.; ZHOU, J.; ZOU, A.; LI, W.; YAO, C.; XIE, S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. **AAPS Journal**, v. 12, p. 263–271, 2010. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>.

100. BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, p. 609–615, 1997. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>.

101. RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 127, p. 1–4, 2007. https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf.

102. de CARVALHO, S. M.; NORONHA, C. M.; da ROSA, C. G.; SGANZERLA, W. G.; BELLETTINI, I. C.; NUNES, M. R.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. PVA antioxidant nanocomposite films functionalized with alpha-tocopherol loaded solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces A**, v. 581, p. 123793, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123793>.

103. RUFINO, M. do S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 128, p. 1–4, 2007. https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf.

104. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

105. JIS Z 2801:200. Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Standards Association, Tokyo, Japan, 2000.
106. CHENG, H.; LIU, Q.; YANG, J.; ZHANG, Q.; FROST, R. L. Thermal behavior and decomposition of kaolinite-potassium acetate intercalation composite. **Thermochimica Acta**, v. 503–504, p. 16–20, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2010.02.014>.
107. PLATI, F.; PAPI, R.; PARASKEVOPOULOU, A. Characterization of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*) particles produced by the novel nano spray drying technique. **Foods**, v. 10, p. 2923, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10122923>.
108. KURA, A. U.; HUSSEIN-AL-ALI, S. H.; HUSSEIN, M. Z.; FAKURAZI, S. Preparation of Tween 80-Zn/Al-Levodopa-Layered Double Hydroxides Nanocomposite for Drug Delivery System. **The Scientific World Journal**, p. 1–10, 2014. <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/104246/>.
109. KABOORANI, A.; RIEDL, B.; BLANCHET, P. Ultrasonication Technique: A Method for Dispersing Nanoclay in Wood Adhesives. **Journal of Nanomaterials**, p 1–9, 2013. <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2013/341897/>.
110. ZHANG, Y.; HE, X.; OUYANG, J.; YANG, H. Palladium nanoparticles deposited on silanized halloysite nanotubes: synthesis, characterization and enhanced catalytic property. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2948, 2013. <https://doi.org/10.1038/srep02948>.
111. MEHDI, K.; BENDENIA, S.; LECOMTE-NANA, G. L.; BATONNEAU-GENER, I.; ROSSIGNOL, F.; MAROUF-KHELIFA, K.; KHELIFA, A. A new approach about the intercalation of hexadecyltrimethylammonium into halloysite: preparation, characterization, and mechanism. **Chemical Papers**, v. 73, p. 131–139, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0558-8>.
112. HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAVI, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>.
113. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. 7. ed. New York: John Wiley and Sons, 2005. p. 512.
114. FROST, R. L. Fourier Transform Raman Spectroscopy of Kaolinite, Dickite and Halloysite. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 191–195, 1995. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1995.0430206>.
115. MADEJOVÁ, J. FTIR techniques in clay mineral studies. **Vibrational Spectroscopy**, v. 31, p. 1–10, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(02\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(02)00065-6).
116. MORAR, M. I.; FETEA, F.; ROTAR, A. M.; NAGY, M.; SEMENIUC, C. A. Characterization of essential oils extracted from different aromatic plants by FTIR spectroscopy. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**

Cluj-Napoca. Food Science and Technology, v. 74, p. 37, 2017.
<http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:12634>.

117. DEDZO, G. K.; DETELLIER, C. Functional nanohybrid materials derived from kaolinite. **Applied Clay Science**, v. 130, p. 33–39, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2016.01.010>.

118. DRITS, V. A.; SAKHAROV, B. A.; HILLIER, S. Phase and structural features of tubular halloysite (7 Å). **Clay Minerals**, v. 53, p. 691–720, 2018.
<https://doi.org/10.1180/clm.2018.57>.

119. TAN, D.; YUAN, P.; ANNABI-BERGAYA, F.; LIU, D.; HE, H. Methoxy-modified kaolinite as a novel carrier for high-capacity loading and controlled-release of the herbicide amitrole. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8870, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep08870>.

120. APARICIO, P.; GALÁN, E. Mineralogical Interference on Kaolinite Crystallinity Index Measurements. **Clays and Clay Minerals**, v. 47, p. 12–27, 1999.
<https://doi.org/10.1346/CCMN.1999.0470102>.

121. ChemSpider Search and share chemistry. GZ7170000. **Royal Society of Chemistry**. Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.17564.html>. Acesso em: 5 mar. 2022.

122. ChemSpider Search and share. Estragole. **Royal Society of Chemistry**. Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13850247.html?rid=0dcedfc2-2c57-49eb-8841-5918652da60c>. Acesso: 5 mar. 2022.

123. REQUENA, R.; JIMÉNEZ, A.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Poly[(3-hydroxybutyrate)-*co*-(3-hydroxyvalerate)] active bilayer films obtained by compression moulding and applying essential oils at the interface. **Polymer International**, v. 65, p. 883–891, 2016. <https://doi.org/10.1002/pi.5091>.

124. GONZÁLEZ-AUSEJO, J.; SÁNCHEZ-SAFONT, E.; GÁMEZ-PÉREZ, J.; CABEDO, L. On the use of tris(nonylphenyl) phosphite as a chain extender in melt-blended poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate)/clay nanocomposites: Morphology, thermal stability, and mechanical properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, p. 423960, 2016. <https://doi.org/10.1002/app.42390>.

125. CRÉTOIS, R.; FOLLAIN, N.; DARGENT, E.; SOULESTIN, J.; BOURBIGOT, S.; MARAIS, S.; LEBRUN, L. Microstructure and barrier properties of PHBV/organoclays bionanocomposites. **Journal of Membrane Science**, v. 467, p. 56–66, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2014.05.015>.

126. DUANGPHET, S.; SZEGDA, D.; SONG, J.; TARVERDI, K. The Effect of Chain Extender on Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate): Thermal Degradation, Crystallization, and Rheological Behaviours. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 22, p. 1–8, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0568-5>.

127. KHAJAVI, M. Z.; EBRAHIMI, A.; YOUSEFI, M.; AHMADI, S.; FARHOODI, M.;

- ALIZADEH, A. M.; TASLIKH, M. Strategies for Producing Improved Oxygen Barrier Materials Appropriate for the Food Packaging Sector. **Food Engineering Reviews**, v. 12, p. 346–363, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09235-y>.
128. SOTHORNVIT, R.; PITAK, N. Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. **Food Research International**, v. 40, p. 365–370, 2007 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.010>.
129. SOUZA, V. G. L.; PIRES, J. R. A.; VIEIRA, É. T.; COELHO, I. M.; DUARTE, M. P.; FERNANDO, A. L. Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: From in vitro assays to application in fresh poultry meat. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 241–252, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.049>.
130. FRISCH, H. L.; STERN, S. A. Diffusion of small molecules in polymers. **Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, v. 11, p. 123–187, 1983. <https://doi.org/10.1080/01611598308244062>.
131. SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 163–174, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.028>.
132. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
133. RAMOS, M.; BELTRÁN, A.; PELTZER, M.; VALENTE, A. J. M.; GARRIGÓS, M. DEL 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.019>.
134. MURIEL-GALET, V.; CRAN, M. J.; BIGGER, S. W.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 9–16, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.007>.
135. KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633–640, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024>.
136. LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; M.; PICHARDO, S.; BERMÚDEZ, J. M.; BAÑOS, A.; NÚÑEZ, C.; GUILLAMÓN, E.; AUCEJO, S.; CAMEÁN, A. M. Development of PLA films containing oregano essential oil (*Origanum vulgare* L. *virens*) intended for use in food packaging. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, p. 1–13, 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2016.1204666>.
137. FIGUEROA-LOPEZ, K. J.; VICENTE, A. A.; REIS, M. A. M.; TORRES-GINER, S.; LAGARON, J. M. Antimicrobial and Antioxidant Performance of Various Essential Oils and Natural Extracts and Their Incorporation into Biowaste Derived Poly(3-hydroxybutyrate-co-

3-hydroxyvalerate) Layers Made from Electrospun Ultrathin Fibers. **Nanomaterials**, v. 9, p. 144, 2019. <https://doi.org/10.3390/nano9020144>.

