

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ISABELA DOS SANTOS PAGLIONE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS DE
ISOLADO PROTEICO DE SOJA CONTENDO MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO
ESSENCIAL DE ORÉGANO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA
2018

ISABELA DOS SANTOS PAGLIONE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS DE
ISOLADO PROTEICO DE SOJA CONTENDO MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO
ESSENCIAL DE ORÉGANO**

Dissertação de mestrado, apresentado ao Curso de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai

LONDRINA
2018

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

P138p Paglione, Isabela dos Santos
Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de isolado proteico de soja contendo micropartículas de óleo essencial de orégano / Isabela dos Santos Paglione. - Londrina : [s.n.], 2018.
60 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marianne Ayumi Shirai
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2018.
Bibliografia: f. 49-58.

1. Biopolímeros. 2. Compostos bioativos. 3. Proteínas de soja. 4. Óleos vegetais.
I. Shirai, Marianne Ayumi, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
III. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911

FOLHA DE APROVAÇÃO
Título da Dissertação n. 63

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES
BIODEGRADÁVEIS DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA
CONTENDO MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE
ORÉGANO**

por

ISABELA DOS SANTOS PAGLIONE

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina às 14 h do dia vinte e cinco de abril de 2018. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná
Orientador

Prof. Dr. Fabio Yamashita
Universidade Estadual de Londrina
Membro Examinador Titular

Profa. Dra. Caroline Maria Calliari
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná
Membro Examinador Titular

Visto da coordenação:

Profa. Dra. Lúcia Felicidade Dias, Dra.
(Coordenadora do PPGTAL)

A folha de aprovação assinada encontra-se arquivada na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que nos conduz nos caminhos da vida e me levou até esse mestrado.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai, pela sabedoria e tempo investidos me guiando nesta trajetória.

Aos professores Dra. Lyssa Setsuko Sakanaka, Dra. Margarida Masami Yamaguchi, Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso e Dr. Fábio Yamashita pelos aconselhamentos durante a pesquisa.

Aos professores do Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos (PPGTAL) pelo empréstimo de seu tempo e equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Paraná (UEL) por me auxiliar nas pesquisas emprestando equipamentos.

Aos técnicos de laboratório Roberta, Thyara, Marcos, Ana por todo suporte durante a pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório por toda ajuda e companheirismo durante esse tempo, especialmente à Marcella e ao João por toda ajuda durante pesquisa.

Ao CNPq pelo investimento nessa pesquisa.

À Secretaria do Curso, pela cooperação.

Gostaria de deixar registrado também o meu reconhecimento à minha família, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

PAGLIONE, I. S. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA CONTENDO MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO.** p. 60. DISSERTAÇÃO (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2018.

As embalagens sintéticas são amplamente utilizadas no Brasil e no mundo, mas possuem a desvantagem de demandarem um alto tempo de degradação e quando não reutilizadas geram um enorme problema de acúmulo de lixo no meio ambiente. Uma alternativa seria a utilização de embalagens biodegradáveis produzidas a partir de biopolímeros de fonte renovável, como o isolado proteico de soja (IPS). Os filmes de IPS permitem a incorporação de compostos bioativos como o óleo essencial de orégano (OEO). Entretanto, o OEO é facilmente degradado durante o processamento e uma alternativa para preservar a bioatividade desse composto seria realizar a microencapsulação. Este estudo foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu em avaliar o efeito do pH e da concentração de IPS sobre as propriedades dos filmes de IPS utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR). Observou-se que em pHs elevados, aumentava-se a resistência à tração (RT) e a elongação na ruptura (ELO) dos filmes. Fato contrário foi observado em relação a solubilidade (SOL) e o parâmetro de cor L^* , sendo os menores valores dessas variáveis obtidos em pH alcalino, distante do ponto isoelétrico, no qual ocorreu desnaturação das proteínas da soja, possibilitando interação entre as cadeias e a formação de uma estrutura compacta. Considerando a função desejabilidade, para obter um filme com alta RT e ELO e baixa SOL foi necessário utilizar 7,56 g de IPS/ 100 g de solução filmogênica e ajustar a solução filmogênica para pH 10,54. A segunda etapa teve como objetivo produzir filmes de IPS com OEO livre e microencapsulado pela técnica de gelificação iônica e avaliar as propriedades mecânicas, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água (PVA), cor, morfologia e atividade antimicrobiana durante 90 dias de armazenamento. O OEO foi microencapsulado com sucesso pela técnica de gelificação iônica apresentando formato esférico, diâmetro médio de 250 μm e eficiência de encapsulação de 79,6 %. A presença de OEO livre diminuiu a RT e o módulo de Young (MY) e aumentou a SOL e esses resultados podem estar relacionados com a redução da interação polímero-polímero, formando uma estrutura menos coesa e fraca. A adição de OEO livre conferiu ao filme ação antimicrobiana frente a *S. aureus* e *E. coli*, e esta ação diminuiu após 90 dias de armazenamento. A presença de óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM) aumentou a RT e MY, diminuiu a ELO e a PVA dos filmes. Acredita-se que houve uma boa interação entre a matriz do filme e as micropartículas de OEO, resultando no reforço da matriz polimérica. A microencapsulação do óleo protegeu os compostos bioativos presentes no OEO durante a produção e secagem dos filmes, possibilitando obter materiais com propriedades antimicrobianas.

Palavras-chave: Polímero biodegradável. Gelificação iônica. Atividade antimicrobiana. Composto bioativo.

ABSTRACT

PAGLIONE, I. S. **PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF SOY PROTEIN ISOLATE BIODEGRADABLE FILMS CONTAINING OREGANO ESSENTIAL OIL MICROPARTICLES**. 60f. Dissertation (Master in Food Technology) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2018.

Synthetic packaging is widely used in Brazil and worldwide, but it has the disadvantage of requiring a high degradation time and when not reused, it generates a problem of waste accumulation. An alternative would be the use of biodegradable packaging produced with biopolymers from renewable source such as soy protein isolate (SPI). SPI films allow the incorporation of bioactive compounds such as oregano essential oil (OEO). However, OEO is easily degraded during processing, and an alternative to preserve the bioactivity of this compound would be the microencapsulation. This study was divided in two stages. The first consisted of evaluating the effect of pH and concentration of SPI on the properties of SPI films using a central rotational compound design (DCCR). It was observed that at high pHs, tensile strength (RT) and elongation at break (ELO) of films were increased. Solubility (SOL) and color parameter L^* were observed, with the lowest values of these variables being obtained at alkaline pH, far from the isoelectric point, in which denaturation of the soybean proteins occurred, allowing interaction between the chains and the formation of a compact structure. Considering the desirability function, to obtain a film with high RT and ELO and low SOL it is necessary to use 7.56% of SPI and to adjust the filmogenic solution to pH 10.54. The second step of this study consisted in microencapsulate the OEO by the ionic gelation technique and apply it in the formulation of SPI films. OEO was successfully microencapsulated by ionic gelation technique and presented spherical shape, mean diameter of 250 μm and encapsulation efficiency of 79.6%. The presence of free OEO decreased the RT and Young's modulus (MY), and increased SOL and these results may be related to the reduction of the polymer-polymer interaction, forming a less cohesive and weak structure. The addition of free OEO provided antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli*, and this action decreased after 90 days of storage. The presence of microencapsulated oregano essential oil (OEOM) increased the RT and MY, decreased ELO and PVA of the films. It is believed that there was a good interaction between the film matrix and the OEO microparticles, resulting in the reinforcement of the polymer matrix. The microencapsulation of the oil protected the bioactive compounds present in the OEO during the production and drying of the films, allowing to obtain materials with antimicrobial properties.

Key-word: Biodegradable polymer. Ionic gelation. Antimicrobial activity. Bioactive compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Superfície de contorno sobre a influência do pH e da concentração de isolado proteica de soja (IPS) na resistência à tração (RT) e na alongação (ELO) dos filmes.....	32
Figura 2 – Superfície de contorno sobre a influência do pH e da concentração de isolado proteica de soja (IPS) na solubilidade (SOL) e Luminosidade (L*) dos filmes.....	35
Figura 3 - Microscopia ótica das micropartículas de óleo essencial de orégano..	38
Figura 4 - Aparência dos com filmes controle (C), filme contendo Óleo de Orégano (OEO) e filme contendo óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM).....	39
Figura 5 - Microscópio eletrônico de varredura dos com filmes controle (C), filme contendo Óleo de Orégano (OEO) e filme contendo óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento composto central rotacional e respostas das propriedades mecânicas, solubilidade, PVA e cor dos filmes.....	31
Tabela 2 - Coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) das variáveis RT, ELO, MY SOL, PVA, L*, a* e b* dos filmes	32
Tabela 3 – Comparação entre os valores reais e valores preditos para resistência a tração, alongação na ruptura e solubilidade em água.....	37
Tabela 4 - Parâmetros de cor dos filmes de IPS contendo óleo essencial de orégano livre e microencapsulado.....	40
Tabela 5 - Propriedades mecânicas de filmes de IPS contendo óleo essencial de orégano livre e microencapsulado.....	42
Tabela 6 - Solubilidade em água e PVA dos filmes de IPS contendo óleo essencial de orégano livre e microencapsulado.....	44
Tabela 7. Atividade antimicrobiana de filmes de IPS adicionados de OEO e OEOM nos tempos 0, 45 e 90 dias.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

DCCR	Delineamento composto central rotacional
ELO	Elongação máxima a ruptura
EM	Espessura media
GLI	Glicerol
IPS	Isolado proteico de soja
MY	Módulo de elasticidade ou de Young
OE	Óleo essencial
OEO	Óleo essencial de orégano
OEOM	Óleo essencial de orégano microencapsulado
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
RT	Resistência máxima à tração
SEO	Óleo essencial de <i>Satureja hortensis</i>
SPI	Soy protein isolate
SOL	Solubilidade
U	Umidade

LISTA DE SIGLAS

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

LISTA DE ACRÔNIMOS

ASTM	American Society for Testing and Material
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 REFERENCIALTEÓRICO	14
3.1 ISOLADO PROTEICO DE SOJA.....	14
3.2 FILMES DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA.....	15
3.2.1 Plastificante.....	16
3.2.2 Processamento.....	16
3.3 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO.....	18
3.4 MICROENCAPSULAÇÃO POR GELIFICAÇÃO IÔNICA.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 MATERIAL.....	21
4.2 MÉTODOS.....	21
4.2.1 ELABORAÇÃO DOS FILMES DE IPS.....	21
4.2.2 CARACTERIZAÇÕES DOS FILMES.....	22
4.2.2.1 Propriedades mecânicas.....	22
4.2.2.2 Medida de cor.....	22
4.2.2.3 Permeabilidade ao vapor de água.....	23
4.2.2.4 Solubilidade a água.....	23
4.2.3 Análise estatística.....	24
4.2.3 MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO POR GELIFICAÇÃO IÔNICA.....	25
4.2.3.1 Caracterização das micropartículas de óleo essencial de orégano... ..	25
4.2.3.2 Morfologia da partícula.....	25
4.2.3.3 Eficiência de encapsulação.....	26
4.2.3.4 Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho.....	26
4.2.4 PRODUÇÃO DOS FILMES CONTENDO ÓLEO DE ORÉGANO LIVRE E MICROENCAPSULADO.....	27
4.2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO LIVRE E MICROENCAPSULADO.....	28
4.2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
4.2.5.2 Atividade antimicrobiana.....	28
4.2.5.3 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 FILMES DE IPS COM DIFERENTES PHS E CONCENTRAÇÃO DE IPS.....	30
5.1.1 Propriedades mecânicas.....	30
5.1.2 Solubilidade e permeabilidade ao vapor de água.....	34
5.1.3 Medida de cor.....	35
5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO FILME DE IPS PELA FUNÇÃO DESEJABILIDADE.....	36
5.3 MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE OEO.....	37
5.4 FILMES DE IPS CONTENDO OLEO ESSENCIAL DE OREGANO LIVRE E MICROCAPSULAS DE OLEO ESSENCIAL DE OREGANO.....	39
5.4.1 Espessura e medida de cor.....	39

5.4.2 Microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	40
5.4.3 Propriedades mecânicas.....	42
5.4.4 Umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água.....	43
5.4.5 Atividade antimicrobiana.....	45
6 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE A.....	59
APÊNDICE B.....	60

1 INTRODUÇÃO

O lixo doméstico é composto por cerca de 34% de embalagens plásticas. Esses recipientes são utilizados apenas uma vez e logo em seguida descartados, somando aproximadamente 80% do total das embalagens utilizadas. Existe uma opção para esses plásticos usados serem reaproveitados, através de reciclagem, porém nem sempre é o que acontece fazendo com que os aterros e lixões, já esgotados, ocupem novas áreas para depositar os resíduos gerados. O tempo de decomposição do plástico na natureza é de mais de 400 anos, o que não contribui para o esvaziamento dos aterros sanitários. Sendo assim, faz-se necessária a discussão sobre os materiais utilizados na confecção das embalagens e seu impacto no meio ambiente (MMA, 2016).

As embalagens fabricadas utilizando matérias-primas de fontes renováveis são uma alternativa para o ramo de embalagens alimentícias. As proteínas, lipídios, polissacarídeos ou a combinação destes são compostos que podem ser utilizados como matéria-prima na produção de filmes e coberturas comestíveis (CARPINÉ, 2015). A degradação dos polímeros biodegradáveis, de origem sintética ou biológica, ocorre primeiramente pela ação de microrganismos, como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. Através dessa reação é gerado gás carbônico (CO₂), metano, componentes celulares e outros produtos, segundo estabelecido pela *American Standard for Testing and Methods* (ASTM, 2012).

