

INFLUÊNCIA DA NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE LIMÃO EM FILMES À BASE DE GELATINA

Juliana C. Nunes^a, Pamela Thais S. Melo^a, Fauze A. Aouada^{a,*} e Marcia R. de Moura^a^aDepartamento de Física e Química, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, 15385-000 Ilha Solteira – SP, Brasil

Recebido em 13/04/2018; aceito em 25/06/2018; publicado na web em 21/08/2018

INFLUENCE OF LEMON NANOEMULSION IN FILMS GELATIN-BASED. The development of films from natural polymers is an alternative to reduce the consumption of packaging obtained from non-renewable sources. The formation of edible films requires a polymeric material that forms a homogeneous and continuous matrix. The gelatin is a natural polymer, cheap and abundant, characteristics that instigate its use. The aim of this study was preparing and characterize gelatin films and evaluate the influence of lemon essential oil nanoemulsion on gelatin matrix for an innovative application of the product. The films were characterized for their water vapor permeability (WVP) test, contact angle, thickness and mechanical analysis (tensile strength and elongation at break). The particle size showed an average of 170.6 nm and zeta potential around -10.9 mV. The incorporation of lemon nanoemulsion increased the water vapor permeability of the gelatin and the elongation, but decreased tensile strength due to the interaction with the hydrophobic portion of the polymer matrix.

Keywords: gelatin; lemon essential oil; nanoemulsion.

INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por produtos saudáveis e ecologicamente corretos, assim como a preocupação com segurança alimentar e ambiental têm estimulado pesquisas de desenvolvimento de filmes a partir de biopolímeros.¹⁻³ Atualmente, grande parte das embalagens utilizadas são de fontes não-renováveis de energia, como o petróleo, e por levarem um longo tempo para se degradarem no ambiente, causam sérios problemas de acúmulo de resíduos.^{4,5}

Nesse contexto, é de grande interesse a busca pela substituição de embalagens convencionais por outras que sejam biodegradáveis e até mesmo comestíveis.^{2,6} Diversos são os materiais obtidos de recursos renováveis que possibilitam tais inovações. Entre eles, os mais utilizados para formação de filmes comestíveis são determinados polissacarídeos, proteínas e lipídeos.⁷

Em relação às proteínas, a gelatina tem se mostrado promissora para formação de filmes, além de ser abundante, ter baixo custo, excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade.⁸ Seu processamento é feito a partir da hidrólise controlada de colágeno fibroso insolúvel, extraído de ossos e peles de animais durante o abate.^{9,10} A gelatina é um biopolímero composto por sete aminoácidos diferentes, possui estrutura de tripla-hélice e temperatura de desnaturação proteica em torno de 40 °C.^{11,12}

Em geral, filmes comestíveis sintetizados a partir de proteínas possuem melhores propriedades mecânicas do que filmes de lipídeos e polissacarídeos.¹³ No entanto, devido à elevada natureza higroscópica e baixo ponto de fusão da gelatina a adição de outros componentes como, por exemplo, polissacarídeos, proteínas, lipídeos ou polímeros naturais geram filmes compostos que podem combinar vantagens e melhorias em suas propriedades.¹³⁻¹⁵ O óleo essencial de limão (*Citrus limon* L.) adicionado a um filme polimérico pode alterar determinadas características físicas e influenciar positivamente nas características sensoriais. Além disso, os terpenos presentes no óleo essencial de limão possuem atividade antimicrobiana e antifúngicas, e também há comprovação de sua eficácia na aromaterapia contra sintomas de náusea durante a gravidez.¹⁶⁻¹⁹

Considerando que o óleo essencial possui propriedades hidrofóbicas, ou seja, é imiscível em água, sua incorporação nos filmes é facilitada através da formação de uma emulsão, que se caracteriza por apresentar uma fase aquosa, uma fase oleosa e um agente tensoativo. As nanoemulsões possuem como vantagem o tamanho de partícula em escala nanométrica, o que pode aumentar a ação contra micro-organismos nos filmes e também melhorar suas propriedades físicas e químicas.²⁰

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da nanoemulsão de óleo essencial de limão dispersa em matriz polimérica de gelatina quanto às propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água para aplicação em embalagem de alimentos.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Gelatina em pó incolor de fonte comercial (Royal®). Óleo essencial de limão siciliano comercializado pela Ferquima (Vargem Grande Paulista – SP). Tween 80 obtido da Sigma-Aldrich.