APÊNDICE A – COMPOSIÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O OEO e OEM foi analisado por cromatografia gasosa acoplado ao detector por espectrometria de Massa (CG/MS) afim de se determinar a composição dos óleos essencial. Nas Tabelas 11 e 12 estão as composições presentes nos óleos essenciais.

Tabela 11: Composição do óleo essencial de orégano.

Componentes	Composição (%)	CAS
(+) – α - Pineno	1,12	007785-70-8
β - Terpineno	0,52	000099-84-3
1-(4-metilfenil) etanol	0,77	000536-50-5
<i>m</i> - Cimeno	14,82	000535-77-3
γ -Terpineno	6,84	000099-85-4
Timol	3,47	000089-83-8
3-Metil-4-isopropilfenol	71,68	003228-02-2
Cariofileno	0,78	000087-44-5

Tabela 12: Composição do óleo essencial de manjeriço.

Componentes	Composição (%)	CAS
Eucaliptol	0,51	000470-82-6
1,3,6-Heptatrieno, 5-metil-, (E)-	0,09	000818-48-4
Estragol	99,31	000140-67-0
α - Bergamoteno	0,09	017699-05-7

APÊNDICE B – CURVAS TGA/DTG DA CAULINITA E HALOISITA APÓS A MODIFICAÇÃO COM ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E MANJERICÃO

Figura 33: Curvas TGA/DTG da Hal/OEO_U.

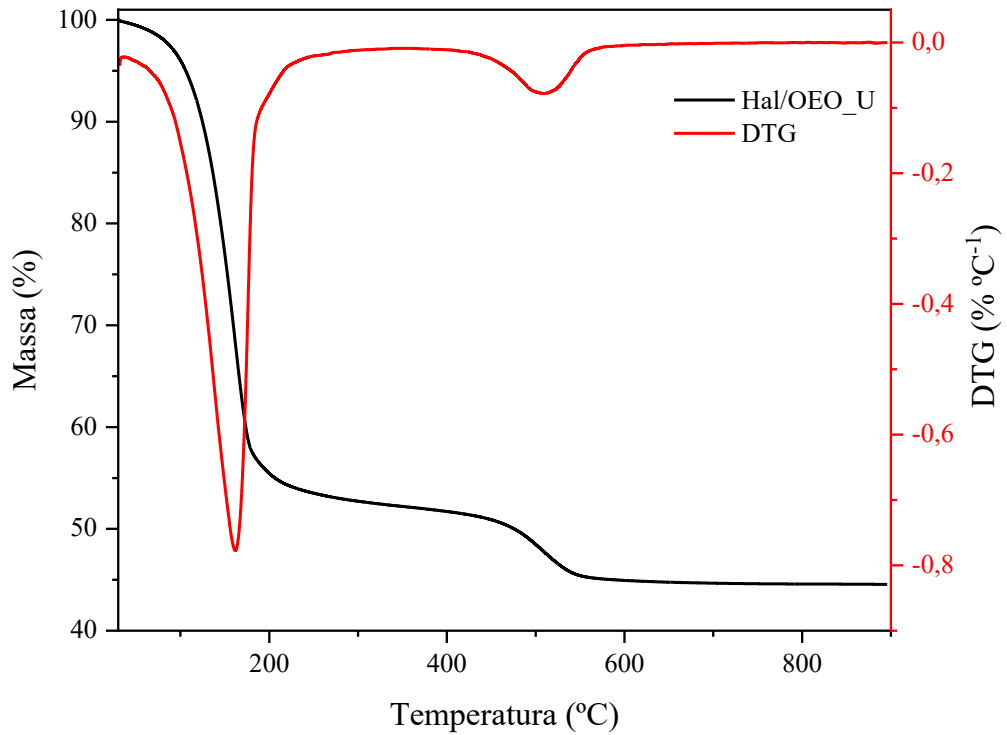


Figura 34: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEO_U.

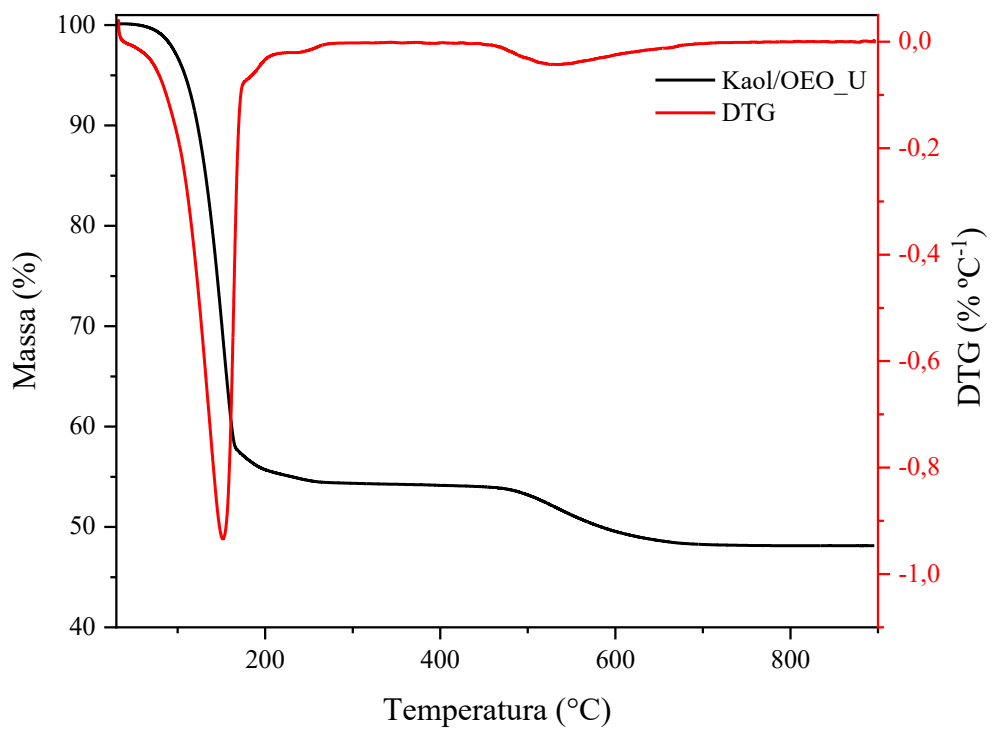


Figura 35: Curvas TGA/DTG da Hal/OEM_U.

