



LAÍS BRUNO NORCINO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE PECTINA
CONTENDO NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE COPAÍBA
OBTIDOS POR *CASTING* CONTÍNUO**

**LAVRAS – MG
2018**

LAÍS BRUNO NORCINO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE PECTINA CONTENDO NANOEMULSÕES
DE ÓLEO DE COPAÍBA OBTIDOS POR *CASTING* CONTÍNUO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Produtos e Nanoprodutos Alimentícios, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Juliano Elvis de Oliveira

**LAVRAS – MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Norcino, Laís Bruno.

Desenvolvimento de filmes de pectina contendo nanoemulsões de óleo de copaíba obtidos por *casting* contínuo : / Laís Bruno Norcino. - 2018.

71 p.

Orientador(a): Juliano Elvis de Oliveira.

.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *casting* contínuo. 2. nanoemulsão. 3. biodegradação. I. Oliveira, Juliano Elvis de. . II. Título.

LAÍS BRUNO NORCINO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE PECTINA CONTENDO NANOEMULSÕES
DE ÓLEO DE COPAÍBA OBTIDOS POR *CASTING* CONTÍNUO**

**DEVELOPMENT OF PECTIN FILMS CONTAINING NANOEMULSIONS OF
COPAÍBA OIL OBTAINED BY CONTINUOUS CASTING**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Produtos e Nanoprodutos Alimentícios, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de julho de 2018.

Dr. Juliano Elvis de Oliveira - UFLA

Dr. Diego Alvarenga Botrel - UFLA

Dr. Caio Gomide Otoni - UNICAMP

Orientador
Dr. Juliano Elvis de Oliveira

**LAVRAS – MG
2018**

Aos meus pais, Claudio e Vera, pelo amor em seu pleno significado; à minha querida irmã Adriana, pela amizade e companheirismo; à minha avó Dalva (*in memoriam*), por todo carinho; ao meu namorado Daniel, por todo suporte e paciência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e confiar tarefas na certeza de que seria capaz de realizá-las, me permitindo viver este momento tão especial e sonhado.

Aos meus pais, Vera e Claudio, pelo exemplo de dedicação e honestidade, imensurável incentivo e por todo amor e motivação.

À minha irmã Adriana, por ter sido minha inspiração, me encorajando e não permitindo que eu desistisse dos meus objetivos, sempre me confortando com suas sábias palavras.

À minha avó Dalva (*in memoriam*) que me iluminou e me deu forças para continuar nesta caminhada.

Aos meus tios, Italo e Miguel pelo carinho e torcida.

Ao meu namorado Daniel, pelo incentivo e amor, e que muito me ensinou com as suas experiências de vida.

A minha colega, Juliana Farinassi, por todas as risadas, companheirismo e troca de informações e que muito me ajudou na realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira, por toda a sua paciência, disponibilidade e ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional.

Ao Prof. Luiz Henrique Capparelli Mattoso pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu grupo de pesquisa, respeito e ensinamentos transmitidos.

À banca, Dr. Caio Otoni e Prof. Diego Botrel, pela disponibilidade e sugestões enriquecedoras para este trabalho.

À todos os colaboradores da Embrapa Instrumentação. Em especial aos colegas, Adriana Thomazi, Alice Raabe, Silviane Zanni, Viviane Soares e Anny Manrich, pela ajuda nas caracterizações.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia de Biomateriais, por ter me proporcionado não somente a oportunidade de aprendizado, mas também pelo crescimento pessoal e profissional. Em especial ao coordenador Rafael Farinassi Mendes e a secretária Flávia Castello Branco.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho e torceram pelo seu sucesso.

“Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade.”

Dalai Lama

RESUMO

O desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos tem ganhado extrema relevância devido ao potencial de aplicação destes materiais nos setores alimentício e também por questões de sustentabilidade e proteção ambiental. O presente trabalho teve como objetivo a preparação de plásticos biodegradáveis de pectina incorporados com óleo de copaíba para uso como embalagem ativa. Os filmes foram preparados com diferentes concentrações de óleo de copaíba na matriz de pectina por *casting* contínuo, uma técnica emergente de produção de filmes poliméricos. As nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho médio e distribuição de partículas e potencial zeta, enquanto os filmes biopoliméricos foram avaliados por análise térmica (TG), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ensaios uniaxiais de tração, atividade antimicrobiana e biodegradação. Foi observado o aumento do diâmetro médio das gotículas em função da concentração e do tempo de armazenamento. Os resultados de potencial zeta revelaram que as nanoemulsões no tempo zero apresentaram-se estáveis. Após 72 horas de armazenamento, foi observada uma diminuição no potencial zeta. O estudo da morfologia mostrou que os biopolímeros puros possuem microestrutura homogênea e compacta enquanto os com adição de óleo de copaíba tiveram um aumento na rugosidade à medida que a concentração de óleo aumentou. Os espectros na região do infravermelho dos biopolímeros com óleo de copaíba foram similares ao filme de pectina puro. Os resultados das caracterizações mecânicas evidenciaram que a incorporação do óleo de copaíba, resultou na diminuição gradativa do módulo de elasticidade e resistência à tração enquanto aumentou o alongamento na ruptura. Foi observado efeito bacteriostático nos filmes contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os compostos livres do óleo de copaíba inibiram o crescimento microbiano, diminuindo a evolução de CO₂ no processo de biodegradação. Os resultados deste trabalho evidenciaram o potencial do *casting* contínuo para a produção de biopolímeros de pectina incorporados com óleo de copaíba e, levando, portanto, ao desenvolvimento de materiais multifuncionais ecologicamente corretos e conseqüentemente como uma alternativa para embalagens ativas.