Preparo da nanoemulsão

A nanoemulsão foi produzida pela adição de 1% (massa/volume) de óleo essencial de limão e 0,75% (massa/volume) de Tween 80 em 100 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi agitada em um homogeneizador T25 Ultra-Turrax® (IKA® Werke GmbH & Co, Staufen, Germany) em velocidade de 15000 rpm no tempo de 5 minutos. As suspensões foram avaliadas visualmente quanto à opalescência, homogeneidade, presença ou não de sedimentos e separação de fase após o repouso da solução.

Tamanho médio e potencial zeta das partículas nas nanoemulsões

As medidas da carga superficial e o tamanho médio das partículas presentes na nanoemulsão foram determinadas em triplicata na temperatura de 25 °C no equipamento Zetasier Nano Series (Malvern

*e-mail: fauze@dfq.feis.unesp.br

Instruments Ltd. Malvern, Worcestershire, U.K.), utilizando o princípio da difração de raio laser.

Preparo dos filmes

Os filmes foram produzidos pela técnica de “casting” através da hidratação de 5 g de gelatina em 100 mL de água na temperatura de 20 °C a 25 °C. Posteriormente, a mistura foi aquecida em agitador magnético até atingir 60 °C. No segundo tipo de filme a gelatina foi hidratada diretamente na nanoemulsão de óleo essencial de limão (5% massa/volume). Em seguida, 50 mL de cada solução filmogênica foram espalhados em um suporte retangular nas dimensões de 15 cm x 20 cm e secadas em temperatura ambiente (25 °C a 30 °C) por 24 horas.

Determinação das espessuras

As espessuras dos filmes foram medidas com um micrômetro digital (No. 7326, Mitutoyo Corp., Kanogawa, Japan) em cinco posições ao redor do filme. Os valores obtidos foram empregados para os cálculos de permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas.

Permeabilidade ao vapor de água (WVP)

Para determinação da permeabilidade ao vapor de água dos filmes utilizou-se o método adaptado da norma ASTM E96-8020²¹ descrito na literatura por McHugh *et al.*²² Os filmes foram cortados em formato circular com diâmetro de 6 cm e fixadas em cima de cinco células padronizadas de Teflon® contendo 6 mL de água destilada por meio de uma segunda placa parafusada. Em seguida, as placas foram mantidas a 25 °C em estufa contendo sílica gel para controle da umidade relativa interna. Determinou-se a quantidade de água permeada pelos filmes através de seis pesagens periódicas das células no intervalo de 25 horas. Os valores das massas foram usados para calcular a WVP.

Determinação do ângulo de contato

As análises do ângulo de contato (θ) dos filmes foram realizadas através de um medidor de ângulo de contato (KSV Instruments - Helsinki, Finlândia) para investigar as características superficiais hidrofílicas/hidrofóbicas dos filmes. Uma gota de água destilada com volume estimado de 5 a 7 μ L foi depositada na superfície de cada filme. Foram realizadas seis repetições a 25 °C.

Solubilidade dos filmes em água

A determinação da solubilidade dos filmes em água foi realizada de acordo com o método modificado por Gontard *et al.*²³ Primeiramente, três discos de 2 cm de diâmetro de cada amostra foram cortados e secos em estufa a 100 °C por 24 horas e pesados em balança analítica para a determinação da porcentagem inicial de matéria seca. Em seguida, as amostras foram imersas em 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação lenta constante em temperatura ambiente por 24 horas.

Posteriormente, filtrou-se as soluções e as amostras retidas foram secas novamente em estufa a 100 °C por 24 horas e pesadas para determinação da quantidade de matéria seca não solubilizada. Calculou-se a massa do filme que solubilizou em água com base na equação 1 abaixo:

$$\% MS = \frac{mi - mf}{mi} \times 100 \quad (1)$$

em que % MS é a porcentagem de material solubilizado, *mi* é o peso inicial do material seco e *mf* é o peso final do material seco não solubilizado.

Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas pelos testes de tensão x deformação sob tração, de acordo com o método ASTM D882-97.²⁴ O equipamento utilizado para a análise foi o Instron Universal Testing Machine (Modelo 3369, Instron Corp., Canton, Mass., U.S.A.), a uma velocidade de tracionamento de 10 mm por minuto e célula de carga de 100 N. Os filmes foram acondicionados a 25 °C em ambiente com 30% de umidade durante 24 horas antes dos testes. Pelos menos oito amostras de cada filme nas dimensões de (100 mm comprimento x 13 mm largura) foram cortadas e analisadas.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os filmes foram analisados utilizando um microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss (Alemanha) modelo Philips XL 30 FEG, da Embrapa Instrumentação de São Carlos. Para análise das fraturas criogênicas utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV), da marca Zeiss (EVO LS15), da UNESP campus de Ilha Solteira, operando com voltagem de 5,00 kV a 10,00 kV. Uma fina camada de ouro foi depositada sobre as amostras utilizando um *Sputter Coater*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma nanoemulsão óleo em água (O/A) consiste em gotículas de óleo com tamanho médio de 20 a 200 nm dispersas em meio aquoso por um tensoativo. A nanoemulsão obtida apresentou tamanho médio de partícula de 170,6 nm \pm 0,5 nm e mostrou-se visualmente opalescente, sem separação de fase e precipitação após a preparação, características similares a outros estudos publicados.^{25,26}

A nanoemulsão apresentou potencial zeta de, aproximadamente, -10,9 \pm 0,1 mV. De modo geral, a carga elétrica das gotículas de óleo é direcionada pela carga de tensoativos adsorvidos ao seu redor, que podem ser de natureza catiônica, aniônica ou não iônica. Neste estudo utilizou-se um tensoativo não iônico (Tween 80), o que leva a se esperar uma carga elétrica próxima a zero. Quando o valor é suficientemente elevado, as gotículas são impedidas de se agregarem devido à repulsão eletrostática entre elas.²⁶

Os filmes formados foram analisados subjetivamente, apresentando boa homogeneidade (coloração uniforme e ausência de partículas insolúveis, a olho nu), continuidade (ausência de fraturas após a secagem) e maneabilidade (capacidade de manipulação dos filmes).²⁷ Além disso, os filmes contendo óleo essencial de limão apresentaram características sensoriais desejáveis, como cor e odor, mesmo após determinado tempo de estocagem.

A adição do óleo essencial de limão à rede polimérica de gelatina refletiu em um aumento da espessura média do filme, conforme Tabela 1. Esses resultados sugerem que, com a adição do óleo, há um aumento da hidrofobicidade, o que pode dificultar com que as cadeias peptídicas de gelatina formem uma estrutura compacta, contribuindo para formação de uma matriz com espessura maior.^{9,15}

Ainda na Tabela 1 observa-se que ocorreu um aumento da permeabilidade ao vapor de água (WVP) dos filmes de gelatina com nanoemulsão de óleo essencial de limão em comparação aos filmes de gelatina pura. Demais estudos têm relatado que, para filmes contendo óleo essencial, o valor de WVP está relacionado ao tipo de relação hidrófilo-hidrófobo dos componentes presente. O óleo

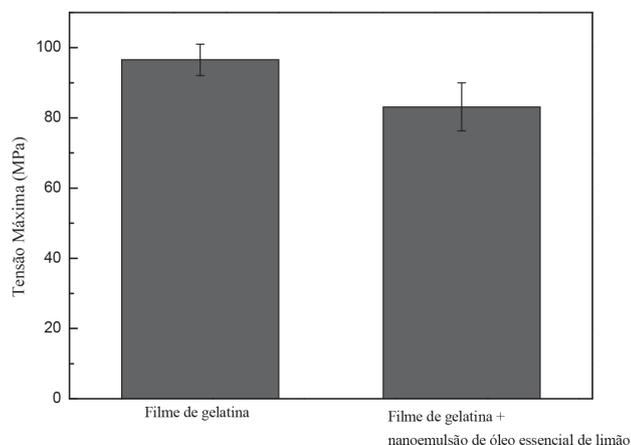
Tabela 1. Espessura média dos filmes, valores de permeabilidade ao vapor de água, ângulo de contato e volume das gotas no teste de ângulo de contato