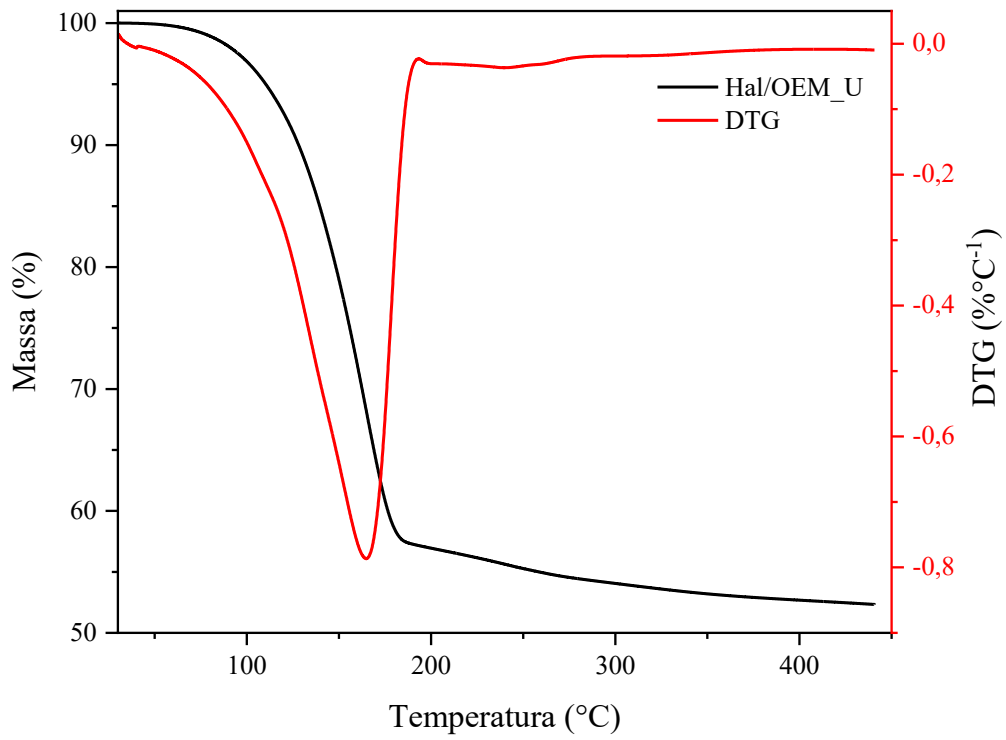


Figura 36: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEM_U.

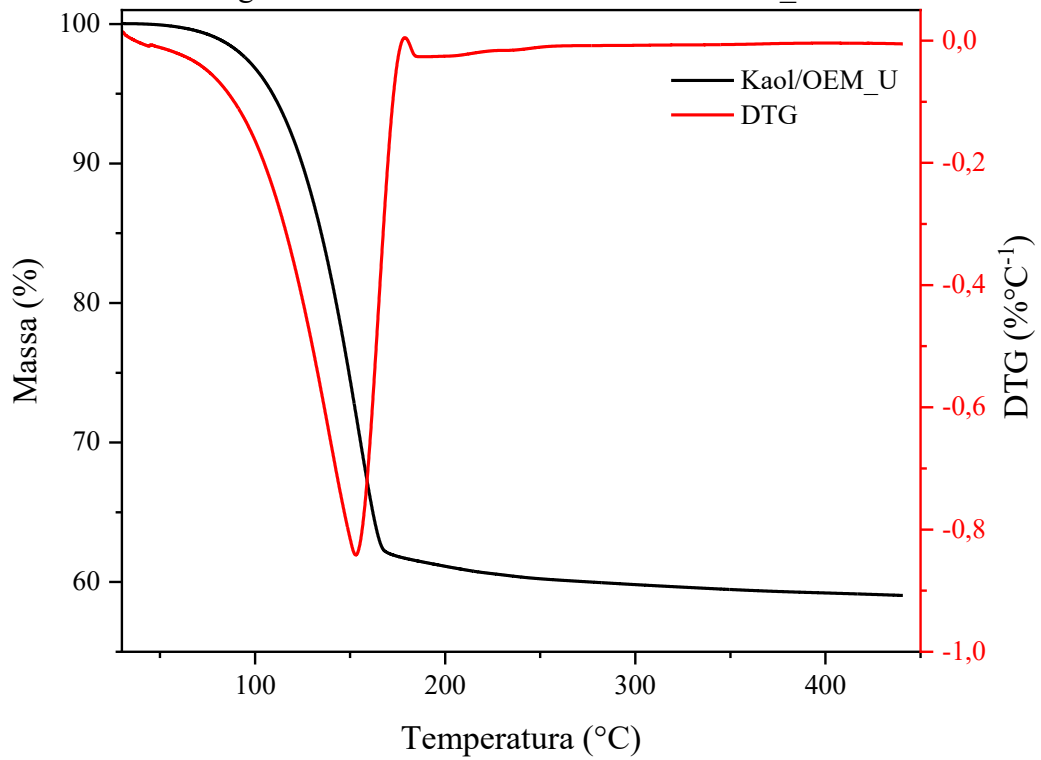


Figura 37: Curvas TGA/DTG da Hal/OEO/T80_U.

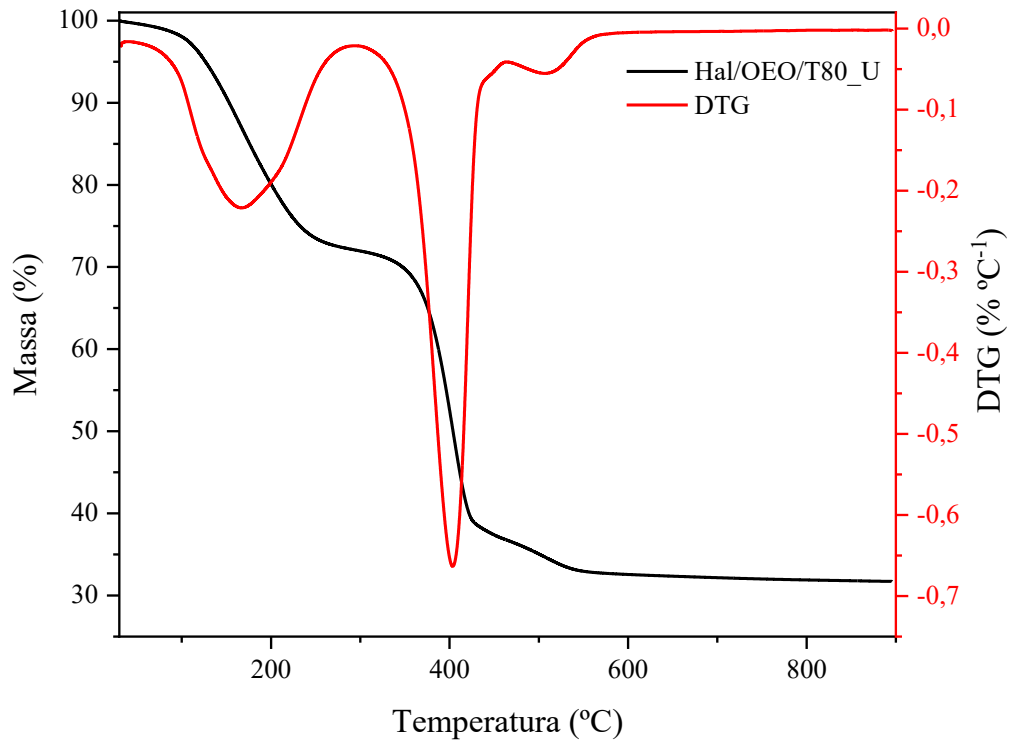


Figura 38: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEO/T80_U.

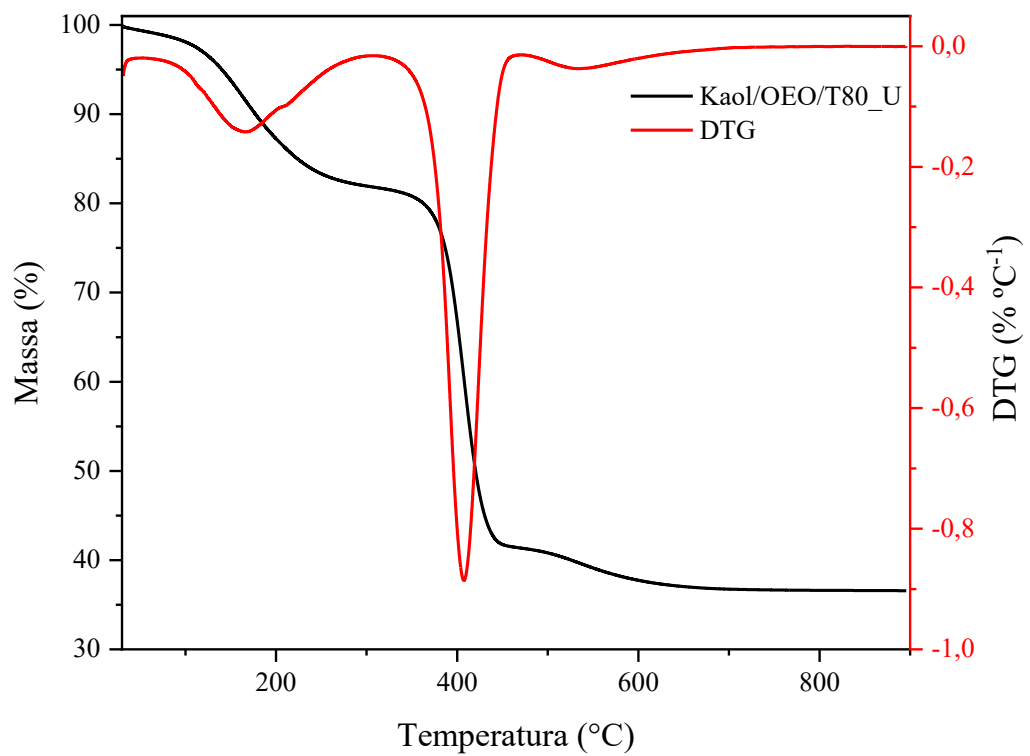


Figura 39: Curvas TGA/DTG da Hal/OEO/0.5T80_U.