Palavras-chave: Embalagem ativa, Óleo de copaíba, *Casting* contínuo, Nanoemulsão, Biodegradação.

ABSTRACT

The development of active biodegradable films has gained extreme relevance due to the potential of applying these materials in the food sectors and also for sustainability and environmental protection issues. The present work had as its objective the preparation of biodegradable pectin plastics incorporated with copaiba oil for use as active packaging. The films were prepared with different concentrations of copaiba oil in the pectin matrix by continuous casting, an emerging polymer film production technique. The nanoemulsions were characterized for medium size and particle distribution and zeta potential, while the biopolymer films were evaluated by thermal analysis (TG), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), uniaxial traction tests, antimicrobial activity and biodegradation. The increase in mean droplet diameter as a function of concentration and storage time was observed. The zeta potential results revealed that nanoemulsions at time zero were stable. After 72 hours of storage, a decrease in zeta potential was observed. The study of the morphology showed that the pure biopolymers have homogeneous and compact microstructure whereas those with copaiba oil addition had an increase in the roughness as the concentration of oil increased. The spectra of the biopolymers with copaiba oil were similar to the pure pectin film. The results of the mechanical characterization evidenced that the incorporation of the copaiba oil resulted in the gradual decrease of elastic modulus and tensile strength, while increasing the elongation at break. A bacteriostatic effect was observed in the films against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The free compounds of copaiba oil inhibited microbial growth, decreasing the evolution of CO₂ in the biodegradation process. The results of this work evidenced the potential of continuous *casting* for the production of pectin biopolymers incorporated with copaiba oil and thus leading to the development of ecologically correct multifunctional materials and consequently, as an alternative for active packaging.

Key words: Active packaging, Copaiba oil, Continuous casting, Nanoemulsion, Biodegradation.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Capacidade de produção global de materiais bioplásticos em 2016.....	17
Figura 2 - Produção mundial de materiais bioplásticos em 2016 e projeção para 2021	18
Figura 3 - Capacidade de produção mundial de materiais plásticos (por tipo) em 2016 e projeção para 2021	19
Figura 4 - Classificação dos polímeros biodegradáveis: (a) origem agrícola, (b) origem microbiológica, (c) origem biotecnológica e (d) origem petroquímica.....	23
Figura 5 - Esquema geral para a estrutura molecular da pectina com destaque para o poli(ácido galacturônico), seu maior constituinte.....	23
Figura 6 - (a) Emulsão concentrada de óleo em água onde as gotículas de óleo são dispersas dentro de uma fase aquosa contínua e (b) emulsão concentrada de água em óleo onde as gotículas de água são dispersas dentro de uma fase oleosa contínua	27
Figura 7 - Árvores de copaíba	30
Figura 8 - Principais sesquiterpenos e diterpenos presentes no óleo-resina de copaíba.....	31
Figura 9 - Representação do modo de extração direto do óleo de copaíba	32
Figura 10 - Representação esquemática da produção de filmes pela técnica de <i>casting</i> clássica	34
Figura 11 - Representação esquemática da produção de filmes pela técnica de casting contínuo	35

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Figure 1 - Thermogravimetric curves of copaiba oil and the biopolymers.....	54
Figure 2 - FTIR spectra collected in transmittance mode for copaiba oil and pectin biopolymers	56
Figure 3 - Surface micrographies and bipolymer fractures (a) and (b) Neat; (c) and (d) CP1%; (e) and (f) CP3%; (g) and (h) CP6%	58
Figure 4 - Representative stress-strain curves of pectin biopolymers with different concentrations of copaiba oil.....	60
Figure 5 - Antibacterial test done in Petri dishes with pectin/copaiba oil biopolymers.....	62
Figure 6 - Cumulative CO ₂ production during 28 days of incubation in soil.....	63

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Table 1 Droplet sizes, zeta potential and polydispersity index of copaiba aqueous nanoemulsions	52
Table 2 Elastic modulus (E), elongation at break (ϵ_B) and tensile strength (σ_T) of the pectin biopolymers and with copaiba oil in concentrations of 1, 3 and 6 wt.%	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com canhão de emissão de campo
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
ABRELPE	Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais
Pectin/Pure	Amostra de pectina pura, controle
CP1%	Amostra com 1% de óleo de copaíba
CP3%	Amostra com 3% de óleo de copaíba
CP6%	Amostra com 6% de óleo de copaíba
E	Módulo elástico
σ_T	Resistência à tração real
ϵ_B	Alongamento na ruptura
σ	Tensão