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo com uma produção de 96,5 milhões de toneladas nos anos de 2015/2016 (USDA, 2016), sendo o estado do Paraná o segundo maior produtor de soja do Brasil (CONAB, 2013). Desta forma, o isolado proteico de soja (IPS), é uma matéria-prima interessante e viável para ser utilizada na produção de filmes biodegradáveis.

Estudos da produção e caracterização de filmes à base de IPS foram realizados por diversos autores (CARPINÉ, et al. 2015; CARPINÉ, et al. 2016; JIANG, CHEN e XIONG, 2009; ROCHA, et al., 2014). Estes filmes apresentam-se de modo geral transparentes, flexíveis, com excelente barreira ao oxigênio e servem como matriz para incorporação de compostos bioativos, porém são sensíveis a umidade e por esta razão possuem baixa barreira ao vapor de água (MCHUGH;

KROCHTA, 1994; MILLER; KROCHTA, 1997; PÉREZ-GAGO, NADAUD; KROCHTA, 1999).

Os óleos essenciais, como o de orégano, são compostos bioativos extraídos de plantas que possuem composição química complexa e diversos compostos fenólicos. Eles se destacam por apresentarem amplo espectro de atividade biológica e antimicrobiana (antibacteriano, antifúngico, antiviral, controle de pragas, repelentes de insetos) e propriedades antioxidantes (ASBAHANI et al., 2015; VIUDA-MARTOS et al., 2010; RUIZ-NAVAJAS et al., 2013) além de muitos desses compostos serem classificados como GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Por apresentarem sabor e aroma intensos, o seu uso como conservante ou aromatizante em alimentos é limitado. Assim, o óleo essencial de orégano é um ingrediente interessante para ser incorporado na formulação de embalagens biodegradáveis para alimentos, gerando materiais ativos que estendem a vida útil e agregam valor ao produto.

No entanto, a inclusão de óleos essenciais em filmes comestíveis biodegradáveis para embalagens de alimentos pode alternar em algumas propriedades funcionais do filme, afetando, por sua vez, a aplicabilidade (ATARÉS; CHIRALT, 2016). Pela estrutura química dos óleos essenciais, parte pode interagir com os constituintes do filme (polímero e plastificante) e a difusão dos compostos bioativos para o produto pode ser reduzida (RUIZ-NAVAJAS et al., 2013). Outra dificuldade na utilização de óleos essenciais é devido a sua volatilidade, pois pode ocorrer evaporação e/ou degradação durante o processamento, devido às altas temperaturas, luminosidade, pressão ou oxigênio.

Para contornar estes problemas, a tecnologia de microencapsulação se destaca, sendo uma alternativa para auxiliar na manutenção da bioatividade dos óleos essenciais (DONSÌ et al., 2011). Essa técnica permite o isolamento, a proteção, o transporte e a liberação de diversas substâncias ativas no local desejado com a taxa exigida (DEVI et al., 2017; DIMA et al., 2013).

Entre as técnicas de microencapsulação, a gelificação iônica tem atraído atenção nos últimos anos por ser um método que utiliza condições brandas de processo (sem uso de solventes orgânicos tóxicos e uso de baixas temperaturas), ser simples, rápida e de baixo custo (MESTDAGH; AXELOS, 1999). Esse processo consiste no gotejamento de uma solução polimérica aniônica contendo os nutrientes isolados ou em emulsão sobre uma solução iônica formando um complexo (BEAULIEU et al., 2002).

Diante do exposto, este trabalho visou otimizar a produção de filmes biodegradáveis a base de IPS, como forma de desenvolver uma embalagem com características mecânica e de barreira adequadas e que possam ser utilizadas para a incorporação de óleos essenciais microencapsulado, contribuindo com a diminuição do impacto ambiental causado pelas embalagens convencionais e também, atuando como uma embalagem ativa para auxiliar na conservação de alimentos.

2 OBJETIVO

Produzir filmes biodegradáveis à base de isolado proteico de soja incorporados de óleo essencial de orégano livre e microencapsulado por gelificação iônica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da concentração de IPS e do pH nas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade e cor dos filmes utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR).
- Otimizar a produção do filme através da técnica de desejabilidade (otimização multi-resposta).
- Microencapsular o óleo essencial de orégano pela técnica de gelificação iônica utilizando alginato de sódio como material de parede e cloreto de cálcio como agente reticulante.
- Determinar a eficiência de encapsulação, a morfologia e a distribuição de tamanho das microcápsulas de óleo essencial de orégano.
- Adicionar óleo essencial de orégano livre e microencapsulado na formulação otimizada de filmes biodegradáveis a base de IPS e avaliar as propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, microestrutura, cor, solubilidade e atividade antimicrobiana durante o armazenamento controlado por 90 dias.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ISOLADO PROTEICO DE SOJA

A safra mundial de soja, nos anos de 2015/2016 foi estimada em 313,01 milhões de toneladas. O maior produtor mundial desse grão é os Estados Unidos com uma produção de 106,86 milhões de toneladas, seguido pelo Brasil com uma produção de 96,5 milhões de toneladas nos anos de 2015/2016 (USDA, 2016). O Paraná é o segundo maior produtor de soja do Brasil, tornando esse grão viável de ser estudado por essa pesquisa (CONAB, 2013).

A soja é comercializada de acordo com o seu teor proteico, sendo encontrada nas formas de farinha de soja (50 - 59% de proteína), concentrado proteico de soja (65 - 72% de proteína) e isolado proteico de soja (> 90% de proteína). O isolado proteico de soja é obtido através de extração das proteínas solúveis em água por meio de água a pH 8-9, precipitação em pH 4,5, centrifugação e secagem (BUFFO; HAN, 2005; LIU; KOST, 2009).

O IPS é uma mistura de várias proteínas, sendo as principais, classificadas de acordo com seu grau de sedimentação, após centrifugação em 2S, 7S, 11S e 15 S. Entre as quatro frações a 7S (β -conglucina) e a 11S (glicinina) representam mais que 80% das proteínas totais presentes no grão, que apresentam um bom balanço na composição de aminoácidos, contendo todos os aminoácidos essenciais, apresentando também excelentes propriedades funcionais com relação às capacidades gelificante, emulsificante e capacidade de retenção de óleo em água (NISHINARI et al., 2014).

A composição comercial aproximada de aminoácidos do IPS é de: proalanina (4,18 - 4,26%), arginina (7,31 - 8,56%), ácido aspártico (11,23 - 12,52%), cisteína (1,19 - 1,31%), ácido glutâmico (18,86 - 19,63%), glicina (3,95 - 4,23 %), histidina (2,29 - 2,66%), isoleucina (4,46 - 4,93%), leucina (7,81 - 8,21%), lisina (6,05 - 6,42%), metionina (1,24 - 1,33%), fenilalanina (4,94 - 5,28%), prolina (5,18 - 5,32%), serina (4,85 - 5,11%), treonina (3,57 - 3,76%), triptofano (1,15 - 1,39%), tirosina (3,68 - 3,93%) e valina (4,92 - 5,13%) (HUGHES et al., 2011). Por conter

em sua estrutura aminoácidos polares e apolares, o que gera um potencial químico, os filmes de IPS possuem uma matriz coesa (DANGARAN; TOMASULA; QI, 2009).

3.2 FILMES DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA

Os filmes biodegradáveis podem ter como base três matrizes poliméricas principais, os carboidratos, as proteínas e os lipídeos, ou a mistura deles. Os filmes baseados em proteína são compostos de diferentes tipos de proteína com várias massas molares (PAVLATH; ORTS, 2009).

Segundo Pérez-Gago (2011), o filme de proteína de soja confere boa estabilidade mecânica e potente barreira ao oxigênio e lipídeos, porém tem como desvantagem a alta permeabilidade ao vapor de água. A propriedade de transmissão de água indica a habilidade da embalagem de controlar a transferência de vapor de água entre o alimento e o meio externo (GENNADIOS; WELLER; GOODING, 1994). A alta permeabilidade ao vapor de água dos filmes de IPS faz como que essa embalagem não seja a melhor escolha no armazenamento de alimentos com alto teor de umidade.

Filmes e revestimentos a base de proteína são preparadas a partir de soluções composto de três componentes principais: proteína, plastificante e solvente (KIRSTEN; PEGGY; PHOEBE, 2009). Podem ainda ser adicionados outros aditivos como agente ajustador de pH, como o ácido acético e hidróxido de amônio, e agentes reticulantes, como o gluteraldeído, formaldeído e transglutaminase (PAVLATH; ORTS, 2009).

As características obtidas no filme são dependentes da composição, da concentração dos componentes e o método de formação. A concentração de proteína e plastificante na solução filmogênica e o método de preparo do filme são fatores importantes que contribuem para as propriedades funcionais do filme como espessura, propriedades mecânicas (elasticidade e resistência à tração) e permeabilidade a gases (CHO; RHEE, 2002; PÉREZ-GAGO, 2011; JIANG et al., 2012).

3.2.1 Plastificante

Filmes formados apenas por ingrediente puramente polimérico tendem a serem quebradiços e, portanto, plastificantes são adicionados a formulação afim de diminuir a fragilidade deles (GENNADIOS; WELLER; GOODING, 1994).

Os plastificantes são moléculas com baixo peso molecular, baixa volatilidade e que são adicionadas as formulações filmogênicas com o objetivo de facilitar no processo de produção e melhorar as propriedades funcionais dos filmes aumentando a flexibilidade e diminuindo a coesão e rigidez (SWAIN et al., 2004). As mudanças provocadas pelos plastificantes é devido a sua capacidade de diminuir as forças intermoleculares atrativas e aumentar o volume livre e a mobilidade da cadeia (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993).

Um plastificante comumente incorporado na formulação de filmes a base de IPS é o glicerol, pois sua estrutura é pequena, facilitando sua incorporação. Outro fator que contribui para sua ampla aplicação no filme é a sua natureza hidrofílica, tornando-o compatível com o IPS. E por último, o plastificante tem maior efeito quanto incorporado a um filme cuja estrutura do polímero é semelhante a estrutura do plastificante, portanto as proteínas, por possuir em sua estrutura grandes quantidades de hidroxilas, são mais eficientemente plastificadas por compostos que contenha grupos hidroxilas, como o glicerol (GENNADIOS; WELLER; GOODING, 1994; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2001; CHO; RHEE, 2002; BANKER, 1966; CUQ et al., 1997).

3.2.2 Processamento

O calor e o pH ajudam a formar o filme a base de IPS, pois ocorre a desnaturação da estrutura da proteína, clivando ligações dissulfureto nativas, expondo os grupos sulfidril e grupos hidrofóbicos, e assim novas ligações entre as cadeias de proteína são formadas durante a secagem do filme (PÉREZ-GAGO, 2011).

Os filmes preparados por aquecimento acima de 90 °C teve a capacidade formadora de filme comprometida, pois as proteínas têm a tendência de formar grandes agregados (NAGANO; FUKUDA; AKASAKA, 1996).

Filmes de IPS podem ser formados tanto em condições ácidas como em condições básicas. Segundo Jiang et al. (2012) que investigou o efeito de diferentes pHs sobre o potencial de formação de filme de IPS a diferentes temperaturas, o pH e a temperatura influenciam as propriedades mecânicas e a umidade dos filmes. De acordo com os autores, soluções filmogênicas sem ajuste de pH não formam filmes se não for aquecido a pelo menos 70 °C e filmes formados em condições básicas apresentaram maior flexibilidade.

De acordo com Krochta (1997) ocorrem dois eventos durante a formação do filme. O primeiro ocorre na fase de aquecimento em que a estrutura da proteína é rompida, assim algumas pontes dissulfeto são clivadas expondo os seus grupos sulfidrilas, que são hidrofóbicos. O segundo é durante a secagem, onde novas interações hidrofóbicas ocorrem e ligações dissulfeto e de hidrogênio são formados.

A formação de filme a base de IPS não ocorre em pH próximo ao ponto isoelétrico (pI 4,5), pois o IPS coagula não permitindo sua dispersão na solução filmogênica. Em pHs afastados do ponto isoelétrico, a proteína se desnatura e desdobra, expondo grupos sulfidrilas e grupos hidrofóbicos, e assim cada grupo se associa durante a produção do filme, formando novas ligações (interações). Em condições de pH ácido e alcalino extremos, a formação de filme é dificultada porque forças altamente repulsivas de cargas negativas (pH > 12) ou positivas (pH < 1) ao longo da cadeia de proteína impedem a sua aproximação e associação (GENNADIOS et al., 1993; FLINT; JOHNSON, 1981; SIAN; ISHAK, 1990).

Com base neste fato, Mauri e Anon (2006) estudaram a influência do pH (2, 8 e 11) das soluções de IPS na formação de filmes. Os filmes obtidos em pH 2 e 11 apresentaram uma microestrutura mais densa e menor solubilidade da proteína, pois nestas condições a estrutura desdobrada da proteína permitiu que ocorresse novas associações entre as cadeias pela combinação de interações covalentes (ligação dissulfeto) e não covalentes (interações hidrofóbicas e ligação de hidrogênio).

3.3 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

O óleo essencial de orégano (OEO) tem como ativos antimicrobianos as substâncias carvacrol e timol. Segundo Nazer et al. (2005), Rhayour et al. (2003) e Silva et al. (2005) esses compostos tem efeito inibitório no controle in vitro da multiplicação do microrganismo *Salmonella*. A concentração do OEO é dependente de fatores abióticos como por exemplo o clima do local, seu solo, a variedade do orégano e o tipo de extração do óleo essencial (CONSENTINO et al., 1999; JULIANO; MATTANA; USAI, 2000; FALEIRO et al., 2003; OUSSALAH et al., 2006).