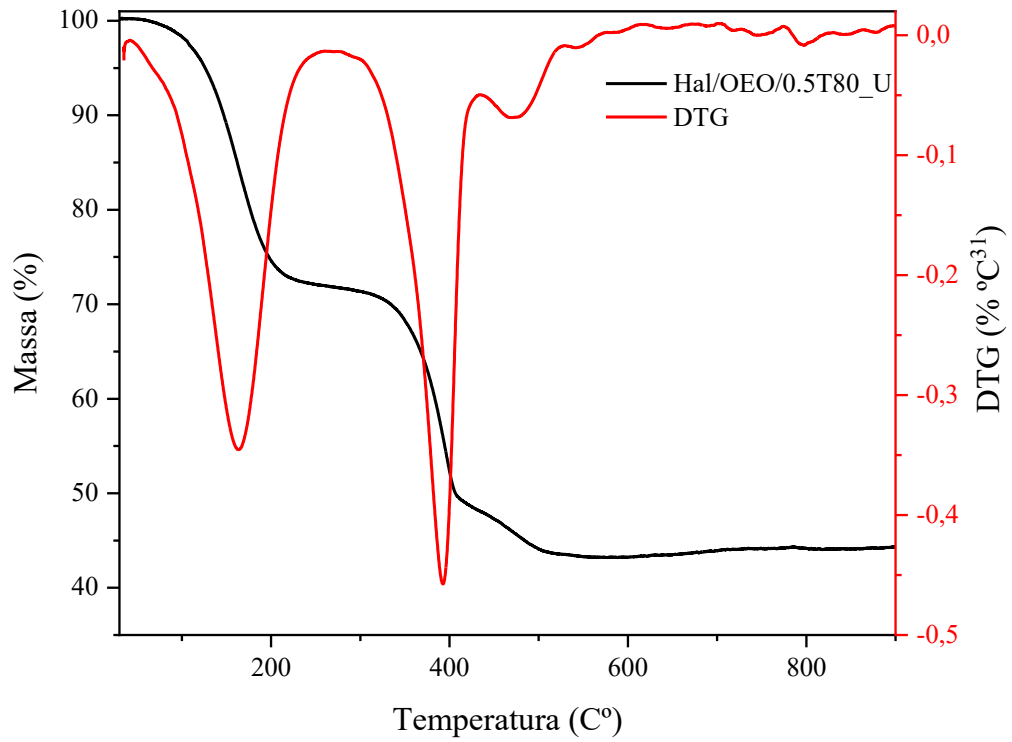


Figura 40: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEO/0.5T80_U.

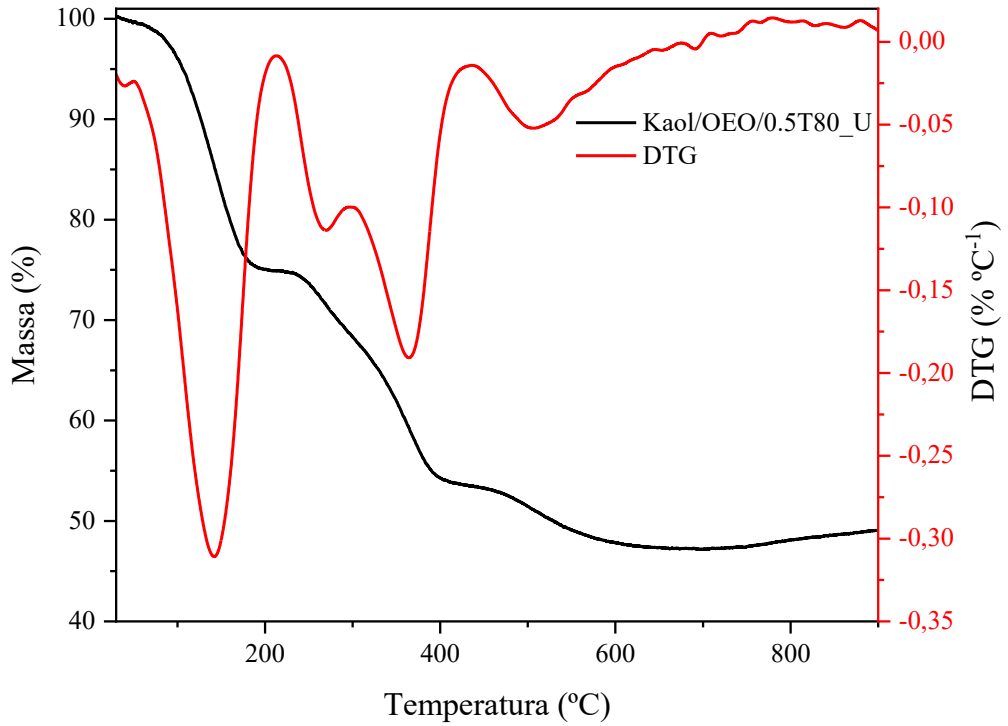


Figura 41: Curvas TGA/DTG da Hal/2OEO_U

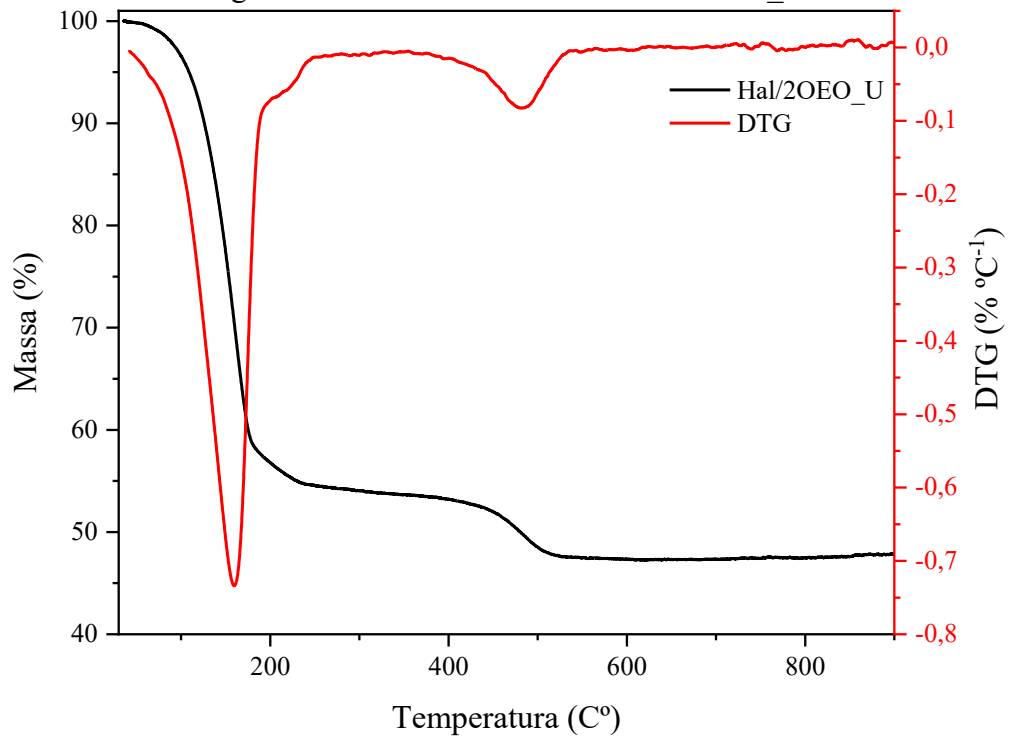


Figura 42: Curvas TGA/DTG da Kaol/2OEO_U.