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Panorama da produção de plásticos	16
2.2 Polímeros biodegradáveis	20
2.3 Pectina	23
2.4 Embalagens multifuncionais	25
2.5 Nanotecnologia e nanoemulsões	26
2.6 Óleo de copaíba	29
2.7 Técnicas de processamento de biopolímeros	33
3 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	37
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	43
ARTICLE 1 - Pectin-based films containing copaiba oil nanoemulsions obtained by continuous casting	44

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Polímeros biodegradáveis vêm ganhando destaque devido ao potencial de aplicação destes materiais nos diversos setores industriais e também por questões de sustentabilidade e proteção ambiental. Apresentam grandes vantagens devido à biodegradabilidade, biocompatibilidade e por serem obtidos a partir de fontes renováveis como, por exemplo, os polissacarídeos (ARFAT et al., 2014; MÜLLER et al., 2011; ORTEGA-TORO et al., 2014).

As pectinas são polissacarídeos aniônicos, amorfos, atóxicos e facilmente solubilizados em água. A composição química das pectinas é majoritariamente definida por cadeias helicoidais de poli[α -(1 \rightarrow 4)-D-ácido galacturônico] ou homogalacturonana (HG) (WILLATS et al., 2006). As maiores fontes de pectinas são os resíduos do processamento de frutas cítricas, cana-de-açúcar e maçã. Segundo o novo relatório do Grupo IMARC, intitulado “Pectin Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2017- 2022”, o mercado global de pectinas atingiu um volume de aproximadamente 103 mil toneladas em 2016. Espera-se que o mercado mundial de pectinas atinja um volume de cerca de 144 mil toneladas até 2022 (IMARC, 2016). Além disso, as pectinas são conhecidas por sua excelente capacidade filmogênica e potencial aplicação em embalagens bioativas (PÉREZ-ESPITIA et al., 2014).

Embalagens multifuncionais compreendem um grupo emergente de sistemas de embalagens que apresentam mais de duas funções além daquelas apresentadas por uma embalagem convencional (contenção, proteção, conveniência e comunicação). Incluso neste conceito, pode-se citar as embalagens ativas. As embalagens ativas têm ganhado destaque na engenharia de alimentos por assegurar qualidade e segurança extra aos produtos alimentícios. Através da incorporação de agentes ativos, tais como, substâncias antioxidantes, aromatizantes, antimicrobianas, absorvedoras de oxigênio e de etileno, e pela interação entre a embalagem e o alimento, visando retardar a taxa de deterioração do alimento ou estender a sua vida de prateleira (SANTIAGO-SILVA et al., 2009).

O óleo de copaíba é uma alternativa promissora para a confecção de filmes ativos. É uma óleo-resina extraída diretamente do tronco de sua árvore e sua cor pode variar de amarelo ouro a marrom, dependendo da espécie. A copaíba é nativa das regiões tropicais e, no Brasil, é

facilmente encontrada nas regiões Amazônica e Central (VEIGA et al., 2002). Seu óleo possui inúmeras propriedades importantes, tais como analgésica, antiparasitária, anti-inflamatório, larvicida, expectorante, atividade diurética e antibacteriana (BONAN et al., 2015; GELMINI et al., 2013; PACHECO et al., 2006; SANTO et al., 2008; TRINDADE et al., 2013).

Os bioativos presentes em maior quantidade no óleo são os sesquiterpenos e diterpenos. Por ser um produto natural torna-se atraente para utilização na indústria alimentícia visto que os consumidores procuram por alternativas mais saudáveis em substituição aos aditivos sintéticos utilizados convencionalmente. Além disso, o óleo de copaíba é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) desde 1972, sendo adequado para contato com alimentos (VEIGA et al., 2002).

Diante do exposto até aqui, o desenvolvimento de novos materiais baseados em polímeros biodegradáveis é uma alternativa a superdependência da sociedade aos produtos derivados do petróleo para a fabricação de embalagens. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de filmes biodegradáveis de pectina incorporados com nanoemulsões de óleo de copaíba visando uma futura aplicação na indústria alimentícia como embalagem ativa. Os biopolímeros foram produzidos por *casting* contínuo, uma técnica emergente de processamento de filmes biodegradáveis. Pretendeu-se estudar as interações que ocorreram entre as partículas de nanoemulsões e a matriz de pectina e como isso influenciou nas propriedades mecânicas, morfológicas e na biodegradação dos biopolímeros.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Panorama da produção de plásticos