Os compostos timol e carvacrol também possuem atividade antioxidante, devido a presença de fenol na sua estrutura molecular (DAPKEVICIUS et al., 1998). Os compostos fenólicos possuem o grupo hidroxila (-OH) ligado a um carbono que é parte de um anel aromático. A inibição da oxidação do alimento é devido ao átomo de hidrogênio do grupo hidroxila poder ser doado ao radical livre, impedindo que este composto oxide outras substâncias (NGUYEN; KRYACHKO; VANQUICKENBORNE, 2003).

Os óleos essenciais quando adicionados ao filme podem não afetar a umidade do mesmo, porém modificam as propriedades mecânicas e de barreira. Em relação à resistência à tração foi observado uma mudança significativa em filmes de alginato contendo óleo de orégano e carvacrol, que demonstraram valores mais baixos e resistência de $2,47 \pm 0,37$ e $2,58 \pm 0,37$ MPa, respectivamente. Já o alongamento na ruptura aumentou em todas as amostras que continham OE, chegando a valores de 58,33%. Não se observou diferença significativa no módulo de elasticidade dos filmes (ROJAS-GRAÜ et al., 2007).

3.4 MICROENCAPSULAÇÃO POR GELIFICAÇÃO IÔNICA

Os óleos essenciais são compostos voláteis e acabam evaporando facilmente e/ou degradando-se durante o processamento, devido às altas temperaturas, luminosidade, pressão ou oxigênio. Uma tecnologia utilizada para auxiliar na manutenção da bioatividade dos óleos essenciais é a microencapsulação (DONSÌ et

al., 2011). A microencapsulação de compostos bioativos é de extrema importância, pois permite o isolamento, a proteção, o transporte e a liberação de diversas substâncias ativas, tais como óleos essenciais, ácidos graxos, antioxidantes, enzimas e vitaminas, evitando sua degradação (DIMA et al., 2013).

A gelificação iônica é um método de microencapsulação onde uma solução polimérica aniônica contendo os nutrientes isolados ou em emulsão é gotejada sobre uma solução iônica formando um complexo. A solução catiônica de reticulação mais utilizada é a de cátions divalentes como o Ca^{2+} (BEAULIEU et al., 2002). O alginato de sódio é um polissacarídeo linear, hidrossolúvel, composto por L-gulurônico e β -D-manurônico. Dentre os diversos compostos possíveis de serem utilizados como material encapsulante em microencapsulação por gelificação iônica, o alginato de sódio é de grande interesse, pois ele interage com ions cálcio, através de ligações com os grupos carboxílico de gulurato, formando um gel (DIMA et al., 2013).

Dentre os métodos de microencapsulação, a gelificação iônica tem atraído cada vez mais atenção nos últimos anos, pois apresenta a vantagem de utilizar condições brandas de processo (sem uso de solventes orgânicos tóxicos e uso de baixas temperaturas), ser simples, rápida e de baixo custo (MESTDAGH; AXELOS, 1999). É uma técnica normalmente usada para encapsular ingredientes sólidos ou líquidos que são insolúveis em água, sendo indicado para encapsular OEs.

Hosseini et al. (2013a) estudou a nanoencapsulação de OEO em quitosana pela técnica de gelificação iônica utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente reticulante. As nanopartículas obtidas possuíam uma distribuição regular esférica de tamanho 40 a 80 nm. A eficiência de encapsulação foi de 21 a 47%, a capacidade de carga foi de 3 a 8%, quando o conteúdo inicial de OEO foi de 0,1 a 0,8 g/g quitosana.

Hosseini et al. (2013b) estudou a microencapsulação de óleo essencial de *Satureja hortensis* (SEO) em alginato de sódio através de gelificação iônica. Os valores de eficiência de encapsulação encontrados foram de 52 a 66%, a capacidade de carga de 20 a 26% e de diâmetro médio das partículas foi de 47 a 117 μm . Essas micropartículas demonstraram ter um bom efeito antioxidante (com a atividade de captura de radicais livre de DPPH de 40,7 a 73,5%) e possuíam propriedades antibacterianas, tendo um efeito melhor quando a concentração de SEO foi de 3% (v/v). *S. aureus* foi considerada uma bactéria sensível a SEO e

apresentou uma zona de inibição de 304,37 mm² quando em contato com micropartículas contendo 3% (v/v) de SEO.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Para a produção dos filmes foram utilizados isolado proteico de soja (90% de proteína, Bremil, Brasil), glicerol (Synth, Brasil), hidróxido de sódio (Vetec, Brasil), ácido clorídrico PA (Synth, Brasil), óleo essencial de orégano (Quinari, Brasil), alginato de sódio (FMC, Brasil), cloreto de cálcio (Vetec, Brasil), tween 80 (Anidrol, Brasil) e óleo resina de páprica (Citromax, Brasil). Para as análises microbiológicas utilizou-se Ágar Müller Hinton (Himedia, Índia), caldo Müller Hinton (Himedia, Índia) e água peptonada (Himedia, Índia).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 ELABORAÇÃO DOS FILMES DE IPS

Os filmes de IPS foram preparados nos laboratórios de Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Londrina. O método utilizado foi o de casting conforme descrito por Carpiné, et al. (2015), com algumas modificações. Foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) de 2° ordem, com duas variáveis independentes e três níveis de variação e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Tabela 1). As variáveis independentes estudadas foram concentração de IPS (4,38 a 8,62%) e pH (3,46 a 10,54).

O IPS foi pesado conforme a Tabela 1 e logo em seguida foi adicionado o glicerol (30 g de glicerol/ 100 g IPS) e completado o volume da solução com água deionizada. Homogeneizou-se a solução por 20 minutos em agitador magnético (Fisatom, Brasil) e após esse tempo aqueceu-se a solução até 40 °C. O pH foi ajustado, através de pHmetro (Hanna Instruments, modelo HI2221, Brasil), para

10,54 com solução de NaOH 1 M e após esse procedimento aqueceu-se a solução a 70 °C por 20 minutos. Resfriou-se a solução até 35 °C e ajustou-se o pH, de acordo com a Tabela 1, utilizando HCl 1 M. Logo em seguida homogeneizou-se a solução em Ultraturrax (marca IKA, modelo T18, EUA) a 10.000 rpm por 3 minutos. Aproximadamente 60 g da solução filmogênica foram vertidas em placas de acrílico (21 x 11 cm) e a secagem foi realizada em BOD (marca Tecnal, modelo T3-371) a 25 °C e 45% UR por 24h. Os filmes foram acondicionados em dessecador a 25°C e 53% UR por 48 horas antes de serem analisados.

4.2.2 CARACTERIZAÇÕES DOS FILMES DE IPS

4.2.2.1 Propriedades mecânicas

O teste de tração foi realizado em texturômetro, (marca Stable Micro Systems, modelo TA-TX2, Inglaterra) disponível no laboratório do Programa de Pós-graduação em Ciência de alimentos da Universidade Estadual de Londrina. As propriedades determinadas foram resistência máxima à tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de elasticidade ou de Young (MPa) conforme os métodos e normas da *American Society for Testing and Material* (ASTM, 2012). Os corpos de prova (80 mm de comprimento e 10 mm de largura) foram fixados nas garras móvel do equipamento com abertura inicial de 30 mm e a velocidade de tração foi de 0,8 mm/s.

4.2.2.2 Medida de cor

A cor foi medida com auxílio de colorímetro (KONICA MINOLTA, modelo CR-400, Japão). As amostras foram colocadas no sensor do equipamento que mediu os parâmetros de cor L* luminosidade (preto / branco), a* (verde / vermelho) e b* (azul / amarelo).

4.2.2.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor foi determinada por método gravimétrico, em triplicata, conforme a norma da *American Society for Testing and Material* (ASTM, 2000). Os corpos de prova (diâmetro de 70 mm) foram fixados em cápsulas de alumínio contendo sílica gel (~0% UR) e armazenado em dessecador com UR de 75% (NaCl) e o conjunto foi colocado em BOD (marca Tecnal, modelo T3-371, Brasil) a 25 °C. Pesou-se as cápsulas a cada quatro horas até alcançar dez medidas, verificando o ganho de massa e calculando a taxa de permeabilidade ao vapor de água conforme a Equação 1 e a permeabilidade ao vapor de água conforme a Equação 2.

$$TPVA = \frac{m}{t} \times \frac{1}{A}$$

Equação (1)

$$PVA = \frac{(TPVA \times e)}{ps \times (UR1 - UR2)} \times 100$$

Equação (2)

PVA = permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.h}^{-1}.\text{m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)

e = espessura média do corpo de prova (m)

Ps = pressão de saturação de vapor a temperatura do ensaio (Pa)

UR₁ = umidade relativa dentro do dessecador (%)

UR₂ = umidade relativa dentro da cápsula (%)

TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$)

t = tempo (h)

A = área de permeação do corpo de prova (m^2)

4.2.2.4 Solubilidade a água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada através do método empregado por Gontard, Guilber e Cuq (1992) com modificações. Filmes (2 cm x 2 cm) foram secos em estufa à 105 °C por 24 horas, e após esse período foram

pesados (massa inicial). Essas amostras foram então colocadas em erlenmeyers contendo 200 mL de água ultrapura e colocados em incubadora shaker (Nova técnica, Brasil) a 25 °C por 24 horas. Em seguida os filmes foram separados da água e novamente secos em estufa a 105 °C por 24 horas. Após esse período foram pesados (massa final) e a Equação 3 foi utilizada para o cálculo da solubilidade.

$$SOL = \frac{((m_{i2} - m_a) - m_{s2})}{(m_{i2} - m_a)} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

m_{s2} = massa seca final (g)

m_{i2} = massa seca inicial (g)

m_a = massa de água

SOL = solubilidade do filme (%)

4.2.2.5 Análise estatística

A partir do DCCR foi avaliado o efeito da concentração de IPS e do pH sobre as propriedades do filme como: cor (L^* , a^* e b^*), permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade (SOL), resistência máxima à tração (RT), alongação na ruptura (ELO) e módulo de elasticidade ou de Young (MY). Com o auxílio do programa STATISTICA® (Statsoft, Tulsa, USA), versão 10, modelos polinomiais foram ajustados a cada resposta. O modelo matemático foi:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Onde Y é a resposta; b_0 o valor médio, b_1 e b_2 são os coeficientes de regressão para os efeitos lineares; b_{11} e b_{22} são os coeficientes de regressão para os efeitos quadráticos; b_{12} o coeficiente de regressão para o efeito de interação; e X_1 e X_2 são as variáveis independentes. A análise de Variância ANOVA (5% de significância) foi realizada para avaliar o nível de significância, o coeficiente de determinação (R^2) e a falta de ajuste dos modelos matemáticos ajustados para cada resposta.

Finalmente foi realizada a otimização da formulação do filme utilizando-se a função desejabilidade (otimização multi-resposta) e as propriedades consideradas foram RT, ELO e SOL.

4.2.3 MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO POR GELIFICAÇÃO IÔNICA

O óleo essencial de orégano foi encapsulado pela técnica de gelificação iônica conforme Beraldo (2016), com adaptações. Inicialmente foi preparada uma solução de alginato de sódio 1,25% (m/v). A essa solução foi adicionado óleo essencial de orégano OEO (3%, m/m em relação ao alginato) e óleo resina de páprica (2% em relação a massa do OEO), cuja função foi corar as microcápsulas facilitando a visualização, e foram emulsionados por 3 minutos a 15.000 rpm em Ultraturrax (IKA, modelo T18, EUA). A emulsão preparada foi atomizada, através de um bico atomizador duplo fluido (Labmaq, Brasil) com diâmetro de 7 mm e pressão do ar de 0,125 kgf/cm², sobre uma solução de cloreto de cálcio 2% (m/v) que durante o processo permaneceu sob agitação. Foi então realizada a cura das micropartículas obtidas, permanecendo sob agitação constante em solução de cloreto de cálcio por 15 minutos. Após a cura as micropartículas foram lavadas diversas vezes com água, para a remoção do cloreto de cálcio não complexado, com auxílio de uma peneira de malha de aço com abertura de 53 µm.

4.2.3.1 Caracterização das micropartículas de óleo essencial de orégano

4.2.3.1.1 Morfologia da partícula

As micropartículas tiveram a sua morfologia analisada por microscópio ótico trinocular (Motic, modelo BA210, China) acoplado com câmera digital (Motic, modelo Moticom +5, China) com captação de imagem em objetiva de 10 X de aumento.

4.2.3.1.2 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi realizada em triplicata por método de destilação por arraste a vapor com auxílio de um Clevenger (OLIVEIRA; SOUZA, 2012). Pesou-se 50 g das cápsulas úmidas e diluiu-as em 50 g de solução de citrato de sódio 2% (m/v). Homogeneizou-se e transferiu-se para um balão volumétrico que continha esfera de vidro e 2 g de sabão antiespumante. Encaixou-se uma das extremidades do balão volumétrico no clevenger e a outra no condensador, vedando ambas as extremidades com graxa de silicone. Vedou-se também, com parafilme e filme de PVC, a outra extremidade do condensador. Durante todo o procedimento álcool gelado, à aproximadamente -20°C , foi passado no condensador com auxílio de uma bomba de aquário (Sarlo better b500, Brasil) e mangueiras de silicone com diâmetro externo de 1 cm. A manta do condensador então foi ligada e procedeu-se a extração do óleo de orégano. O volume do OEO obtido foi utilizado no cálculo da eficiência de encapsulação, conforme Equação 1.

$$EE(\%) = \frac{V_f \rho_{or} m_{ST}}{m_{cap} m_{or}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

V_f = volume final medido na bureta do clevenger;

ρ_{or} = densidade do óleo de orégano ($0,939 \text{ g.mL}^{-1}$) (BUDAVARI, 1996);

m_{cap} = massa de cápsulas pesada para a realização da análise;

m_{or} = massa de óleo de orégano adicionada na emulsão;

m_{ST} = massa de sólidos totais (massa de alginato + massa óleo de orégano) na emulsão.