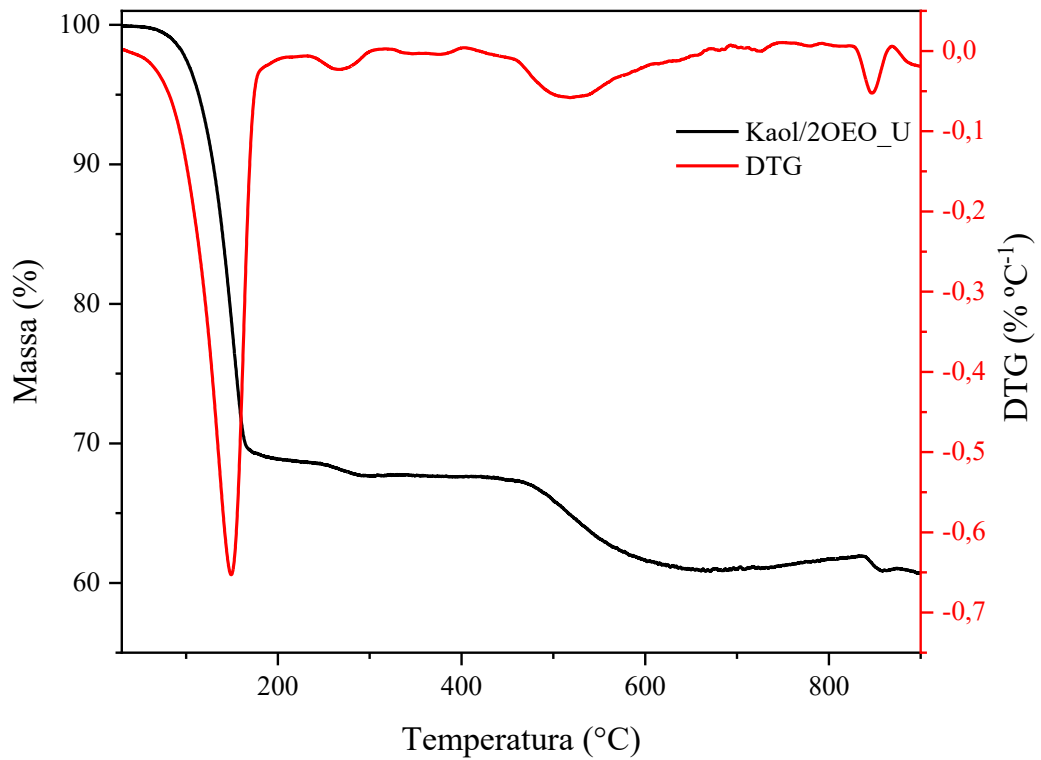


Figura 43: Curvas TGA/DTG da Hal/OEO_UΔ.

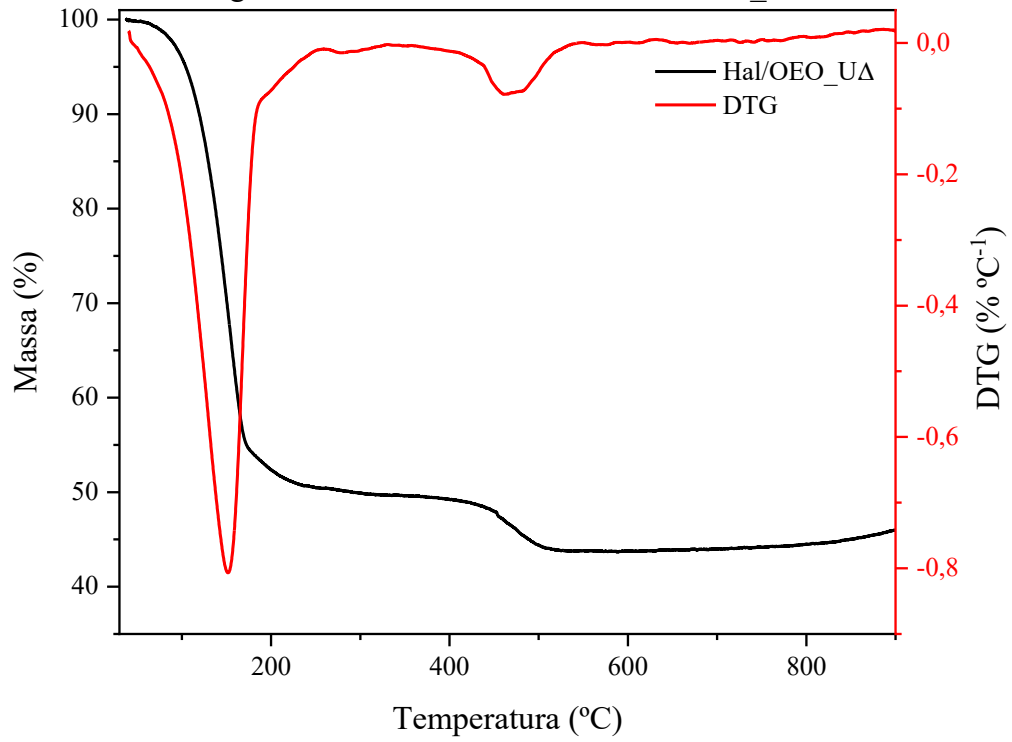


Figura 44: Curvas TGA/DTG da Kaol/OEO_UΔ.

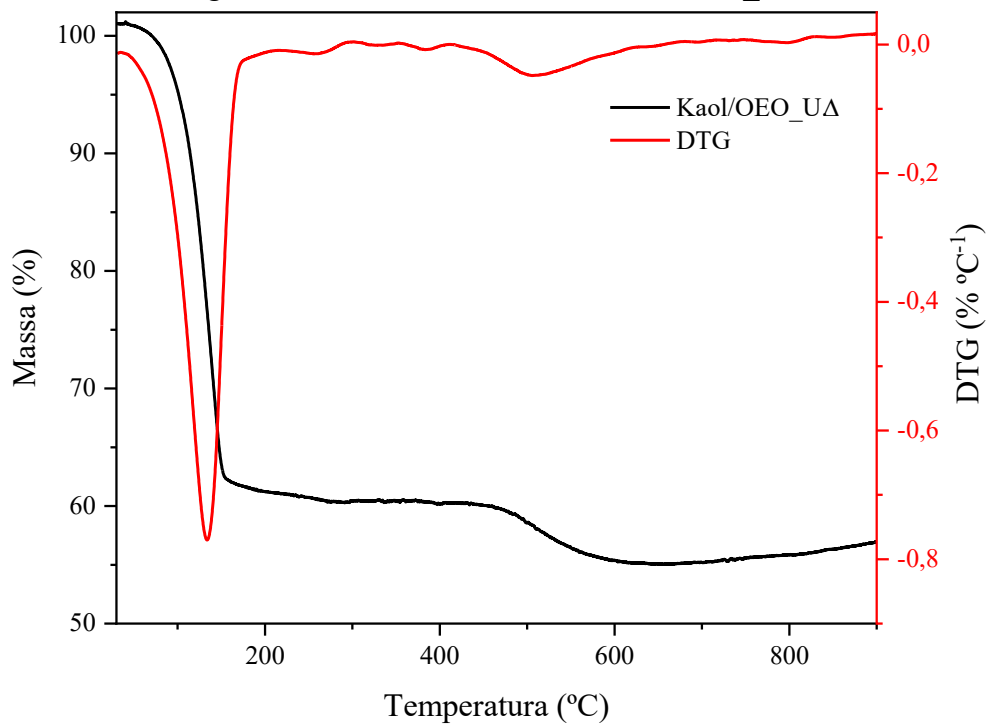


Figura 45: Curvas TGA/DTG da Hal/0.4OEO_U.