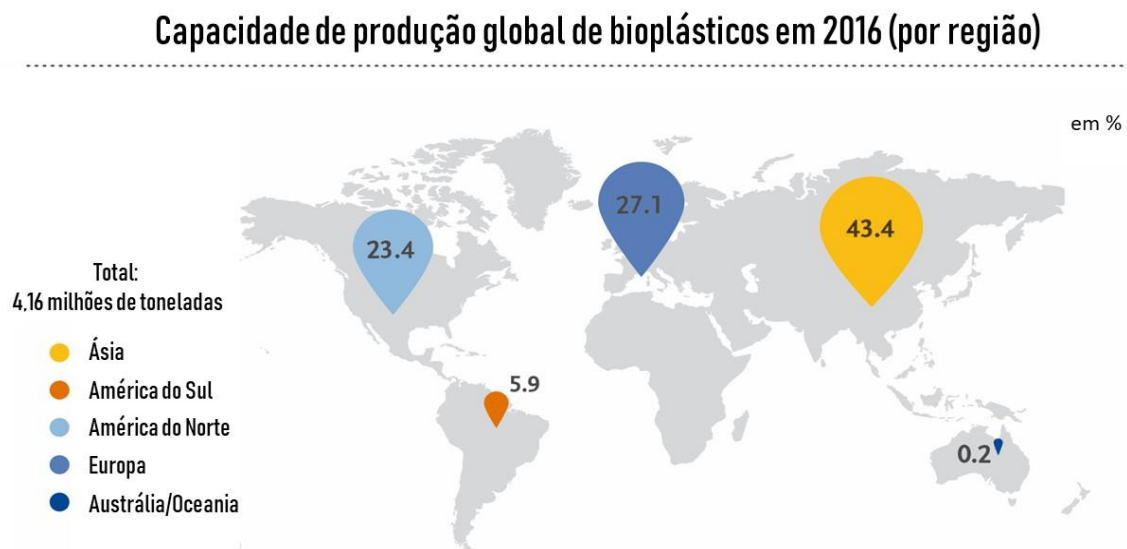
Nos últimos anos, a preocupação mundial com a redução da quantidade de materiais plásticos não biodegradáveis descartada no meio ambiente vem impulsionando o desenvolvimento de materiais ecologicamente mais corretos (SWAIN et al., 2004). Os plásticos convencionais, fabricados a partir de combustíveis fósseis, como o petróleo, se degradam lentamente no meio ambiente devido à sua resistência contra fatores externos como oxigênio, calor e radiação UV, bem como à ação microbiológica. Com isto, acarretam diversos problemas ambientais, como a degradação visual de paisagens urbanas, poluição de solos, rios e oceanos (ARVANITTOYANNIS et al., 1998).

No Brasil, devido aos desenvolvimentos industrial e populacional desordenados estes problemas se agravaram ainda mais. Dados estatísticos mostram que são despejadas aproximadamente 219 mil toneladas diárias de resíduos sólidos urbanos no meio ambiente, dos quais, em média, 13,5% são plásticos não biodegradáveis (ABRELPE, 2015).

Os bioplásticos compreendem uma grande família de materiais com diferentes propriedades e aplicações. De acordo com a European Bioplastics (2016), um material plástico é considerado um bioplástico se for bio-baseado, biodegradável ou apresentar ambas as propriedades. O termo "bio-baseado" significa que o material plástico ou produto é totalmente ou parcialmente derivado da biomassa proveniente de fontes como o milho, cana-de-açúcar ou celulose (EUROPEAN BIOPLASTICS, 2016).

Segundo dados da European Bioplastics (2016), a capacidade global de produção de bioplásticos em 2016 foi cerca de 4,16 milhões de toneladas (FIGURA 1).

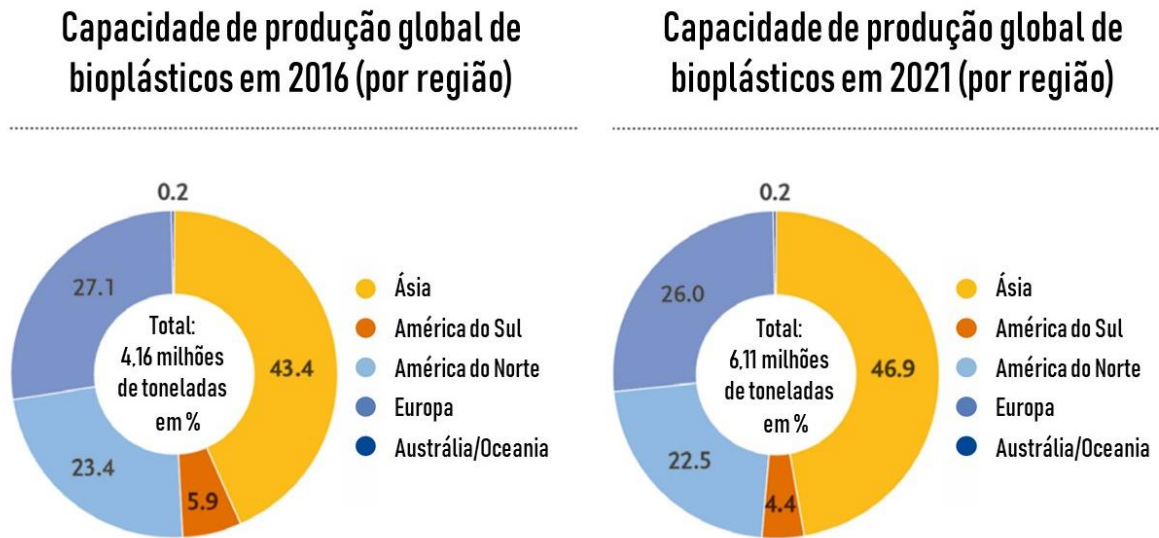
Figura 1 - Capacidade de produção global de materiais bioplásticos em 2016