4.2.3.1.3 Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foram determinados no laboratório do Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolates do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas – SP, através de

espalhamento de luz (Horiba, modelo LV950, Japão) com água destilada como meio dispersante. O diâmetro médio da partícula foi expresso em termos de volume médio ($D_{4,3}$) e a polidispersidade foi dada pelo índice span, calculado com a Equação 2:

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad \text{Equação (2)}$$

D_{10} = diâmetros de 10 % da distribuição acumulada.

D_{50} = diâmetros de 50 % da distribuição acumulada.

D_{90} = diâmetros de 90 % da distribuição acumulada.

4.2.4 PRODUÇÃO DOS FILMES CONTENDO ÓLEO DE ORÉGANO LIVRE E MICROENCAPSULADO.

Os filmes foram produzidos pela técnica de casting conforme Carpiné et al. (2015), com modificações. Foram produzidas 3 formulações: o filme de IPS controle (C), o filme de IPS adicionado de óleo de orégano (OEO) e o filme de IPS contendo óleo de orégano microencapsulado (OEOM). Os filmes contendo OEO e OEOM continham 3 g de óleo para cada 100 g de solução filmogênica. A formulação do filme consistiu em 7,56 g de IPS para cada 100 g de solução filmogênica e 25 g de glicerol /100 g IPS, conforme estabelecido na otimização da produção do filme. Para a produção dos filmes, o IPS foi solubilizado em água destilada a 25 °C, em seguida o pH da solução foi ajustado para 10,54 (NaOH 1M), mantido sob agitação por 30 minutos, aquecido até 70 °C e mantido por mais 20 minutos. Após o resfriamento da solução filmogênica, adicionou-se, o OEO e o Tween 80, ou o OEOM e homogeneizou-se em Ultraturrax (IKA, modelo T18, EUA) a 10.000 rpm por 3 minutos. A solução filmogênica foi vertida em placas de acrílico e secas a 25 °C e 45% UR por 24 horas em BOD (marca Tecnal, modelo T3-371). Os filmes foram acondicionados em dessecador a 25°C e 53% UR por 48 horas antes de serem feitas as análises do tempo zero. Para avaliar o efeito do armazenamento, os filmes permaneceram em dessecador nessas mesmas condições durante 90 dias.

4.2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO LIVRE E MICROENCAPSULADO

Os filmes foram avaliados quanto a sua facilidade de remoção do suporte, presença de partículas insolúveis, manuseabilidade e presença de exsudados ou separação de fases. As propriedades mecânicas, solubilidade, PVA e cor foram avaliadas utilizando as mesmas metodologias descritas anteriormente.

4.2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram previamente secas em dessecador contendo sílica gel por 14 dias e após este período foram fraturadas em nitrogênio líquido e fixadas sobre stubs com fitas de carbono. As amostras foram recobertas com ouro em um Sputter Coater (BAL-TEC, modeloSCD-050, Balzers, Liechtenstein) e em seguida foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (Philips, modelo FEI Quanta 200 Japão), com potência de aceleração de 20 kV, para análise da superfície e da área de fratura. A magnitude de observação foi de 1600x para área de fratura e de 400x para superfície.

4.2.5.2 Atividade antimicrobiana

As análises microbiológicas foram realizadas em triplicata. Para esta análise, inicialmente, reativou-se as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) e *Escherichia coli* (ATCC 35218) em caldo Müller Hinton a 35°C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão McFarland de 0,5. Inoculou-se 0,1 mL das suspensões bacterianas (10^8 UFC/mL) em placas contendo ágar Müller-Hinton e discos de filmes com diâmetro de 20 mm foram dispostos na superfície da placa. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período observou se houve

a formação de halo de inibição. O halo foi medido com auxílio de régua e expresso em milímetros (NCCLS, 2003).

4.2.5.3 Análise estatística

As médias dos resultados de propriedades mecânicas, PVA, cor, solubilidade e atividade antimicrobiana dos filmes contendo óleo de orégano livre e microencapsulado foram avaliados por análise de variância (ANOVA), e a média dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% significância ($p < 0.05$) utilizando o software Statistica, versão 10 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FILMES DE IPS COM DIFERENTES PH E CONCENTRAÇÃO DE IPS

Os filmes de IPS tiveram a espessura média de $217 \pm 40 \mu\text{m}$, foram facilmente removidos das placas de acrílico, apresentaram coloração amarelada, com aspecto contínuo, boa manuseabilidade e sem migração aparente de glicerol, como pode ser visto no Apêndice A.

5.1.1 Propriedades mecânicas

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados experimentais das propriedades mecânicas dos filmes de IPS, conforme a condição estabelecida no DCCR. Na Tabela 2 encontram-se os coeficientes de regressão e análise de variância dos modelos matemáticos destas respostas.

As médias da resistência à tração (RT) dos filmes de IPS variaram de $2,4 \pm 0,1$ a $4,2 \pm 0,9$ MPa havendo valores similares reportado por Jiang et al. (2012), de $2,21 \pm 0,25$ a $6,03 \pm 0,35$ MPa. De acordo com a Tabela 2 e Figura 1, o efeito linear do pH influenciou a RT do filme indicando que quanto maior o pH do filme, maior foi a RT. O mesmo comportamento foi descrito por Cho et al. (2007), que relata que as RT dos filmes de IPS aumentaram com a elevação do pH para 7 e acima desse pH (8, 9 e 10) o aumento não foi significativo. Pérez-Gago, Nadaud e Krochta (1999) além de observarem o mesmo comportamento relatado por Cho et al. (2007), notaram que os filmes sem tratamento térmico tiveram menor RT que os filmes tratados com alta temperatura ($90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min). Jiang et al. (2012) também observaram que o efeito do tratamento térmico foi importante, independente do pH, para obter filmes com elevada RT.

Tabela 1 - Delineamento composto central rotacional e respostas das propriedades mecânicas, solubilidade, PVA e cor dos filmes.

X	Variáveis codificados		Componentes reais		Respostas							
	pH	IPS ^a	pH	IPS ^a	RT (MPa)	ELO (%)	MY (Mpa)	SOL (%)	PVA X 10 ⁷ (g/h.m.Pa)	L*	a*	b*
1	-1,00	-1,00	4,50	5,00	2,5 ± 1,0	74,1 ± 19,9	48,5 ± 18,5	22,12 ± 2,22	1,42 ± 0,63	77,56 ± 0,71	-0,16 ± 0,42	34,60 ± 1,05
2	-1,00	1,00	4,50	8,00	2,4 ± 0,8	123,9 ± 45,8	47,2 ± 14,9	24,46 ± 0,25	1,68 ± 0,49	78,58 ± 1,42	-0,62 ± 0,97	34,60 ± 1,22
3	1,00	-1,00	9,50	5,00	3,6 ± 0,2	260,3 ± 34,3	68,6 ± 13,2	27,23 ± 1,16	1,12 ± 0,06	69,85 ± 2,71	1,45 ± 1,45	37,11 ± 1,29
4	1,00	1,00	9,50	8,00	3,1 ± 0,3	369,3 ± 74,4	37,0 ± 12,2	22,12 ± 1,36	3,49 ± 0,35	69,14 ± 0,77	1,45 ± 0,35	36,85 ± 0,31
5	-1,41	0,00	3,46	6,50	2,4 ± 0,1	169,2 ± 18,4	46,6 ± 3,2	22,76 ± 0,76	3,66 ± 0,32	74,63 ± 1,03	1,61 ± 0,61	37,52 ± 0,79
6	1,41	0,00	10,54	6,50	4,2 ± 0,9	363,8 ± 66,2	65,6 ± 8,6	25,49 ± 0,22	4,05 ± 0,31	66,61 ± 1,35	2,82 ± 0,64	36,38 ± 0,87
7	0,00	-1,41	7,00	4,38	2,6 ± 0,3	204,2 ± 40,4	44,9 ± 5,6	25,85 ± 0,36	1,74 ± 0,26	69,63 ± 5,83	2,37 ± 1,96	34,06 ± 1,29
8	0,00	1,41	7,00	8,62	3,6 ± 0,3	236,2 ± 36,8	73,5 ± 9,2	25,83 ± 0,59	3,91 ± 0,55	71,92 ± 1,83	1,38 ± 1,00	34,29 ± 0,69
9	0,00	0,00	7,00	6,50	3,4 ± 0,4	213,4 ± 29,5	70,2 ± 8,9	22,28 ± 1,99	1,82 ± 0,89	71,53 ± 1,57	1,42 ± 0,62	34,80 ± 0,56
10	0,00	0,00	7,00	6,50	3,2 ± 0,4	236,3 ± 34,2	66,7 ± 9,2	22,13 ± 1,51	5,12 ± 0,89	68,75 ± 2,34	3,27 ± 1,11	36,15 ± 0,27
11	0,00	0,00	7,00	6,50	3,3 ± 0,7	301,4 ± 39,9	62,9 ± 19,7	22,98 ± 1,25	4,08 ± 0,95	71,38 ± 3,47	2,07 ± 1,72	35,14 ± 1,54

Isolado proteico de soja (IPS), elongação a ruptura (ELO), módulo de Young (MY), resistência máxima a tração (RT); solubilidade (SOL); permeabilidade ao vapor de água (PVA); ^a (g/100g solução); x (formulação).

Tabela 2 - Coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) das variáveis RT, ELO, MY, SOL, PVA, L*, a* e b* dos filmes.

Variáveis	RT (MPA)	ELO (%)	MY (MPA)	SOL (%)	PVA (g/m.h.PA)	L*	a*	b*
Média	3,31	224,82	66,62	22,46	$3,67 \times 10^{-7}$	70,55	2,26	35,36
pH (L)	0,54*	88,35*	4,58	0,83*	$0,26 \times 10^{-7}$	-3,56*	0,67	0,39
pH (Q)	-0,07	11,74	-7,1*	0,58	$-0,26 \times 10^{-7}$	0,80	-0,39	0,84
IPS (L)	0,10	25,52	0,95	-0,35	$0,71 \times 10^{-7}$	0,44	-0,23	0,01
IPS (Q)	-0,19	-11,42	-5,53	1,44*	$-0,77 \times 10^{-7}$	0,88	-0,57	-0,53
pH x IPS	-0,11	14,80	-7,56	-1,86*	$0,52 \times 10^{-7}$	-0,43	0,11	-0,06
R ²	0,79	0,86	0,47	0,90	0,48	0,79	0,47	0,60
Falta de ajuste	0,71	7328,85	815,4*	3,09	$5,69 \times 10^{-14}$	24,31	5,18	5,21

Isolado proteico de soja (IPS), resistência máxima a tração (RT), elongação a ruptura (ELO), modulo de Young (MY), solubilidade (SOL), permeabilidade à vapor de água (PVA). *significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$).

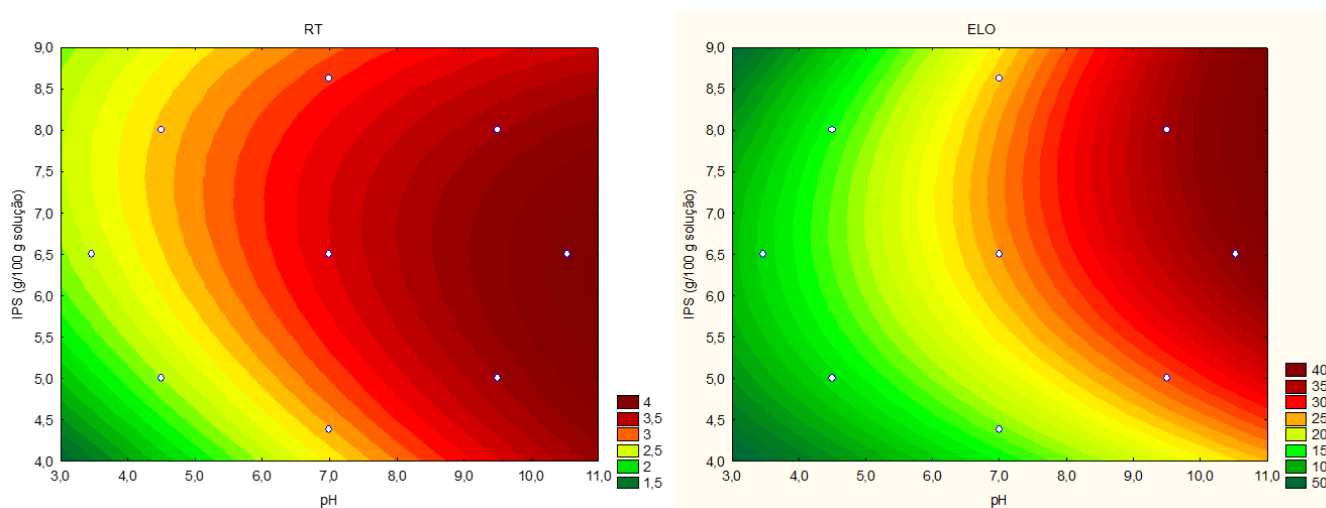


Figura 1 – Superfície de contorno sobre a influência do pH e da concentração de isolado proteico de soja (IPS) na resistência à tração (RT) e na elongação (ELO) dos filmes.

A alongação na ruptura é uma medida da capacidade de estiramento do filme e se refere à máxima mudança no comprimento do filme antes de se romper (NANDANE; JAIN, 2015). Os filmes de IPS deste trabalho apresentaram ELO de 74,1 a 369,3%, sendo esses valores comparáveis a filmes sintéticos como o polietileno de baixa densidade (100-700 %) e de alta densidade (100-1000 %) (FELDMAN; BARBALATA, 1996) e superiores a filmes a base de amido de mandioca desenvolvidos por Luchese, Spada e Tessaro (2017), cujo maior valor de ELO encontrado foi de 124 ± 18 . Assim como verificado para a RT, o efeito linear do pH influenciou significativamente a alongação na ruptura (ELO) do filme (Tabela 3), ou seja, quanto maior o pH mais flexível é o filme (Figura 3). O mesmo comportamento foi observado por Cho et al. (2007) que descreve que a ELO dos filmes de IPS difere com a alteração do pH apresentando mais flexibilidade em pH 12. Esse fato ocorreu, pois o tratamento com pH alcalinos acarreta na dissociação de subunidades solúveis de IPS que se agregam formando proteínas solúveis (JIANG, XIONG e CHEN, 2010), o que aparenta ser propício para a formação de uma rede estável.