Filmes	Espessura média (mm)	WVP (g mm/kPa h m ²)	Ângulo de contato inicial (t = 0s)	Volume médio das gotas (μL)
Gelatina pura	0,03 ± 0,01	0,15 ± 0,01	85 ± 4°	6 ± 1
Gelatina + nanoemulsão de óleo essencial de limão	0,03 ± 0,03	0,26 ± 0,02	50 ± 1°	6 ± 1

essencial de limão localizado entre as cadeias peptídicas adjacentes age como um plastificante, dificultando a interação entre as cadeias de gelatina através da diminuição das suas forças intermoleculares, o que aumenta o volume livre do sistema, favorecendo a mobilidade das cadeias da matriz e a passagem de moléculas de água, resultado que pode ser favorável dependendo da aplicação.^{16,26}

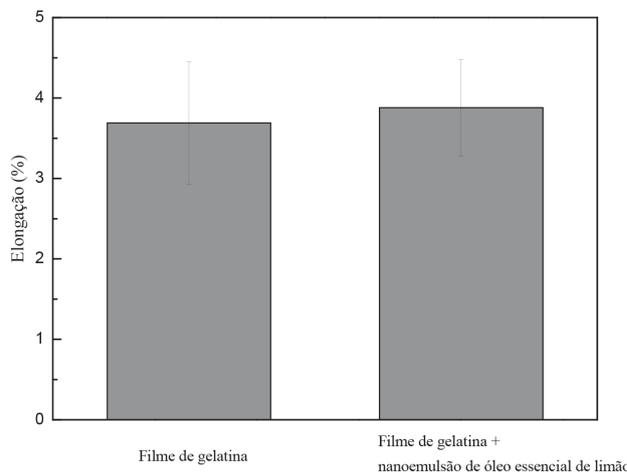
A natureza hidrofílica/hidrofóbica dos filmes foi avaliada através das medidas do ângulo de contato. Para o filme de gelatina pura o ângulo de contato inicial (t = 0 s) da superfície foi de 85 ± 4° e diminuiu para 50 ± 1° com a adição de 1% de óleo essencial de limão, conforme Tabela 1. Se os valores do ângulo de contato entre o material e a gotícula de água são inferiores a 90° a superfície é hidrofílica, valores superiores a 90° indicam uma superfície hidrofóbica.²⁶ Desta forma, a adição da nanoemulsão de óleo essencial de limão aumentou a hidrofobicidade do filme de gelatina, característica observada no teste de permeabilidade ao vapor de água. Córdoba e Sobral²⁸ desenvolveram filmes de gelatina com quitosana e óleo essencial de alho e também observaram que com a adição da nanoemulsão os valores do ângulo de contato e de WVP dos filmes foram menores.

A adição de nanoemulsão em uma matriz polimérica também pode influenciar nas propriedades mecânicas. A tensão (σ) máxima na ruptura e a elongação (%) dos filmes com e sem a nanoemulsão são descritas na Figura 1 e 2, respectivamente.

**Figura 1.** Diferentes valores de tensão máxima na ruptura dos filmes de gelatina e gelatina com nanoemulsão de óleo essencial de limão

Foi possível observar que a incorporação da nanoemulsão de óleo essencial de limão na matriz de gelatina diminuiu o valor de tensão e aumentou o de elongação. Esse comportamento pode ser atribuído à capacidade de o óleo essencial de limão interagir com a matriz do biopolímero, acarretando uma heterogeneidade ao filme por reduzirem a interação cadeia-cadeia e aumentarem a interação cadeia-nanoemulsão, provocando descontinuidade e diminuindo sua coesão, resultados que vão de encontro com os valores obtidos no teste de permeabilidade ao vapor de água. Além disso, o aumento da elongação de determinados filmes e a melhora da sua tenacidade são características interessantes dentro da área de embalagens.^{6,28-33}