Fonte: Adaptado de European Bioplastics (2016)

À medida que a demanda está aumentando e com materiais, aplicações e produtos mais sofisticados, o mercado está crescendo cerca de 20 a 100% anualmente. Segundo projeções da European Bioplastics (2016), a médio prazo, a capacidade de produção global de bioplásticos deverá crescer em 50%, passando de cerca de 4,2 milhões de toneladas em 2016 para aproximadamente 6,1 milhões de toneladas em 2021 (FIGURA 2).

Figura 2 - Produção mundial de materiais bioplásticos em 2016 e projeção para 2021



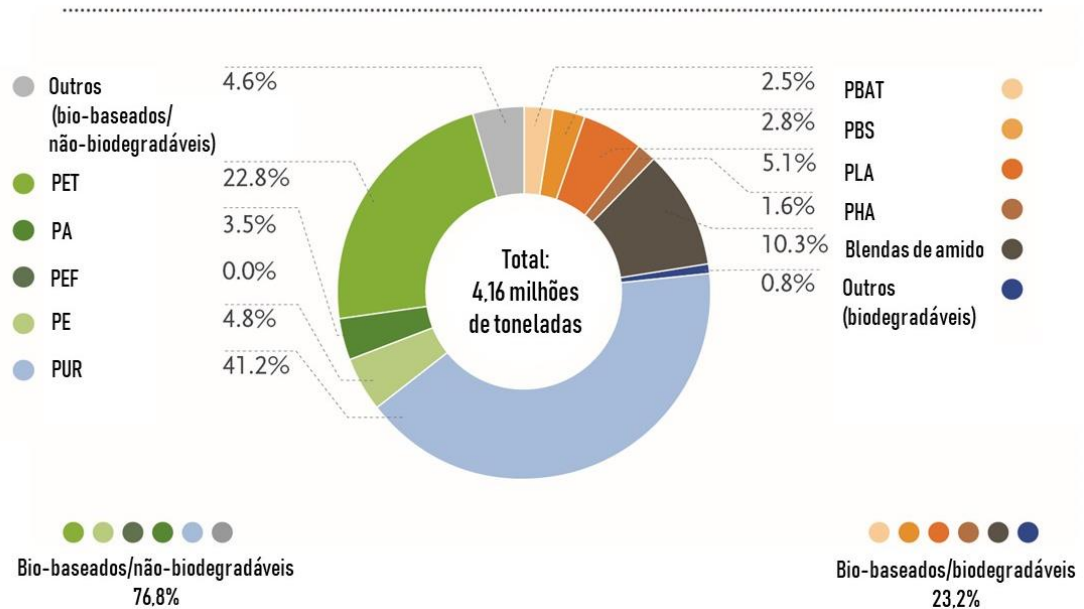
Fonte: Adaptado de European Bioplastics (2016)

Percebe-se que a participação da América do Norte e Europa permanecerão praticamente estáveis, de 27,1% para 26,0% e de 23,4% para 22,5%, respectivamente. A região da Ásia deverá aumentar de 43,4% para 46,9%. Já a América do Sul deverá sofrer uma queda de 5,9% para 4,4% em relação à produção mundial. Em outras palavras, as quotas de mercado mundial deverão permanecer relativamente estáveis.