O módulo de Young (MY) indica a rigidez do material e descreve como a flexibilidade e as propriedades mecânicas do filme se relacionam com a estrutura química dos biopolímeros (NANDANE; JAIN, 2015). Neste trabalho para o MY os valores médios variaram de 37,0 a 73,5 MPa. Para esta propriedade o coeficiente de determinação foi baixo ($R^2 = 0,48$), indicando que o modelo gerado explica apenas 48% da variação dos dados observados.

De uma forma geral, para as propriedades mecânicas, o pH teve um efeito significativo, indicando que maiores valores proporcionam filmes com maior RT, ELO e MY. A melhor capacidade de formação de filme em pH alcalino, distante do ponto isoelétrico, ocorreu porque a desnaturação das proteínas da soja foi promovida e resultou no desdobramento e solubilização das proteínas que facilitou a interação entre as cadeias, formando uma estrutura mais compacta (JIANG, CHEN e XIONG, 2009). Conforme Rhim et al. (2000), filmes de IPS preparados em condições alcalinas são estabilizados principalmente por ligação dissulfeto e, em menor extensão, por ligações hidrofóbicas e de hidrogênio, indicando que as ligações covalentes são as que mais contribuem na estabilidade deste tipo de filme. Os modelos obtidos para RT e ELO mostraram-se adequados para verificar a tendência

de resposta, fato evidenciado pelos valores de coeficiente de determinação (0,79 e 0,90 respectivamente) e falta de ajuste não significativa.

5.1.2 Solubilidade e permeabilidade ao vapor de água

Os resultados experimentais da solubilidade (SOL) e da permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de IPS estão apresentados na Tabela 1.

No ensaio de solubilidade, todos os filmes mantiveram-se íntegros após contato com a água e agitação a 25°C. A solubilidade foi influenciada pelo efeito quadrático do pH e pelos efeitos lineares e quadrático de concentração de IPS, variando de 22,12 a 27,23 % (Tabela 2). Observou-se que com aumento do pH e da concentração de IPS houve uma elevação na solubilidade dos filmes (Figura 2).

O aumento na solubilidade relacionado ao aumento da concentração de IPS pode ser explicado pelo fato da proteína de soja apresentar cerca de 58% de aminoácidos polares, e essa alta polaridade aumenta a afinidade do filme pela água e assim eleva a solubilidade do filme (RHIM; LEE, 2004). Resultados semelhantes também foram observados por Rocha et al. (2014), que notou que com o aumento no teor de proteína houve um aumento da solubilidade dos filmes.

O aumento no valor do pH também favoreceu o aumento da solubilidade do filme. Essa mesma característica foi observada no filme de Rocha et al. (2014) e segundo os autores, possivelmente foi devido ao distanciamento do ponto isoelétrico (pI) da proteína de soja (pH 4,5), onde a solubilidade é mínima. Gennadios et al. (1993), em seu estudo da ação do pH sobre o glúten de trigo e o isolado proteico de soja, também observaram que a solubilidade da proteína aumentou em condições alcalinas. Porém, no trabalho de Cho et al. (2007), em filmes comestíveis produzidos a partir de concentrado proteico de soja processado por membrana ou IPS o pH não teve efeito sobre a solubilidade dos filmes, possivelmente pela maior temperatura (90°C) empregada na produção dos mesmos.

A interação entre o pH e o IPS também foi significativo indicando que, de acordo com a Figura 2, em pH elevado e concentração de IPS reduzida e em pH reduzido e concentração de IPS elevada maiores valores de solubilidade tendem a serem obtidos.

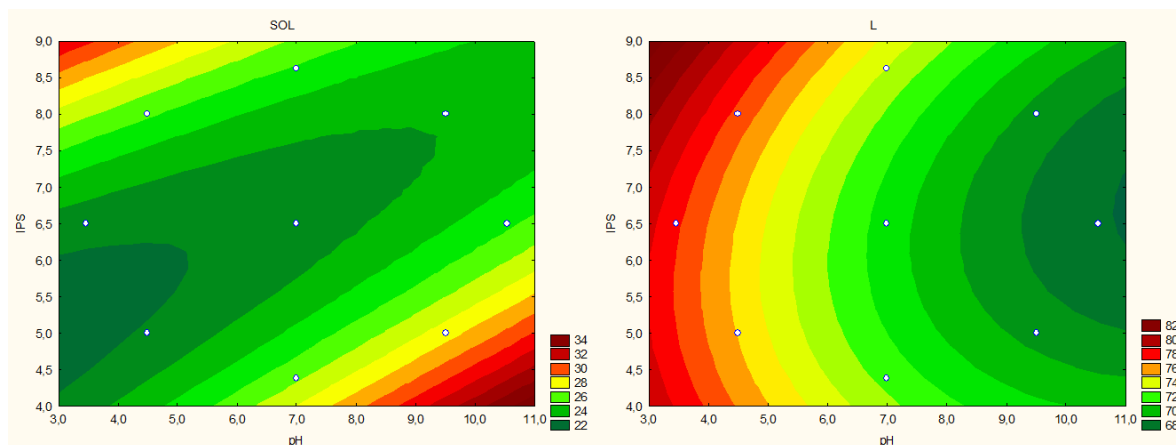


Figura 2 – Superfície de contorno sobre a influência do pH e da concentração de isolado proteico de soja (IPS) na solubilidade (SOL) e Luminosidade (L*) dos filmes.

Para a PVA os valores variaram de $1,12$ a $5,12 \times 10^{-7}$ g/h.m.Pa. Valores na mesma ordem de grandeza foram obtidos por Carpiné et al. (2015) em filmes de IPS adicionados de óleo de coco e surfactantes naturais (lecitina e *Yucca schidigera*) e valores superiores foram relatados por Cho et al. (2007). Conforme a Tabela 2, o modelo ajustado não foi capaz de explicar o efeito do pH e da concentração de IPS sobre a PVA, além de apresentar um baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,48$). O mesmo fato foi descrito por Cho et al. (2007), que não encontram relação entre a PVA e a alteração do pH (ácido e alcalino).

Resultados diferentes foram descritos por Rocha et al. (2014), que relatou a influenciada da concentração de glicerol, pH e interação IPS e pH na PVA do filme. Ainda segundo os autores, a PVA elevou com a redução do pH e a mesma foi reduzida apenas quando se empregou menores concentrações de IPS e pH alcalino.

5.1.3 Medida de cor

Os resultados experimentais da medida de cor expressos em termos de L^* , a^* e b^* estão resumidos na Tabela 1. Os filmes apresentaram valores de L^* variando de 66,61 a 77,56, de a^* de -0,16 a 3,27 e b^* de 34,06 a 37,52. A partir destes valores observa-se que houve uma predominância da cor amarela, em virtude dos maiores valores de b^* . Em filmes de IPS secos em diferentes condições (DENAVI et al.,

2009) também foi observada a predominância da cor amarela (valor positivo para a^*), sendo esta coloração típica de filmes produzidos a partir de proteína de soja.

Pode-se observar que o parâmetro L^* foi influenciado negativamente pelo efeito linear do pH, ou seja, o aumento do pH causou uma diminuição na luminosidade do filme (Tabela 2). Isso ocorreu pois em pH alcalino houve a desnaturação da proteína e o favorecimento da formação de uma estrutura mais compacta, o que pode ter contribuído para que o filme apresentasse um aspecto opaco.

Os modelos desenvolvidos nesse projeto não foram capazes de explicar o comportamento dos parâmetros a^* e b^* , como pode ser observado pelo baixo valor de coeficiente de determinação e pela falta de significância dos efeitos (Tabela 2).

5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO FILME DE IPS PELA FUNÇÃO DESEJABILIDADE

Para a otimização da formulação do filme de IPS foi considerado seu uso como embalagem para alimentos e que para isto deve possuir boa resistência mecânica, flexibilidade e baixa solubilidade em água. Estabeleceu-se, portanto, que para obter um bom filme é desejável a máxima RT e ELO e mínima SOL.

Assim, através dos modelos matemáticos ajustados para cada uma das respostas RT, ELO e SOL, buscou-se a combinação desses critérios, para encontrar valores ótimos das variáveis independentes para a produção do filme.

A desejabilidade trata-se de uma função que combina simultaneamente diferentes respostas otimizadas e para cada resposta é necessária uma função de desejabilidade definida. A desejabilidade global é comumente obtida através da média das desejabilidades individuais previamente definidas (GARCIA, 2010).

As condições ótimas para a produção dos filmes de IPS foram 7,56 % de IPS e pH de 10,54. Sendo assim foi formulado um filme com essas condições. O filme ótimo apresentou espessura média de 184 μm , foi facilmente removido da placa de acrílico, aparentou coloração amarelada, com aspecto contínuo, boa manuseabilidade e sem migração aparente de glicerol, como pode ser visto na Apêndice A.

Tabela 3 – Comparação entre os valores reais e valores preditos para resistência a tração, alongação na ruptura e solubilidade em água.

RESULTADOS	Valores experimentais	Valores preditos	Desvio relativo ^a (%)
RT (MPa)	4,72 ± 0,52	3,81	19,3
ELO (%)	314,82 ± 7,66	394,09	- 25,17
SOL (%)	25,88 ± 1,7	23,41	9,5

^a desvio relativo = [(valor experimental – valor predito) / valor experimental]x 100

Resistência à tração (RT); alongação (ELO); solubilidade (SOL).

Assim, o filme ótimo possui as seguintes características: Alongação na ruptura de 314,82 ± 7,66 %; Módulo de Young de 82,15 ± 14,74 MPa; Resistência à tração de 4,72 ± 0,52; Solubilidade de 25,88 ± 1,7 %; PVA de 4,45 x 10⁻⁷ ± 0,85 g/m.h.Pa; valores de L* de 66,96 ± 2,95, a* de 2,38 ± 0,87 e b* de 37,32 ± 0,92. Uma comparação entre os valores preditos pela modelo matemático e os valores reais encontrados nas análises para algumas características analisadas no filme ótimo estão apresentadas na Tabela 3.

Através dos valores de desvio relativo gerados para cada variável é possível deduzir que a metodologia empregada para a otimização das condições de processo foi satisfatória e que os modelos gerados para estas propriedades apontam uma tendência de resposta. A otimização da produção de filmes de farinha de achira (ANDRADE-MAHECHA; TÁPIA-BLÁCIDO; MENEGALLI, 2012) e de filmes de farinha de banana (PELLISSARI et al., 2013) também foi relatada com sucesso pela função desejabilidade.

5.3 MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE OEO

A microencapsulação por gelificação iônica do OEO e óleo resina de páprica utilizando como material de parede o alginato de sódio e cloreto de cálcio como agente reticulante foi realizada com sucesso. Como pode ser observado na Figura 1, o óleo resina de páprica cumpriu adequadamente seu papel possibilitando a observação da estrutura interna das micropartículas úmidas. Pode-se observar que o formato foi esférico e estava bem recheado de óleo.

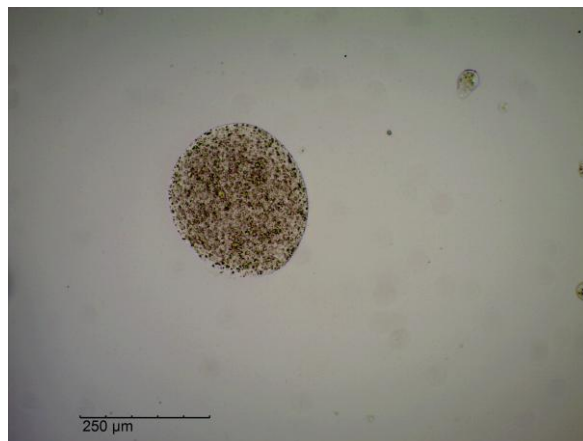


Figura 3 - Microscopia ótica das micropartículas de óleo essencial de orégano

O diâmetro médio das microcápsulas foi de 250 μm , valor menor que o encontrado por Benavides et al. (2016) em microcápsulas de óleo essencial de tomilho obtidas por gelificação iônica utilizando alginato de sódio e cloreto de cálcio. O índice de polidispersão ou span das micropartículas foi de $1,48 \pm 0,2$, sendo este valor considerado alto e indica que não houve homogeneidade quanto ao tamanho das amostras.

A eficiência de encapsulação (EE) das cápsulas úmidas contendo OEO foi obtida através de destilação por arraste a vapor e foi de 79,6 %. Valor superior (85 %) de EE foi obtido por Benavides et al. (2016) em microcápsulas de óleo de tomilho produzidas por gelificação iônica, possivelmente por terem empregado uma velocidade de agitação maior no preparo da emulsão (18.000 rpm) e terem utilizado menor quantidade de óleo (2 %, v/v) em relação à quantidade de alginato de sódio. Valor inferior de EE ($53,4 \pm 0,65$ a $66,4 \pm 1\%$) foi relatado por Hosseini et al. (2013) em nanopartículas de quitosana contendo OEO.