Na Figura 3-A observa-se que o filme controle (FG) possui uma superfície compacta, lisa e homogênea sem estrutura granulada e

**Figura 2.** Valores de elongação dos filmes de gelatina e gelatina com nanoemulsão de óleo essencial de limão

porosa, sem a presença de separações de fase, sugerindo que uma matriz mais ordenada foi formada. Nos filmes elaborados com a nanoemulsão de óleo essencial de limão (Figura 3-B) também não foi observada a separação da fase oleosa. Entretanto, foi possível notar superfícies relativamente mais rugosas e mais heterogêneas.²⁶ Tais modificações na microestrutura dos filmes após a adição da nanoemulsão podem ter ocorrido devido às mudanças nos arranjos das moléculas de proteína durante a formação do filme, uma vez que as composições das soluções poliméricas são diferentes, além de se tratar da incorporação de um material de caráter hidrofóbico em uma matriz hidrofílica. A presença de gotículas de óleo na matriz polimérica também pode estar causando uma menor interação proteína-proteína entre as cadeias, dificultando, dessa forma, o seu alinhamento ordenado.^{30,34}

Nas imagens de MEV de fratura, Figura 4, também foi possível notar uma diferença significativa na microestrutura dos filmes quando na presença da nanoemulsão. Além da aparência mais irregular, foi possível verificar a ocorrência de poros nos filmes nanoestruturados. Tais resultados corroboram com os de propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água, visto que matrizes contendo nanoemulsão de óleo essencial de limão apresentaram decréscimo da tensão máxima na ruptura e diminuição nos valores de WVP. Isso pode estar relacionado com uma menor compactação da matriz pela existência de poros, o que a torna mais susceptível à passagem de vapores de água e uma menor resistência quando tracionada.

CONCLUSÃO

Obeve-se boa compatibilidade entre a matriz polimérica de gelatina com o óleo essencial de limão, com melhora das propriedades sensoriais subjetivas. As partículas formadas na emulsão apresentaram tamanho satisfatório dentro da escala nanométrica. Com a análise de WVP, observou-se que a presença do óleo essencial de limão aumentou a permeabilidade ao vapor de água e a elongação do filme e diminuiu a tensão máxima na ruptura de 94 ± 5 MPa para 82 ± 6 MPa, sendo ainda um valor elevado de tensão comparado a outros filmes de polímeros naturais.

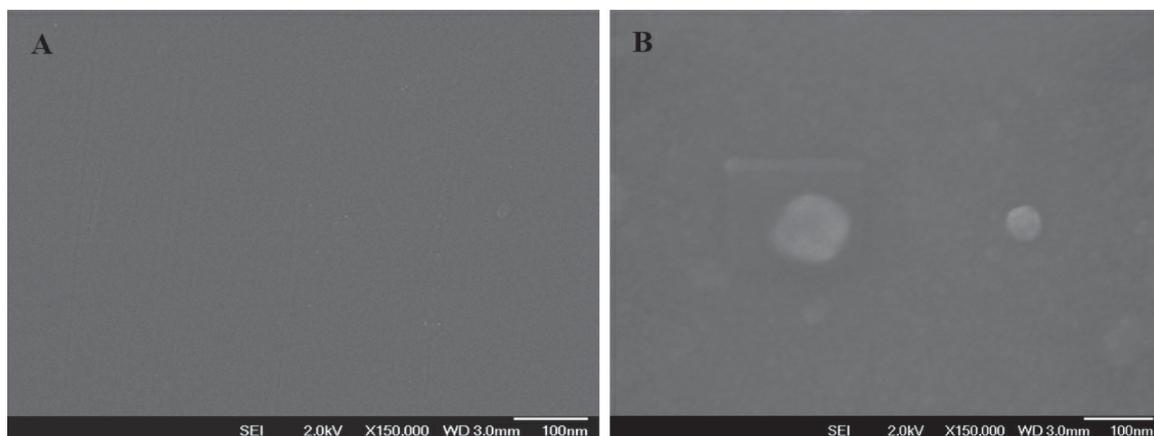


Figura 3. A - Micrografia obtida por MEV da superfície do filme de gelatina. B - Micrografia obtida por MEV da superfície do filme de gelatina com nanoemulsão de óleo essencial de limão. As micrografias possuem magnificação de 150000 X