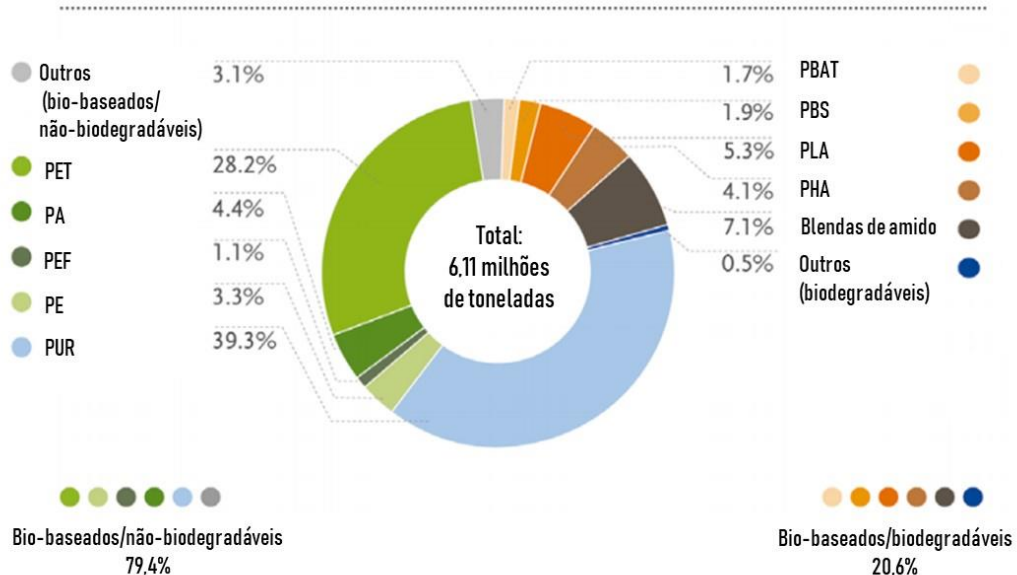
As capacidades globais de produção em 2016 e 2021 foram subdivididas por tipo de material (FIGURA 3).

Figura 3 - Capacidade de produção mundial de materiais plásticos (por tipo) em 2016 e projeção para 2021

Capacidade de produção global de bioplásticos em 2016 (por tipo de material)



Capacidade de produção global de bioplásticos em 2021 (por tipo de material)



Fonte: Adaptado de European Bioplastics (2016)

Os plásticos não biodegradáveis, como o poliuretano (PUR) e o poli(tereftalato de etileno) (PET), são os principais líderes de mercado. Em 2016, o PUR constituiu cerca de 40%

e o PET mais de 20% das capacidades globais de produção de bioplásticos. Para o ano de 2021, a participação de PUR deverá permanecer estável e espera-se que a participação do PET atinja 28,2%.

Como pode ser visto na Figura 3, as capacidades de produção de plásticos biodegradáveis, como PLA, PHA e materiais à base de amido, também estão crescendo de forma constante de cerca de 0,9 milhões de toneladas em 2016 para quase 1,3 milhões de toneladas em 2021. Em 2021, a produção de PHA praticamente irá triplicar quando comparada ao ano de 2016, devido ao aumento das capacidades na Ásia e nos EUA e da implantação da primeira usina de PHA na Europa.

2.2 Polímeros biodegradáveis

O crescente interesse pela utilização de polímeros biodegradáveis nos mais diversos segmentos mercadológicos é impulsionado pelo aumento da demanda por materiais eco-compatíveis, devido à conscientização sobre os impactos ambientais, tanto no setor social quanto no setor industrial, e a necessidade de redução da dependência de recursos fósseis (fontes não renováveis), bem como os avanços tecnológicos contínuos e inovações da indústria, visando materiais com propriedades melhoradas e novas funcionalidades (PHAN et al., 2005).

Os polímeros biodegradáveis vêm ganhando destaque devido ao potencial de aplicação destes materiais nos diversos setores industriais e também por questões de sustentabilidade e proteção ambiental (ARFAT et al., 2014; ORTEGA-TORO et al., 2014).

De acordo com a American Society for Testing and Materials (ASTM) D883, polímeros biodegradáveis são aqueles nos quais a degradação resulta primariamente da ação de microrganismos tais como algas, fungos e bactérias de ocorrência natural (ASTM, 2012).