5.4 FILMES DE IPS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO LIVRE (OEO) E ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO MICROENCAPSULADO (OEOM)

5.4.1 Espessura e medida de cor

A espessura média dos filmes foi de 210 ± 20 μm para o filme de IPS controle, de 322 ± 20 μm para o filme contendo OEO e de 327 ± 50 μm para o filme contendo OEOM. Pode-se observar que não houve diferença significativa de espessura entre o filme contendo OEO e o OEOM, porém entre esses filme e o filme controle houve diferença significativa, sendo o filme C mais fino. Os filmes C e OEO apresentaram aparência homogênea e amarelada (Figura 4). O filme OEOM apresentou superfície levemente rugosa, em virtude da presença das micropartículas e com coloração avermelhada pela adição de óleo resina de páprica (Figura 4 e 5).



Figura 4 - Aparência dos com filmes controle (C), filme contendo Óleo de Orégano (OEO) e filme contendo óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM).

Os resultados de cor dos filmes C e adicionados de OEO e OEOM estão descritos na Tabela 4. De uma forma geral, o filme OEOM apresentou diferença significativa nos parâmetros de coloração (L^* , a^* e b^*) e isso ocorreu devido a adição de óleo resina de páprica (Tabela 4). Esse óleo possui uma forte cor laranja e foi adicionado com a intenção de facilitar a visualização do óleo no interior das microcápsulas através do microscópio óptico (Figura 5). Pode-se observar também que para o filme OEOM os parâmetros de cor mantiveram-se estáveis durante os 90 dias de armazenamento.

Comportamento diferente foi observado nos filmes C e OEO, nos quais com o decorrer do armazenamento os valores de L* e b* diminuíram e os valores de a* aumentaram, sendo que este fenômeno foi em maior proporção no filme OEO. É possível que neste período de condicionamento, tenha ocorrido rearranjo e reaproximação das cadeias proteicas do IPS em virtude da migração de glicerol e OEO, fazendo com que a matriz do filme se tornasse mais compacta e conseqüentemente mais escura. Outra hipótese é de que ocorreu a oxidação do OEO, causando o escurecimento do filme.

Tabela 4 - Parâmetros de cor dos filmes de IPS contendo óleo essencial de orégano livre e microencapsulado.

Propriedade	Filme	Tempo (dias)		
		0	45	90
L*	C	71,33 ± 0,74 ^{aA}	68,80 ± 0,8 ^{ab}	67,72 ± 0,97 ^{ab}
	OEO	70,83 ± 0,99 ^{aA}	64,13 ± 2,15 ^{bB}	64,84 ± 1,40 ^{bB}
	OEOM	58,64 ± 0,31 ^{bA}	58,37 ± 0,63 ^{cA}	58,41 ± 0,06 ^{cA}
a*	C	1,46 ± 0,33 ^{bB}	1,97 ± 0,62 ^{cb}	3,01 ± 0,54 ^{cA}
	OEO	1,89 ± 0,77 ^{bB}	4,58 ± 0,4 ^{bA}	5,15 ± 0,76 ^{bA}
	OEOM	22,44 ± 0,62 ^{aA}	20,57 ± 0,72 ^{ab}	21,82 ± 0,50 ^{aA}
b*	C	39,83 ± 0,33 ^{bA}	37,45 ± 0,24 ^{bB}	36,44 ± 0,22 ^{bC}
	OEO	39,55 ± 0,31 ^{bA}	37,28 ± 0,63 ^{bB}	36,87 ± 0,40 ^{bB}
	OEOM	44,98 ± 1,94 ^{aA}	45,75 ± 0,63 ^{aA}	45,77 ± 0,59 ^{aA}

Filme controle (C); Filme com óleo essencial de orégano (OEO); Filme com óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM); ^{a, b, c} Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey. ^{A, B, C} Letras maiúsculas iguais na linha não apresentam diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey.

5.4.2 Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As imagens de MEV de superfície e fratura dos filmes encontram-se na Figura 5. A superfície e fratura do filme controle apresentou-se lisa, homogênea e compacta, sugerindo que as condições de processo (pH, temperatura e agitação) empregada foi suficiente para desnaturar o IPS e formar um filme íntegro.

A adição de OEO em filmes de IPS causou modificações em sua morfologia, pois na superfície observa-se pequenas irregularidades, que pode estar relacionado

com gotas de OEO. Na imagem de fratura nota-se a presença de cavidades de diferentes tamanhos, podendo ser atribuídas a gotículas de OEO dispersas na matriz de IPS. A modificação na morfologia dos filmes também pode estar relacionada à falta de miscibilidade dos componentes (FABRA; TALENS; CHIRALT, 2009) e à incorporação de OEO em altas concentrações (BINSI; RAVISHANKAR; GOPAL, 2013).

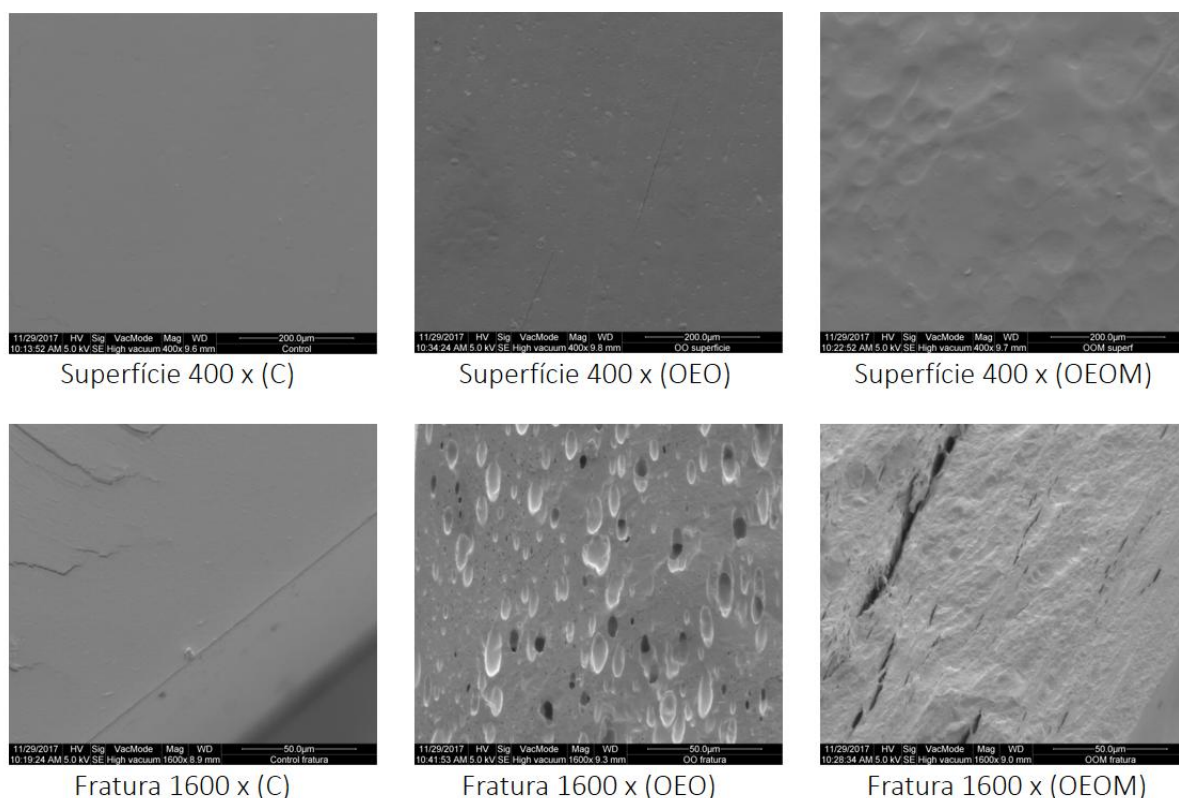


Figura 5 - Microscopias eletrônicas de varredura dos filmes controle (C), filme contendo Óleo de Orégano (OEO) e filme contendo óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM)

O filme OEOM apresentou superfície com depressões de diferentes tamanhos em razão da adição de micropartículas de OEO. Embora a quantidade de micropartícula adicionada fosse elevada, na imagem de fratura não foi possível visualizá-las dispersas na matriz de IPS. A explicação seria de que a micropartícula de alginato apresentou boa interação com o IPS e por isso formou uma estrutura com menos cavidades como do filme OEO. Crizel et al. (2017) também observaram uma boa interação entre micropartículas de casca de mamão encapsulado e filmes de gelatina.

5.4.3 Propriedades mecânicas

Os resultados das propriedades mecânicas de filmes de IPS contendo OEO e OEOM estão apresentados na Tabela 5. De um modo geral, a incorporação de OEO em filmes de IPS reduziu significativamente a RT e isso possivelmente ocorreu porque o OEO atuou reduzindo a interação polímero-polímero, formando uma estrutura menos coesa. Carpiné, et al. (2015) também relatou que a RT dos filmes de IPS emulsionados adicionados de óleo de coco e lecitina de soja ($7,65 \pm 0,48$ a $12,19 \pm 0,43$ MPa) apresentaram a RT menor que no filme controle ($12,05 \pm 0,61$ MPa). Outros autores que pesquisaram filme proteicos com adição de óleos também relataram esse padrão de resultado (VALENZUELA; ABUGOCH; TAPIA, 2013; ZAHEDI; GHANBARZADEH; SEDAGHAT, 2010). Dados contrários foram relatados por Oliveira et al. (2017) em filmes de WPC adicionados de OEO.

Tabela 5 - Propriedades mecânicas de filmes de IPS contendo óleo essencial de orégano livre e microencapsulado ao longo de 90 dias.

Propriedade	Filme	Tempo (dias)		
		0	45	90
RT	C	$7,45 \pm 0,75$ ^{bB}	$7,52 \pm 0,61$ ^{bB}	$10,92 \pm 0,77$ ^{bA}
	OEO	$2,51 \pm 0,18$ ^{cC}	$2,98 \pm 0,34$ ^{cB}	$3,65 \pm 0,32$ ^{cA}
	OEOM	$19,91 \pm 0,93$ ^{aB}	$20,77 \pm 1,83$ ^{aB}	$23,46 \pm 1,27$ ^{aA}
ELO	C	$247,55 \pm 24,66$ ^{aB}	$301,50 \pm 28,88$ ^{aA}	$275,98 \pm 18,80$ ^{aB}
	OEO	$259,53 \pm 10,57$ ^{aA}	$261,19 \pm 29,91$ ^{bA}	$172,04 \pm 31,13$ ^{bB}
	OEOM	$26,18 \pm 5,84$ ^{bA}	$31,59 \pm 7,71$ ^{cA}	$23,46 \pm 3,63$ ^{cA}
MY	C	$119,24 \pm 11,41$ ^{bB}	$132,52 \pm 17,52$ ^{bB}	$180,8 \pm 17,05$ ^{bA}
	OEO	$41,37 \pm 2,82$ ^{cB}	$50,61 \pm 4,77$ ^{cB}	$71,39 \pm 9,1$ ^{cA}
	OEOM	$375,44 \pm 22,27$ ^{aA}	$448,33 \pm 2,08$ ^{aA}	$467,45 \pm 14,06$ ^{aA}

Resistência à tração (RT); elongação a ruptura (ELO); modulo de Young (MY); Filme controle (C); Filme com óleo essencial de orégano (OEO); Filme com óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM); ^{a, b, c} Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. ^{A, B, C} Letras maiúsculas iguais na linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

A adição de OEO microencapsulado (OEOM) nos filmes elevou em aproximadamente 2,5 vezes o valor de RT. Este resultado pode estar relacionado

com a boa interação entre o IPS do filme e o alginato de sódio da micropartícula, que resultou no reforço da matriz polimérica. Resultado similar foi reportado por Crizel et al. (2017) em filmes de gelatina adicionados de micropartículas de casca de mamão e por Martínez-Ortiz et al. (2017) em filmes de amido incorporados com ácido ascórbico microencapsulado. O MY apresentou o mesmo comportamento de resposta da RT e para a ELO, o filme controle e filmes com OEO não tiveram diferença significativa, mas a incorporação de OEOM reduziu significativamente a ELO. Resultado diferente foi descrito por Carpiné et al. (2015) no qual foi observado que a adição de óleo de coco nos filmes de IPS aumentou a flexibilidade dos filmes.

Considerando o efeito do armazenamento, o mesmo comportamento descrito acima permaneceu entre as formulações. Entretanto, avaliando cada filme separadamente notou-se que para o filme C houve um aumento significativo na RT e MY e manteve-se a ELO após 90 dias. Para o filme OEO observou-se que houve também um aumento na RT e MY e uma redução na ELO. E, finalmente, no filme OEOM houve apenas elevação no valor de RT.

Essas alterações nas propriedades mecânicas em decorrência do armazenamento podem estar associadas com novas interações entre as cadeias proteicas que são formadas. Conforme Arthan, Prodpran e Benjakul (2009), a elevação da RT e redução da ELO é resultado da diminuição do volume livre na matriz do filme devido ao aumento da agregação e/ou rearranjo das moléculas poliméricas causadas pela mobilidade molecular. Além disso, o aumento na RT também pode estar ligado à migração de glicerol para a superfície do filme, levando à compactação das cadeias. Alterações nas propriedades mecânicas durante o armazenamento também foram verificadas em filmes e farinha de tritcale (BORNEO ALBA; AGUIRRE, 2016) e em filmes de proteína de peixe (ARTHAN; PRODPRAN; BENJAKUL, 2009).

5.4.4 Umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água

Os valores de umidade dos filmes foram de $15,86 \pm 6,31$ % para o filme C, $14,66 \pm 3,05$ % para o filme contendo OEO e de $13,46 \pm 0,75$ % para o filme contendo OEOM, não havendo diferença significativa entre as amostras.