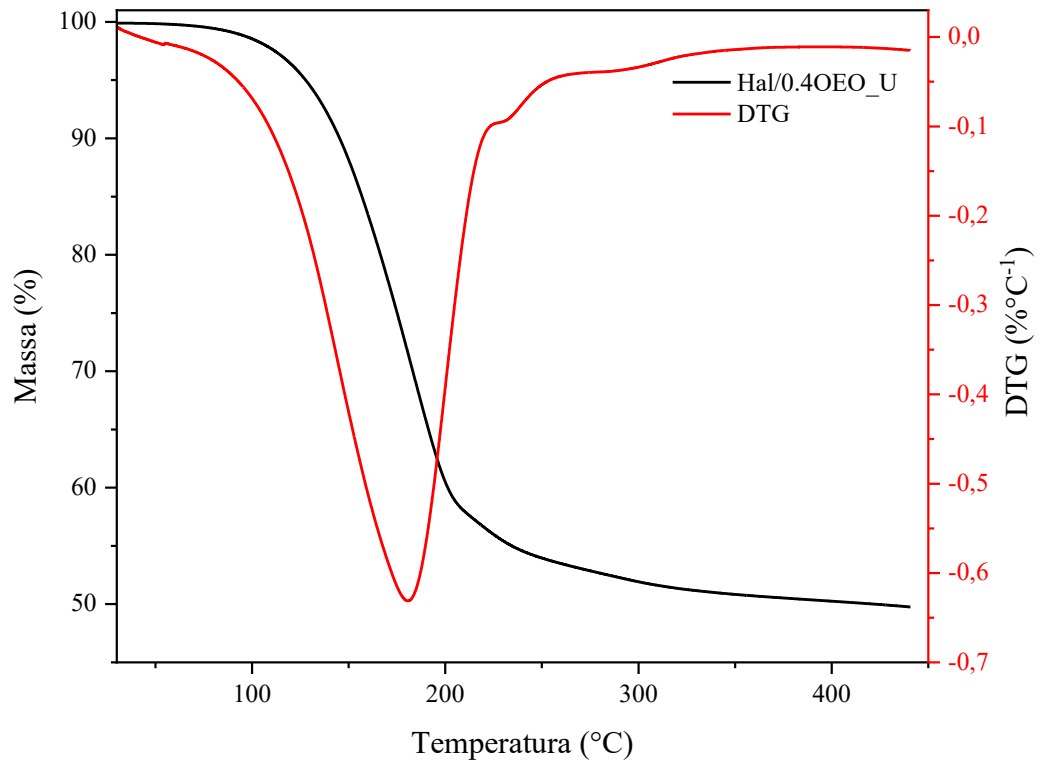


Figura 46: Curvas TGA/DTG da Kaol/0.4OEO_U.

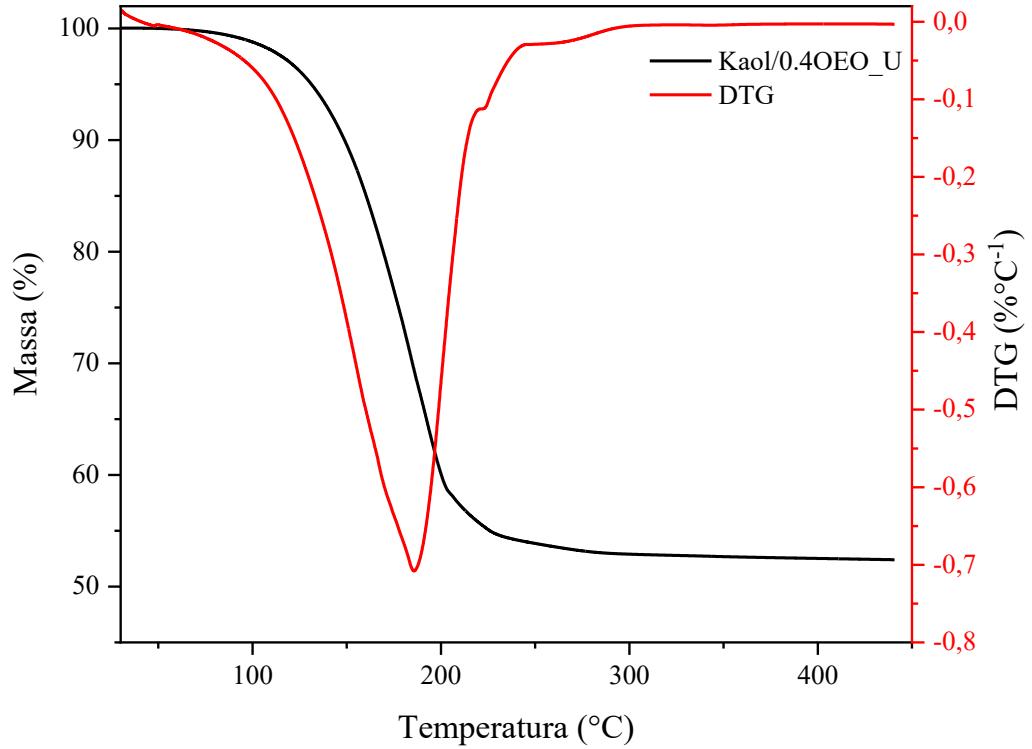


Figura 47: Curvas TGA/DTG da Hal/0.4OEM_U.