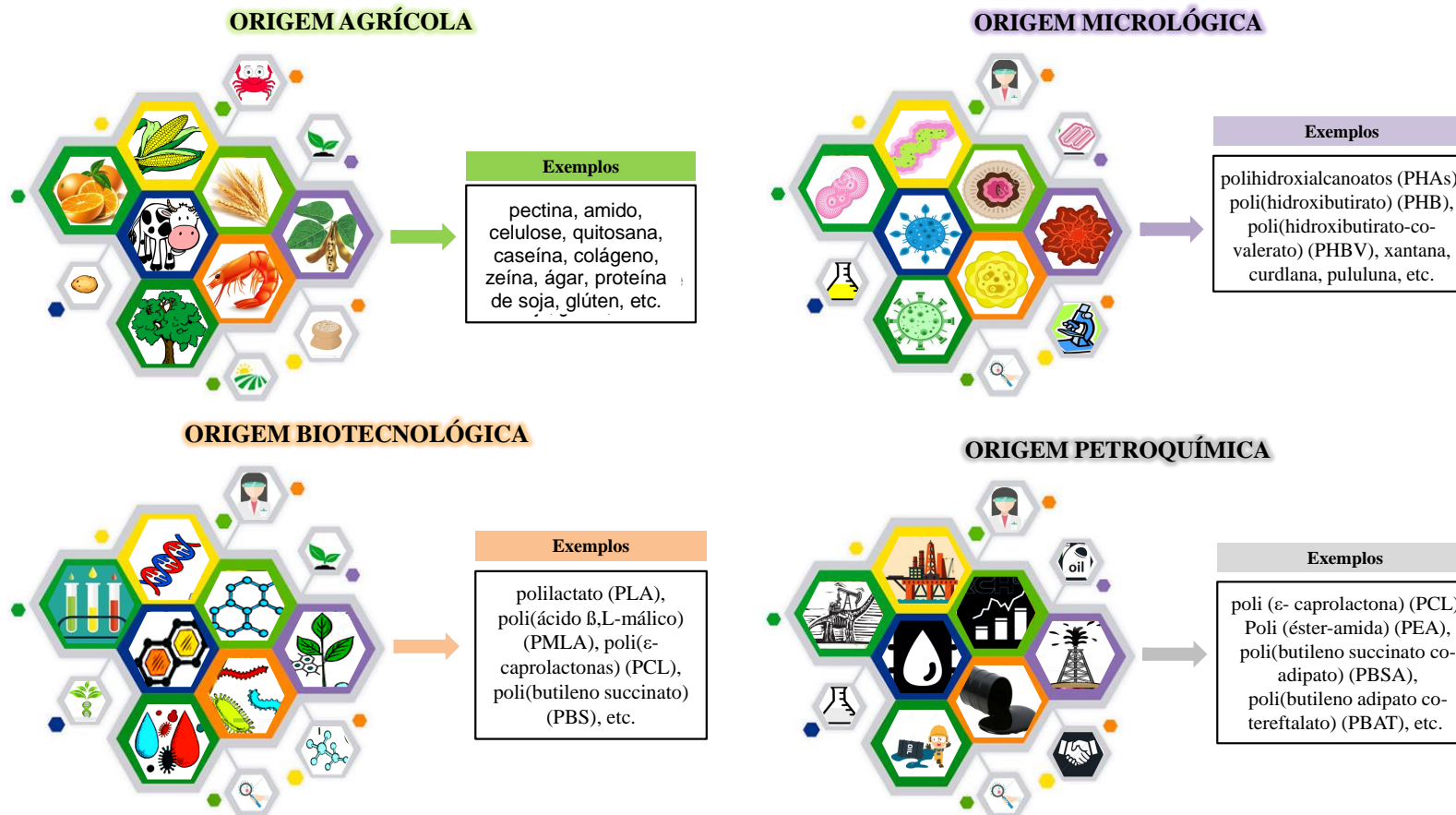
O processo total de biodegradação destes materiais poliméricos pode ocorrer na presença ou ausência de oxigênio e resulta em produtos como a água (H₂O), dióxido de carbono (CO₂) e/ou metano (CH₄), biomassa e compostos inorgânicos, constituindo uma grande vantagem frente aos polímeros sintéticos não biodegradáveis (CARDOZO, 2013). Além disso, apresentam grandes vantagens devido à biocompatibilidade e bioassimilação (ARFAT et al., 2014; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2011; ORTEGA-TORO et al., 2014).

Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados em quatro categorias (FIGURA 4). A primeira categoria é a dos agropolímeros obtidos a partir da biomassa e de fontes animais. Como por exemplo, os polissacarídeos (amido, pectina), produtos lignocelulósicos (madeira,

palha), proteínas animais (colágeno, soro do leite, caseína, soro de leite) e proteínas vegetais (soja, glúten e zeína) (AVEROUS; BOQUILLON, 2004; MENSITIERI et al., 2011).

A segunda categoria é a dos poliésteres microbianos, obtidos a partir de plantas geneticamente modificadas ou através da fermentação da biomassa, como por exemplo, o polihidroxibutirato (PHB). A terceira categoria é a dos poliésteres, polímeros sintéticos oriundos de monômeros naturais dos processos biotecnológicos, como por exemplo, o poli(ácido láctico) (PLA). A quarta categoria é formada por polímeros oriundos de fontes não renováveis, cujos monômeros são obtidos por síntese química a partir de recursos fósseis, como o poli(adipato de etileno) (PEA), poliesteramida, policaprolactona (PCL) e copoliésteres alifáticos ou aromáticos (AVEROUS; BOQUILLON, 2004; MENSITIERI et al., 2011).