Os resultados de solubilidade em água e de PVA dos filmes de IPS adicionados de OEO e OEOM estão apresentados na Tabela 6. A solubilidade dos filmes variou de $39,28 \pm 3,28$ % a $61,46 \pm 3,79$ % e não houve diferença significativa entre o filme C e o filme contendo OEOM. Já os filmes contendo OEO foram mais solúvel que os demais, no tempo 0, e pode estar relacionado com a estrutura menos coesa de filmes contendo óleo, e assim expondo mais grupos hidrofílicos que foram solubilizados. Porém, após 90 dias, a solubilidade do filme contendo OEO diminuiu, não havendo mais diferença significativa entre ele e as demais amostras e isso provavelmente ocorreu pela migração do glicerol e OEO que permitiu um rearranjo das cadeias poliméricas que tornou a estrutura mais coesa, corroborando com os resultados de propriedades mecânicas e cor.

Tabela 6 - Solubilidade em água e PVA dos filmes de IPS contendo óleo essencial de orégano livre e microencapsulado.

Propriedade	Filme	Tempo (dias)		
		0	45	90
SOL (%)	C	$39,28 \pm 3,28$ ^{bA}	$36,16 \pm 4,32$ ^{aA}	$40,75 \pm 4,57$ ^{aA}
	OEO	$61,46 \pm 3,79$ ^{aA}	$35,97 \pm 0,15$ ^{aC}	$48,94 \pm 6,14$ ^{aB}
	OEOM	$41,64 \pm 4,23$ ^{bAB}	$31,92 \pm 0,85$ ^{aB}	$45,69 \pm 6,50$ ^{aA}
PVA X 10 ⁷ (g/m.h.Pa)	C	$5,75 \pm 0,02$ ^{abA}	$3,84 \pm 0,03$ ^{aC}	$4,64 \pm 0,18$ ^{aB}
	OEO	$7,53 \pm 1,13$ ^{aA}	$5,76 \pm 2,5$ ^{aA}	$5,06 \pm 0,53$ ^{aA}
	OEOM	$3,1 \pm 0,18$ ^{bAB}	$3,5 \pm 0,05$ ^{aA}	$2,16 \pm 0,46$ ^{bB}

Solubilidade em água (SOL); permeabilidade ao vapor de água (PVA); Filme controle (C); Filme com óleo essencial de orégano (OEO); Filme com óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM); ^{a, b, c} Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. ^{A, B, C} Letras maiúsculas iguais na linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os filmes OEO e OEOM não tiveram alteração dos valores de solubilidade em razão do armazenamento. Crizel et al. (2017) relataram que a adição de micropartículas de casca de mamão em filmes de gelatina causou um decréscimo na solubilidade. Os autores atribuem este fato ao efeito de reforço que as micropartículas causam na estrutura do filme e isso reduz as lacunas na interface polímero-partícula, que, conseqüentemente, reduz a difusão de soluto do filme. Embora o efeito de reforço tenha sido observado nas propriedades mecânicas, isto não foi verificado para a solubilidade.

Ao avaliar a PVA dos filmes C após 90 dias de armazenamento, observou-se que a PVA diminuiu, provavelmente devido ao rearranjo das estruturas conforme discutido nos resultados de propriedades mecânicas e cor. Não houve diferença significativa entre o filme C e os demais, porém houve diferença entre os filmes que continham OEO e os que continham OEOM. Supõe-se que esta diferença seja porque as microcápsulas tiveram boa interação com a matriz do filme e aumentou a coesividade. Já com a adição de OEO houve a formação de um filme com uma estrutura mais enfraquecida e com espaços livres que permitiu a difusão do vapor de água.

Crizel et al. (2017) também observou que o filme controle não teve diferença significativa de PVA comparado ao filme contendo micropartículas. Reduções significativas na PVA foram obtidas por Martínez-Ortiz et al. (2017) quando adicionou-se de 2,5 a 12,5 % de ácido ascórbico microencapsulado e por Dammak et al. (2017) em filmes de gelatina incorporados de micropartículas de rutina e quitosana. Resultados similares foram descritos por Gontard et al. (1994), em seu trabalho sobre a avaliação da adição de substâncias hidrofóbicas em filmes à base de proteína de glúten. Eles descreveram que moléculas hidrofóbicas quando adicionadas em filmes compósitos pode danificar a estrutura do material facilitando a passagem de água e assim resultando em um valor maior de PVA.

5.4.5 Atividade antimicrobiana

Como pode ser observado no Apêndice B, não houve formação de halo de inibição tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus* nos filmes controle. Já em filmes contendo OEO e filmes contendo OEOM houve a formação de halo de inibição para os dois microrganismos estudados. As médias do halo de inibição formado para esses filmes estão apresentadas na Tabela 7, e o halo de inibição para *E. coli* variou de $6,3 \pm 0,6$ a $10,7 \pm 0,6$ mm e de $14,2 \pm 1,9$ a $31,7 \pm 2,9$ mm para *S. aureus*, no tempo 0. Os filmes OEO e OEOM demonstraram atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e *S. aureus* em tempo 0 e após os 90 dias de armazenamento. A atividade antimicrobiana também foi verificada em filmes de gelatina e quitosana (HOSSEINI et al., 2015), filmes de WPC (OLIVEIRA et al., 2017; SEYDIM; SARIKUS, 2006),

filmes de amido e quitosana (PELLISSARI; YAMASHITA; GROSSMANN, 2011), filmes de proteína de triticale (AGUIRRE; BORNEO; LEÓN, 2013), filmes de proteínas de sementes de pimenta (LEE et al., 2016) e filmes de IPS (EMIROĞLU, et al. 2010) adicionados de OEO.

No tempo inicial ($t = 0$) o filme OEOM apresentou maior halo de inibição frente aos dois microrganismos estudados. É possível que a microencapsulação tenha proporcionado um efeito protetivo ao óleo de orégano durante a produção dos filmes. Entretanto, após 90 dias de armazenamento este comportamento tendeu a se inverter e os filmes OEO e OEOM tiveram halo de inibição semelhante para *S. aureus*. Acredita-se que as microcápsulas auxiliaram na incorporação do óleo essencial de orégano durante o processamento, protegendo-o nos processos de homogeneização e secagem. Porém, devido ao elevado pH do filme, as microcápsulas podem ter sofrido hidrólise ou rompimento da estrutura e liberaram o ativo para a matriz do filme. Desta forma, os filmes contendo micropartículas tenderam a apresentar o mesmo comportamento de inibição que os filmes contendo OEO livre.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana de filmes de IPS adicionados de OEO e OEOM nos tempos 0, 45 e 90 dias.

Halo de inibição (mm)	Filme	Tempo (dias)		
		0	45	90
<i>E. coli</i>	OEO	6,3 ± 0,6 ^{bb}	12,5 ± 0,5 ^{aa}	3,0 ± 0,6 ^{bc}
	OEOM	10,7 ± 0,6 ^{aa}	9,5 ± 0,9 ^{ba}	4,2 ± 1,0 ^{ab}
<i>S. aureus</i>	OEO	14,2 ± 1,9 ^{bb}	19,2 ± 1,4 ^{aa}	11,0 ± 1,7 ^{ab}
	OEOM	31,7 ± 2,9 ^{aa}	18,2 ± 2,5 ^{ab}	13,7 ± 1,4 ^{ab}

Filme com óleo essencial de orégano (OEO); Filme com óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM); ^{a, b, c} Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. ^{A, B, C} Letras maiúsculas iguais na linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os filmes contendo OEO e OEOM formaram um maior halo de inibição para o microrganismo *S. aureus* que para a *E. coli* durante todo o tempo de armazenamento. Dadalioglu e Evrendilek (2004) relataram um forte efeito inibitório do óleo de orégano frente a *E. coli* O157:H7 e *S. aureus* e esse poder inibitório estava relacionado a alta concentração de carvacrol e p-cimeno. O modo de ação do OEO foi descrito por Helander et al. (1998) e segundo os autores, o carvacrol

desintegra a membrana externa de bactérias Gram negativas (*E. coli*), liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade do citoplasma à adenosina trifosfato (ATP). Sivropoulou et al. (1996) e Chorianopoulos et al. (2004) relataram que as bactérias Gram positivas são mais sensíveis do que as Gram negativas à ação de OEO, independente do teor de timol ou carvacrol, sendo esse efeito também verificado neste trabalho. Chorianopoulos et al. (2004) afirmaram que a ação antimicrobiana não ocorre somente pela presença de carvacrol e timol, mas devido a outras substâncias em baixas concentrações que pode interagir de forma sinérgica, aditiva ou antagônica. De acordo Siripatrawan, Vitchayakitti e Sanguandeeikul (2013), bactérias Gram negativas possuem uma camada fosfolipídica a mais em sua membrana celular, essa membrana é impermeável a muitas moléculas. Com isso, acredita-se que o OEO teve uma maior ação sobre as bactérias Gram positivas que as Gram negativas devido a estrutura da parede celular.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que a concentração de IPS e o pH utilizado durante a produção interferiram significativamente nas características finais do filme. O aumento na concentração de IPS aumentou a solubilidade do filme e a elevação do pH elevou a resistência à tração e a flexibilidade e reduziu a solubilidade em água. Os modelos matemáticos obtidos neste trabalho conseguiram explicar, com bom coeficiente de determinação, a solubilidade, a resistência máxima a tração, a elongação na ruptura e a luminosidade (L^*). Considerando a otimização pela técnica de desejabilidade, para se produzir um filme com baixa solubilidade, alta resistência à tração e alta elongação na ruptura é necessário utilizar 7,56 % de IPS e ajustar o pH da solução filmogênica para 10,54.

Neste trabalho foi também possível microencapsular o óleo essencial de orégano pela técnica de gelificação iônica e aplicar na formulação de filmes de IPS. A adição de OEO, seja na forma livre ou microencapsulada, proporcionou filmes com diferentes propriedades. O OEO livre proporcionou filmes menos resistentes, mais permeáveis ao vapor de água e com atividade antibacteriana quando comparado com o filme controle. Os filmes de IPS com OEOM apresentaram-se mais resistentes, menos flexíveis e permeáveis ao vapor de água e com significativa atividade antimicrobiana. Durante o armazenamento alterações nas propriedades funcionais foram observadas em todas as formulações, mas a atividade antimicrobiana foi mantida nos filmes OEO e OEOM.

A produção de filmes de IPS com óleos essenciais microencapsulados é uma alternativa interessante, pois proporcionou materiais com melhores propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água, quando comparado com filmes contendo óleo livre, além de possuírem atividade antimicrobiana frente a microrganismos patogênicos de interesse alimentar. Assim, o filme produzido neste trabalho pode ser utilizado na produção de embalagens ativas para auxiliar na conservação de alimentos e contribuir com a minimização de resíduos no meio ambiente.

Finalmente, sugere-se a continuidade deste estudo empregando diferentes concentrações de glicerol e de microcápsulas de óleo essenciais de orégano na produção de filmes de IPS a fim de tornar os filmes mais flexíveis.

REFERÊNCIAS

ASTM - American Society for Testing and Materials. Terminology relating to plastics (D883-12e1). **Annual Book of ASTM Standards**. West Conshohocken: ASTM, 2012.

ASTM - American Society for Testing and Materials. Standard test methods for water vapor transmission of material (E96-00). **Annual Book of ASTM Standards**. Philadelphia: ASTM, 2000.

AGUIRRE, A., BORNEO, R., LEÓN, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, v. 1, p. 2-9, 2013.

ANDRADE-MAHECHA, M.M.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; MENEGALLI, F. C. Development and optimization of biodegradable films based on achira flour. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 449– 458, 2012.

ARTHAN, A., PRODPRAN, T., BENJAKUL, S. Round scad protein-based film: storage stability and its effectiveness for shelf-life extension of dried fish powder. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 1238-1244, 2009.

ASBAHANI, A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220-243, 2015.

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

BANKER, G. S. Film Coating Theory and Practice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 55, n 1, p. 81-89, 1966.

BEAULIEU, L. et al. Elaboration and characterization of Whey Protein Beads by an Emulsification/Cold Gelation Process: Application for the Protection of Retinol. **Biomacromolecules**, v.3, p.239-248, 2002.

BENAVIDES, S.; CORTÉS, P.; PARADA, J.; FRANCO, W. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77-83, 2016.

BERALDO, J. C. **Produção de micropartículas de alginato tendo como cobertura gelatina e colágeno com diferentes graus de hidrólise**. 2016. Tese (Mestrado em Engenharia de alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas, 2016

BINSI, P. K., RAVISHANKAR, C. N., GOPAL, S. Development and characterization of and edible composite film based on chitosan and virgin coconut oil with improved moisture sorption properties. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 4, p. E526-E534, 2013.

BORNEO, R., ALBA, N., AGUIRRE, A. New films based on triticale flour: Properties and effects of storage time. **Journal of Cereal Science**, v. 68, p. 82-87, 2016.

BUDAVARI, S. E. A. **The Merck Index**. 20. ed. Rahway, New Jersey: Merck & Co., 1996

BUFFO, R. A.; HAN, J. H. Edible films and coatings from plant or origin proteins. In: HAN, J. H. **Innovations in food packaging**. London: Elsevier Academic Press, 2005. p. 277-300.

CARPINÉ, D. **Desenvolvimento e caracterização de filme emulsionado biodegradável produzido a partir de proteína isolada de soja, óleo de coco e surfactantes naturais**. 2015. 116 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

CARPINÉ, D. et al. Development and Characterization of Soy Protein Isolate Emulsion-Based Edible Films with Added Coconut Oil for Olive Oil Packaging: Barrier, Mechanical, and Thermal Properties. **Food Bioprocess Technology**, v. 8, p. 1811–1823, 2015.

CARPINÉ, D. et al. Effect of the natural surfactante *Yucca schidigera* extract on the properties of biodegradable emulsified films produced from soy protein isolate and coconut oil. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 364-371, 2016

CHO, S. Y. et al. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 418-423, 2007.