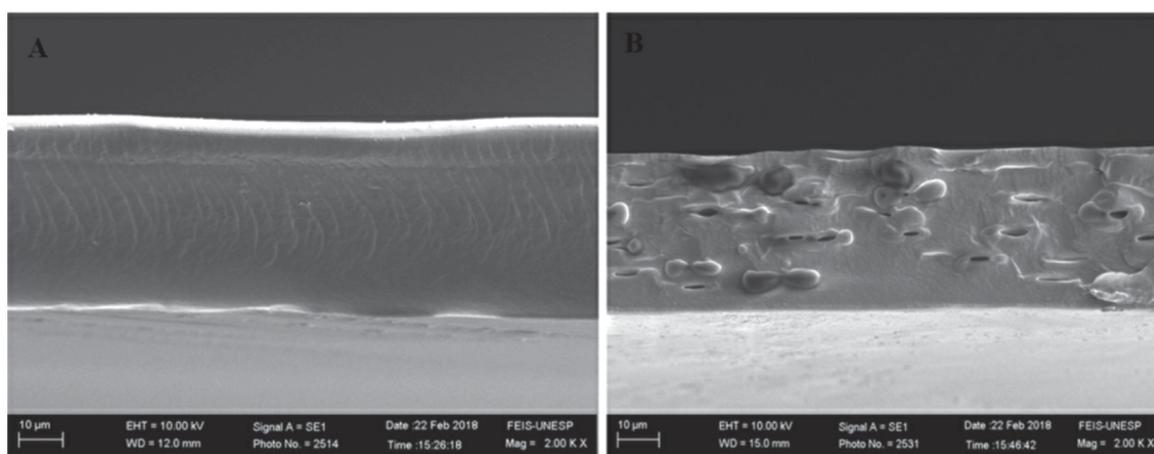


Figura 4. A - Micrografia de fratura obtida por MEV do filme de gelatina. B - Micrografia de fratura obtida por MEV do filme de gelatina com nanoemulsão de óleo essencial de limão. As micrografias possuem magnificação de 2000 X

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CNPq, UNESP, CAPES, FAPESP e EMBRAPA.