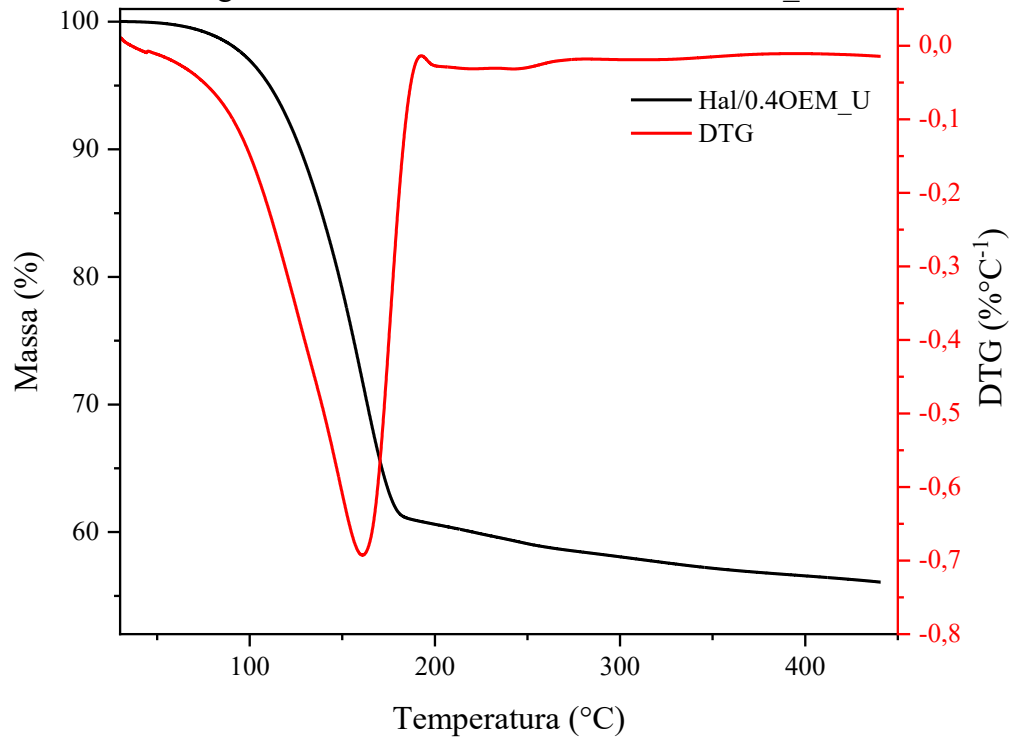
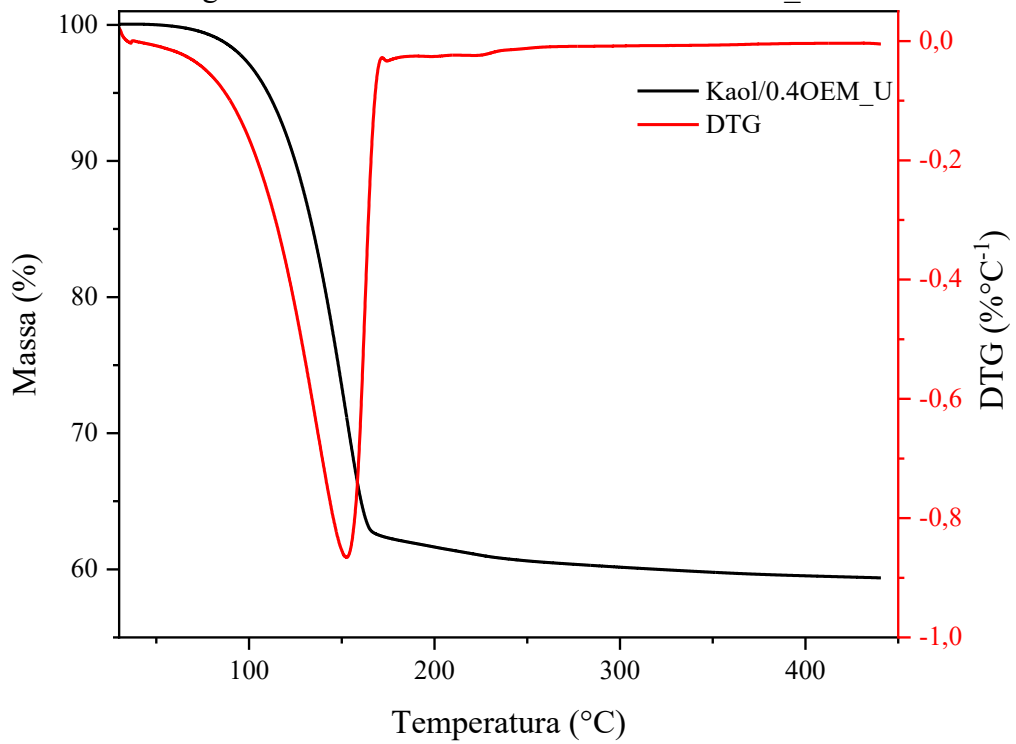


Figura 48: Curvas TGA/DTG da Kaol/0.4OEM_U.



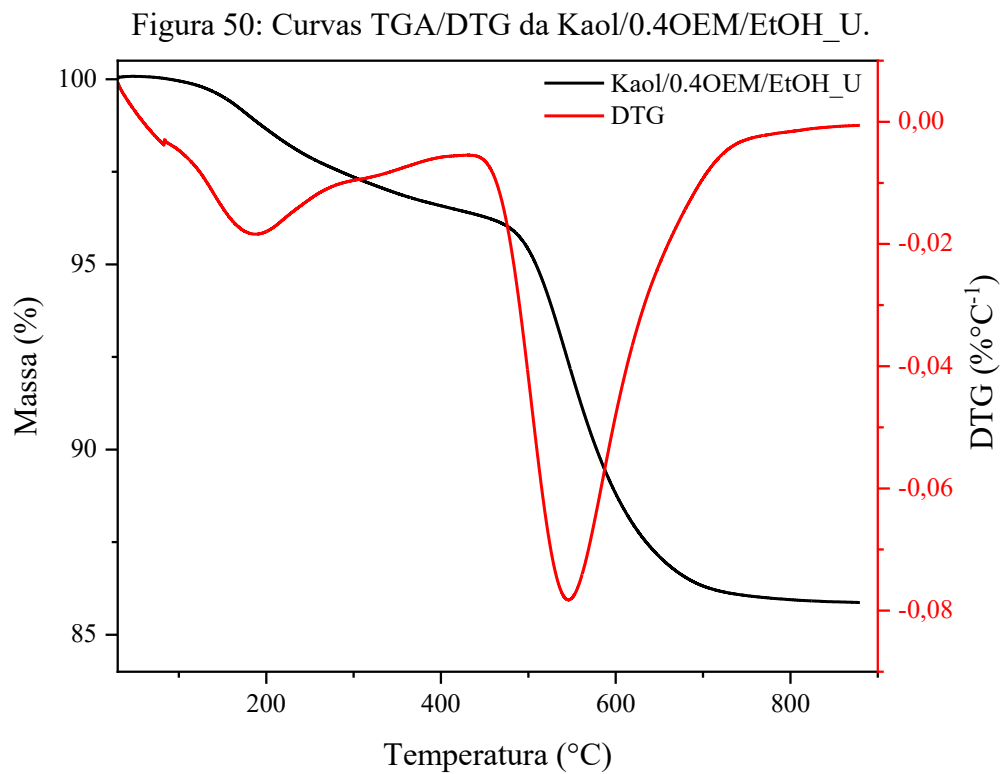
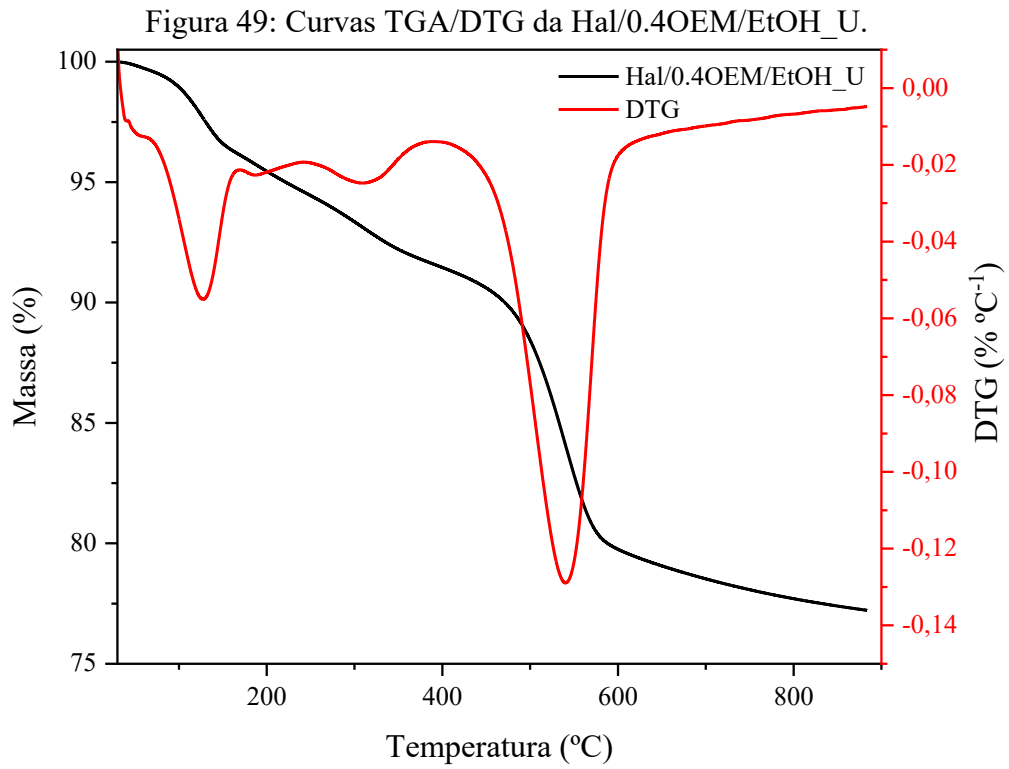


Figura 51: Curvas TGA/DTG da Hal/0.4OEM_EA.