CHO, S. Y.; RHEE, C. Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. **LWT - Food Science and Technology**. V. 35, n. 2, p. 151–7, mar. 2002.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential oils of satureja, origanum, and thymus species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8261-8267, 2004.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 1, n.3, Brasília: Conab, 2013.

CONSENTINO, S. et al. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.

CRIZEL, T. M. et al. Biodegradable films based on gelatin and papaya peel microparticles with antioxidant properties. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 3, p. 536-550.

CUQ, B. et al. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 45, n. 3, p. 622–6, mar. 1997.

DADALIOGLU, I.; EVRENDILEK, G. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 8255-8260, 2004.

DAMMAK, I. et al. Properties of gelatin-based films incorporated with chitosan-coated microparticles charged with rutin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.101, p. 643-652, 2017.

DANGARAN, K.; TOMASULA, P. M.; QI, P. Structure and function of protein-based edible films and coatings. EMUSCADO, I. M.; HUBER, K. C. **Edible film and coatings for food applications**. New York: Springer, 2009. p. 25-56.

DAPKEVICIUS, A. et al. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 77, p. 140–6, 1998.

DENAVI, G. et al. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 41-349, 2009.

DEVI, N., SARMAH, M., KHATUN, B., MAJI, T. K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136-145, 2017.

DIMA, C. et al. **Encapsulation of coriander essential oil in alginate and alginate/chitosan microspheres by emulsification external gelation method**. In: Inside Food Symposium, Leuven, Belgium, 2013.

DONSÌ, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT: Food Science and Technology**, v. 44, p. 1908–1914, 2011.

EMIROĞLU, Z. K. et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, p. 86, n. 2, p. 283-288, 2010.

FABRA, M. J., TALENS, P., CHIRALT, A. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 676-683, 2009.

FALEIRO, M. L. et al. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of thymus. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 35-40, 2003.

FELDMAN, D.; BARBALATA, A. Synthetic Polymers: Technology, Properties, Applications. **Springer Science & Business Media**, 1996.

FLINT, F. O.; JOHNSON, R. F. P. A study of film formation by soy protein isolates. **Journal of Food Science**, v. 46, p.1351–1353, 1981.

GARCIA, P. S. **Ácido Cítrico como Compatibilizante entre Amido e Poliéster em filmes Tubulares Produzidos por Extrusão**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em

Ciência de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

GENNADIOS, A. et al. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1835–1839, 1993.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; GOODING, C. H. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 21, p. 395–409, 1994.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 1, 1992.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 206-211, 1993.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat and lipids: water vapour permeability and other physical properties. International. **Journal of Food Science & Technology**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

HOSSEINI, S. F. et al. 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, 2013a.

HOSSEINI, S. M. et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelatin process. **International journal of biological macromolecules**, V. 63, p. 583-588, 2013b.

HOSSEINI, S. F. et al. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 403-413, 2015.

HUGHES, G. J.; et al. Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) for soy protein isolates and concentrate: criteria for evaluation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12707 - 12712, 2011.

JIANG, J.; CHEN, J.; XIONG, Y. L. Structural and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolate Subjected to Acid and Alkaline pH-Shifting Processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7576–7583, 2009.

JIANG, J. et al. Structure-modifying alkaline and acidic pH-shifting processes promote film formation of soy proteins. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1944-1950, 2012.

JIANG, J.; XIONG, Y. L.; CHEN, J. PH shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8035–8044, 2010.

JULIANO, C.; MATTANA, A.; USAI, M. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 4, p. 516-522, 2000.

KIRSTEN, D.; PEGGY, M. T.; PHOEBE, Q. Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings. In: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. **Edible films and Coatings for Food Applications**. New York: Springer, 2009. p. 24-56.

KROCHTA, J. M. Edible protein films and coatings. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food Proteins and their Applications**. New York: Marcel Dekker, p. 529–549, 1997.

LEE, J. H. et al. Physical properties and application of a red pepper seed meal protein composite film containing oregano oil. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 136-143, 2016.

LIU, L. S.; KOST, J. Biobased materials. In: YAM, K. L. **The Wiley Encyclopedia of Packaging**, 3a ed. Hoboken: John Wiley & Sons, p. 110-115, 2009.

LUCHESE, C. L.; SPADA, J. C.; TESSARO, I. C. Starch content affects physicochemical properties of corn and cassava starch-based films. **Industrial Crops & Products**, v. 109, p. 619–626, 2017.

MARTÍNEZ-ORTIZ, M. A. et al. Partial characterization of chayotextle starch-based films added with ascorbic acid encapsulated in resistant starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 341-347, 2017.

MAURI, A. N.; ANON M. C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 7, p. 1064-1072, 2006.

MC HUGH, T.H.; KROCHTA J.M. Plasticized whey protein edible films: water vapor permeability properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 416-419, 1994.

MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. **Biopolymer science: Food and Nonfood Applications**, p. 303-314, 1999.

MILLER, K.S.; KROCHTA J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 228-237, 1997.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Impacto das embalagens no meio ambiente**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/producao-e-consumo-sustentavel/consumo-consciente-de-embalagem/impacto-das-embalagens-no-meio-ambiente>> Acesso em 03 out. 2016.

NAGANO, T.; FUKUDA, Y.; AKASAKA, T. Dynamic viscoelastic study on the gelation properties of b-conglycinin-rich and glycinin-rich soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 3484–3488, 1996.

NANDANE, A. S.; JAIN, R. Study of mechanical properties of soy protein based edible film as affected by its composition and process parameters by using RSM. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3645-3650, 2015.

NAZER, A. I. et al. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 391-398, 2005.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically: Approved, **Standard West Valley**, v. 6, p. 8, 2003.

NGUYEN, M.T.; KRYACHKO, E. S.; VANQUICKENBORNE, L. G. General and theoretical aspects of phenols. In: Rappoport Z, editor. **The chemistry of phenols**. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2003, p 1–198.

NISHINARI, K. et al. Soy proteins: A review of composition, aggregation and emulsification. **Food Hydrocolloids**, 39, 301-318, 2014.

OLIVEIRA, S. P. L. F. et al. Whey protein-based films incorporated with oregano essential oil. **Polímeros**, v. 27, n. 2, p. 158-164, 2017.

OLIVEIRA, W. P. D.; SOUZA, M. E. A. O. D. Comparação dos métodos extração de óleo essencial de arraste a vapor e hidrodestilação utilizando casca de manga nos estados de desidratação e in natura. **Anais VII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. Palmas, p. 7, Baltimore, 2012.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v. 73, n. 2, p. 236-244, 2006.

PAVLATH, A. E.; ORTS, W. Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. **Edible films and Coatings for Food Applications**. New York: Springer, 2009. p. 1-24.

PELLISSARI, F. M., YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. Extrusion parameters related to starch/chitosan active film properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 4, p. 702-710, 2011.

PELLISSARI, F. M. et al. Optimization of process conditions for the production of films based on the flour from plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 52, p. 1-11, 2013.

PÉREZ-GAGO M. B. Protein-based films and coatings. In: BALDWIN, E. A.; HAGENMAIER, R.; BAI, J. **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**. 2° ed. CRC Press, 2011. p.14-58.

PÉREZ-GAGO, M. B.; NADAUD, P.; KROCHTA, J. M. Water Vapor Permeability, Solubility, and Tensile Properties of Heat-denatured versus Native Whey Protein Films. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1034-1037, 1999.

RHAYOUR, K. et al. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherchia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 5, p. 356-362, 2003.

RHIM, J. W., et al. Solubility, tensile and color properties of modified soy protein isolate films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4937–4941, 2000.

RHIM, J.-W.; LEE, J.-H. Effect of CaCl₂ Treatment on Mechanical and Moisture Barrier Properties of Sodium Alginate and Soy Protein-based Films. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 728-732, 2004.

ROCHA, G. O. et al. Filmes Compostos Biodegradáveis a Base de Amido de Mandioca e Proteína de Soja. **Polímeros**, v. 24, n. 5, 2014.

ROJAS-GRAÜ, M. A. et al. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**. v. 81, p. 634–641, 2007.

RUIZ-NAVAJAS, Y. et al. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. **Food Control**, v. 30, p. 386-392, 2013.

SEYDIM, C.; SARIKUS, G. Antimicrobial Activity of Whey Protein Based Edible Films Incorporated with Oregano, Rosemary and Garlic Essential Oils. **Food Research International**, 39, 639-644, 2006.

SIAN, N.K.; ISHAK, S. Effect of pH on yield, chemical composition and boiling resistance of soybean protein–lipid film. **Cereal Food World**. v. 35, p. 748–750, 1990.

SILVA, J. P. L. et al. Effects of oregano essential oil and nisin on growth of gram positive and gram negative foodborne pathogens. **INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR FOOD PROTECTION ANNUAL MEETING**, Baltimore, v. 92, 2005.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W; SANGUANDEEKUL, R. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 22–27, 2013.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1202-1205, 1996.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of beta-lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, v. 50, n. 3, p. 149–55, nov. 2001.

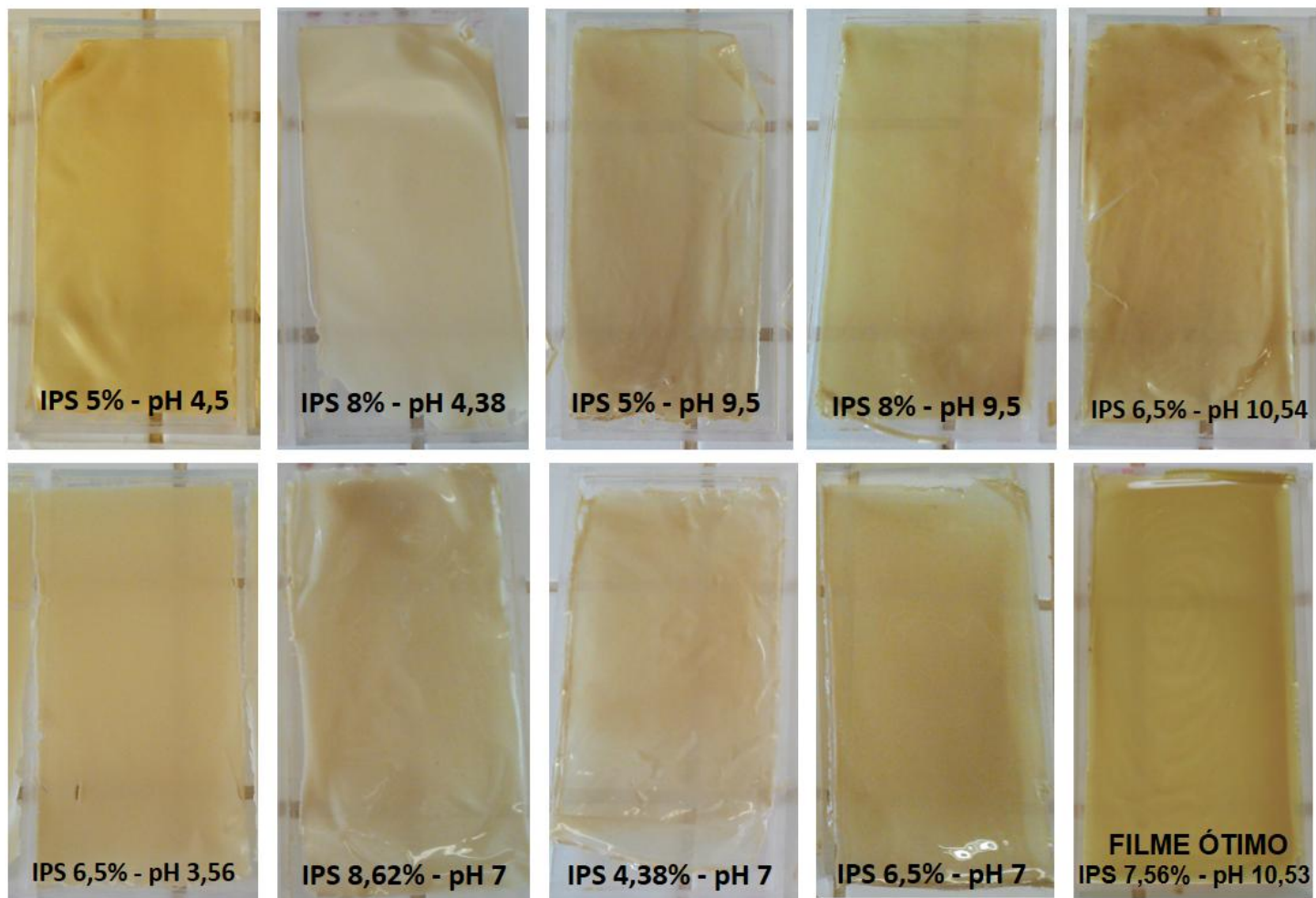
SWAIN, S. N.; BISWAL, S. M.; NANDA, P. K.; NAYAK, P. L. Biodegradable soy-based plastics: Opportunities and challenges. **Journal of Polymer Environment**, v. 12, p. 35–42, 2004

USDA United States Department of Agriculture. **WASDE-558-2**. Out. 2016.

VALENZUELA, C.; ABUGOCH, L.; TAPIA, C. Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 531-537, 2013.

VIUDA-MARTOS, M., EL GENDY, N. G. S., SENDRA, E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., EL-RAZIK, K. A. A., EL-SAYED, A. Chemical composition and antioxidant and anti-listeria activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9063-9070, 2010.

ZAHEDI, Y.; GHANBARZADEH, B.; SEDAGHAT, N. Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 102-108, 2010.

APÊNDICE A – Aparência dos filmes de IPS com diferentes pHs e o filme ótimo

APÊNDICE B – Desenvolvimento de *E. coli* e *S. aureus* durante 90 dias em contato com filmes controle (C), filme contendo óleo essencial de orégano (OEO) e filme contendo óleo essencial de orégano microencapsulado (OEOM)