REFERÊNCIAS

- Santos, T. M.; Souza Filho, M. de Sá M.; Caceres, C. A.; Rosa, M. F.; Morais, J. P. S.; Pinto, A. M. B.; Azeredo, H. M. C.; *Food Hydrocolloids* **2014**, *41*, 113.
- Mohajer, S.; Rezaei, M.; Hosseini, S. F.; *Carbohydr. Polym.* **2017**, *157*, 784.
- De Moura, M. R.; Aouada, F. A.; Avena-Bustillos, R. J.; McHugh, T. H.; Krochta, J. M.; Mattoso, L. H. C.; *J. Food Eng.* **2009**, *92*, 448.
- Hong, Y. H.; Lim, G. O.; Song, K. B.; *J. Food Sci.* **2009**, *74*, 6.
- Otoni, C.; De Moura, M. R.; Aouada, F. A.; Camilloto, G. P.; Cruz, R. S.; Lorevice, M. V.; Soares, N. de F. F.; Mattoso, L. H. C.; *Food Hydrocolloids* **2014**, *41*, 188.
- Martucci, J. F.; Gende, L. B.; Neira, L. M.; Ruseckaite, R. A.; *Ind. Crops Prod.* **2015**, *71*, 205.
- Etxabide, A.; Uranga, J.; Guerrero, P.; de la Caba, K.; *Food Hydrocolloids* **2017**, *68*, 192.
- Tulamandi, S.; Rangarajan, V.; Rizvi, S. S. H.; Singhal, R. S.; Chattopadhyay, S. Kr.; Saha, N. C.; *Food Packaging and Shelf Life* **2016**, *10*, 60.
- Ahmad, M.; Benjakul, S.; Prodpran, T.; Agustini, W.; *Food Hydrocolloids* **2012**, *28*, 189.
- Steyaert, I.; Rahier, H.; Vlierberghe, S. V.; Olijve, J.; De Clerck, K.; *Food Hydrocolloids* **2016**, *57*, 200.
- Chen, X.; Jia, Y.; Feng, L.; Sun, S.; An, L.; *Polymer* **2009**, *50*, 2181.
- Ahsan, S. M.; Rao, M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *95*, 1126.
- Alparslan, Y.; Yapici, H. H.; Metin, C.; Baygar, T.; Günlü, A.; Baygar, T.; *LWT -- Food Sci. Technol.* **2016**, *72*, 457.
- Guerrero, P.; Nur Hanani, Z. A.; Kerry, J. P.; de la Caba, K.; *J. Food Eng.* **2011**, *107*, 41.
- Kumari, M.; Mahajan, H.; Joshi, R.; Gupta, M.; *Food Packaging and Shelf Life* **2017**, *12*, 42.
- Cozmuta, A. M.; Turila, A.; Apjok, R.; Ciocian, A.; Cozmuta, L. M.; Peter, A.; Nicula, C.; Galić, N.; Benkovi, T.; *Food Hydrocolloids* **2015**, *49*, 144.
- Kavoosi, G.; Rahmatollahi, A.; Dadfar, S. M. M.; Purfard, A. M.; *Food Sci. Technol.* **2014**, *57*, 556.
- Al-Jabri, N. N.; Hossain, M. A.; *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* **2014**, *3*, 247.
- Kia, P. Y.; Safajou, F.; Shahnaazi, M.; Nazemiyeh, H.; *Iranian Red Crescent Medical Journal* **2014**, *16*, 1.
- Ahmad, N.; Ramsch, R.; Llinàs, M.; Solans, C.; Hashim, R.; Tajuddin, H. A.; *Colloids Surf., B* **2014**, *115*, 267.
- ASTM Standard test method for water vapor transmission of materials, 1980. E96-80. In: Annual Book of American Standard Testing Methods. Philadelphia, USA, PA: ASTM.
- McHugh, T. H.; Avena-Bustillos, R.; Krochta, R. J.; *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 899.
- Gontard, N.; Ducheze, C.; Cuq, J. L.; Guilbert, S.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **1994**, *29*, 39.

24. ASTM *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*, **1997**. D882-97. In Annual Book of American Standard Testing Methods. Philadelphia, USA, PA: ASTM.
25. Donsì, F.; Ferrari, G.; *J. Biotechnol.* **2016**, *233*, 106.
26. Acevedo-Fani, A.; Salvia-Trujillo, L.; Rojas-Graü, M. A.; Martín-Belloso, O.; *Food Hydrocolloids* **2015**, *47*, 168.
27. Monterrey, E. S.; Sobral, P. J.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **1999**, *19*, 294.
28. Dammak, I.; Carvalho, R. A. De.; Trindade, C. S. F.; Lourenço, R. V.; Sobral, P. J. A.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *98*, 39.
29. Yu, Y.; Zhu, H.; Frantz, J. M.; Reding, M. E.; Chan, K. C.; Ozkan, H. E.; *Biosyst. Eng.* **2009** *104*, 324.
30. Córdoba, L. J. P.; Sobral, P. J. A.; *J. Food Eng.* **2017**, *213*, 47.
31. Tongnuanchan, P.; Benjakul, S.; Prodpran, T.; Pisuchpen, S.; Osako, K.; *Food Hydrocolloids* **2016**, *56*, 93.
32. Ma, W.; Tang, C. H.; Yin, S. W.; Yang, X. Q.; Wang, Q.; Liu, F.; Wei, Z. H.; *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 572.
33. Acosta, S.; Chiralt, A.; Santamarina, P.; Rosello, J.; Gonzalez-Martínez, C.; Cháfer, M.; *Food Hydrocolloids* **2016**, *61*, 233.
34. Pérez-Mateos, M.; Montero, P.; Gómez-Guillén, M. C.; *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 53.