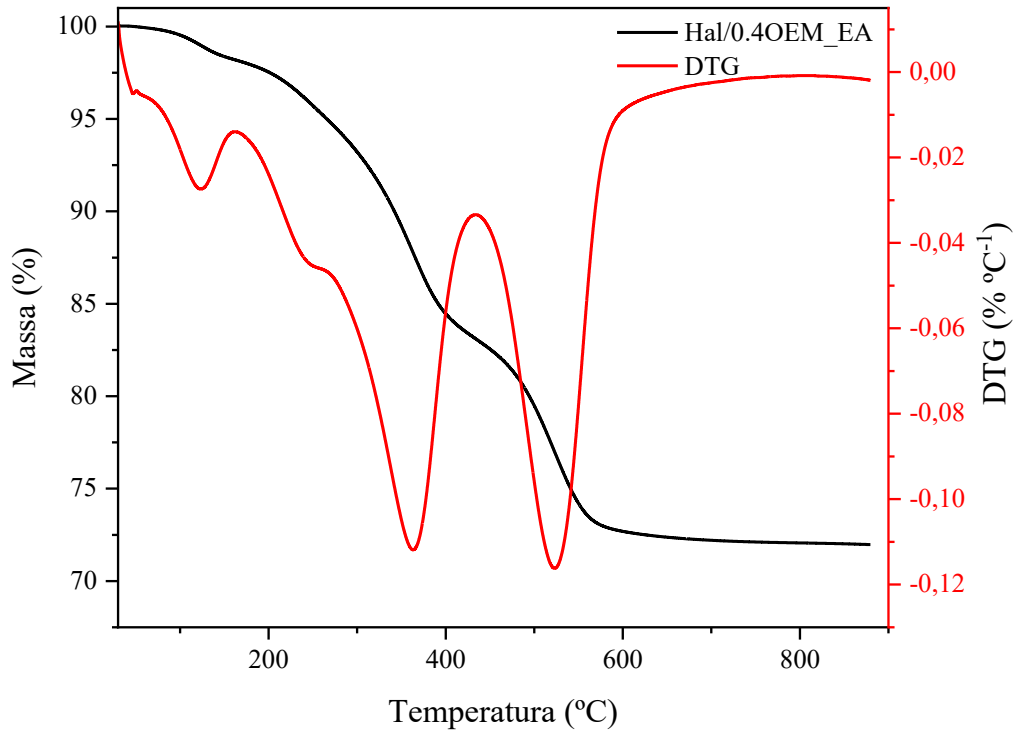


Figura 52: Curvas TGA/DTG da Kaol/0.4OEM_EA.

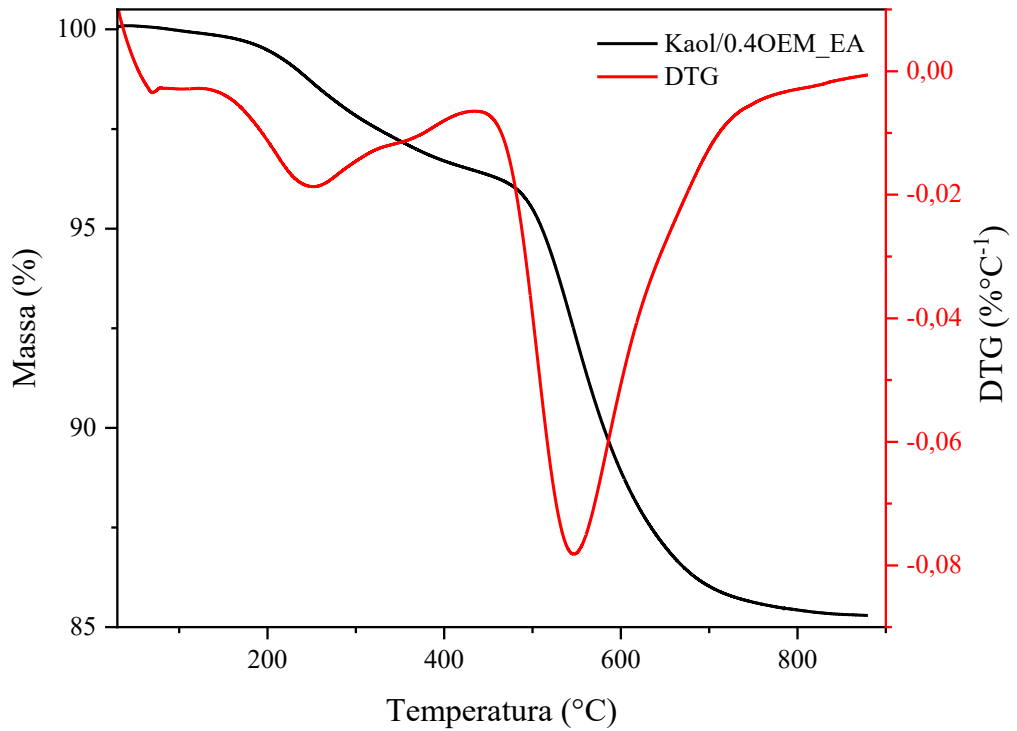


Figura 53: Curvas TGA/DTG da Hal/0.4OEM_UT.

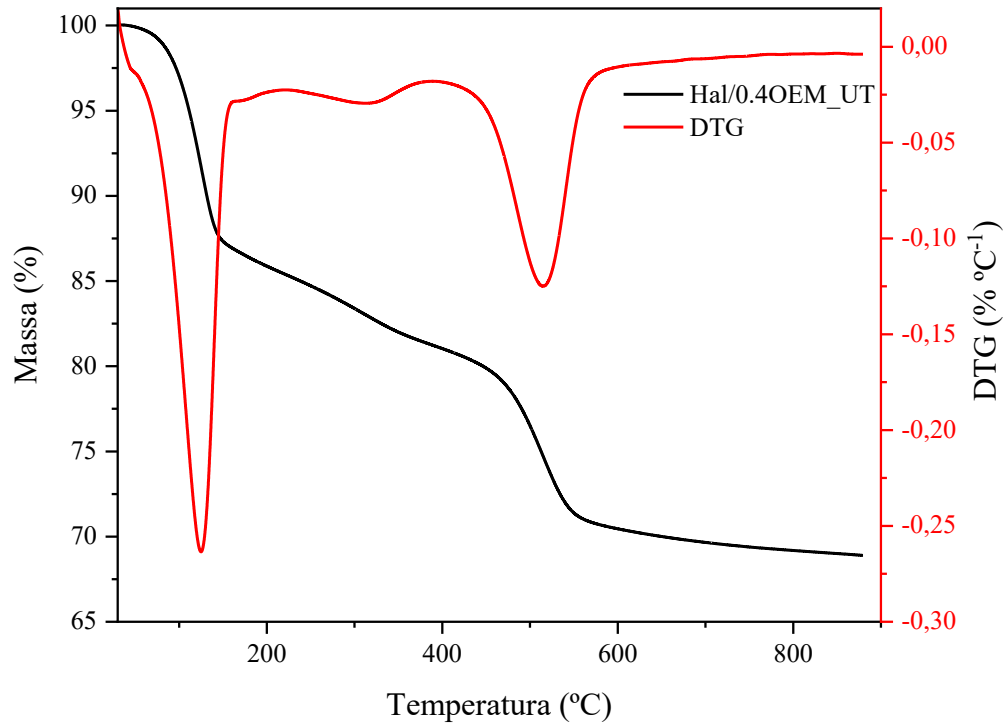


Figura 54: Curvas TGA/DTG da Kaol/0.4OEM_UT.