Figura 4 - Classificação dos polímeros biodegradáveis: (a) origem agrícola, (b) origem microbiológica, (c) origem biotecnológica e (d) origem petroquímica



Fonte: Do autor (2018)

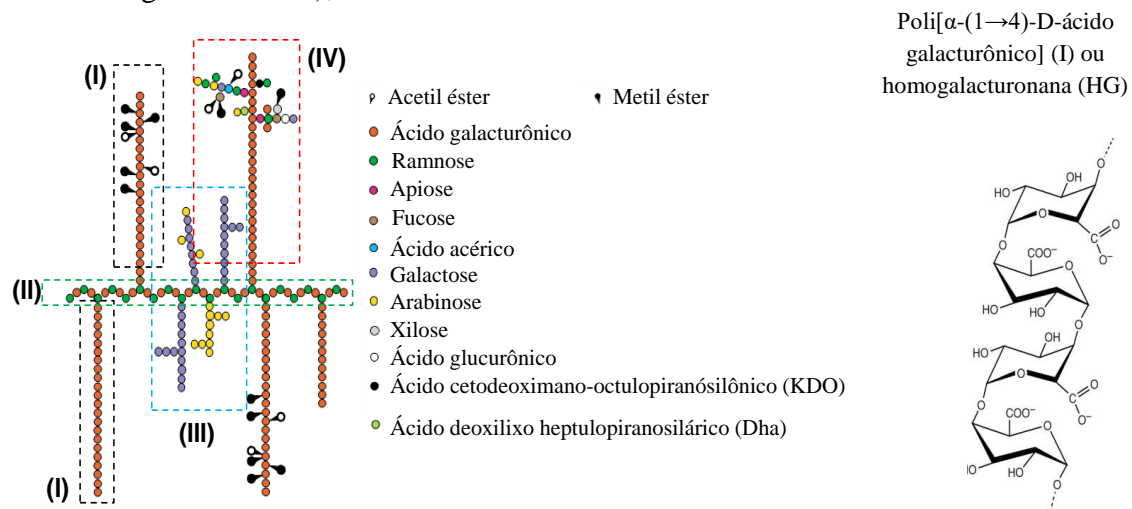
Os polímeros biodegradáveis podem ser obtidos a partir de diversas fontes renováveis, como os coprodutos e resíduos agroindustriais. Sendo assim, tornam-se uma alternativa bem sucedida para diversos segmentos industriais, visto que proporcionam um destino adequado ao excedente da produção agrícola, além de agregar valor a estes subprodutos (VIEIRA, 2010).

Os polissacarídeos e proteínas são os polímeros de fonte renovável com maior destaque de aplicação em diversos segmentos industriais. Particularmente, dentre os polissacarídeos mais utilizados na fabricação de materiais biodegradáveis se destacam o amido e derivados de celulose, pectina, alginato, quitosana e algumas gomas (LAROTONDA et al., 2005; PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2001; THARANATHAN, 2003).

2.3 Pectina

Pectina é um termo utilizado para designar um grupo de polissacarídeos encontrados na parede celular e em regiões intercelulares de plantas e frutos. São polissacarídeos aniônicos e amorfos, facilmente solubilizados em água. A estrutura química da pectina é a mais complexa dentre todos os polissacarídeos conhecidos (FIGURA 5) (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Figura 5 - Esquema geral para a estrutura molecular da pectina com destaque para o poli(ácido galacturônico), seu maior constituinte



Fonte: Adaptado de Willats et al. (2006)

Esta composição química é altamente variável, sendo influenciada por modificações enzimáticas decorrentes do metabolismo dos vegetais, bem como das condições utilizadas para sua extração (SCHOLS; VORAGEN, 2002). As maiores fontes de pectinas são os resíduos do processamento de frutas cítricas, cana-de-açúcar e maçã. Elas são extraídas com soluções ácidas diluídas, e então são precipitadas e transformadas em pó com características uniformes (MAY, 1990).

A composição química das pectinas é majoritariamente definida por cadeias helicoidais de poli[α -(1 \rightarrow 4)-D-ácido galacturônico] (I) ou homogalacturonana (HG). O percentual de HG nas pectinas geralmente supera 75%. Os grupos carboxílicos ocorrem parcialmente na forma de ésteres metílicos, definindo um grau de metoxilação (GM) que varia entre 5 e 95% (SCHOLS; VORAGEN, 2002). Grupos acetil podem também ocorrer nas unidades de ácido galacturônico (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). A estrutura molecular das pectinas apresenta ainda cadeias de ramnogalacturonanas (II), as quais são formadas por unidades de α -(1 \rightarrow 4)-D-ácido galacturônico alternadas por unidades de α -(1 \rightarrow 2)-ramnose (RGI). Algumas cadeias de RGI podem estar ligadas a segmentos de cadeias de açúcares neutros como arabinanas, galactanas, arabinogalactanas (III). Outros domínios na estrutura das pectinas envolvem cadeias de HG ligadas a segmentos quimicamente complexos de açúcares (IV) envolvendo xilose, apiose, ácido acérico, Dha e KDO (RGII) (SCHOLS; VORAGEN, 2002; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Segundo o novo relatório do Grupo IMARC, intitulado “Pectin Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2017- 2022”, o mercado global de pectinas atingiu um volume de aproximadamente 103 mil toneladas em 2016, exibindo uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6% no período de 2009-2016. Espera-se que o mercado mundial de pectinas atinja um volume de cerca de 144 mil toneladas até 2022, crescendo a uma CAGR de 5,7% durante 2017-2022 (IMARC, 2016). A pectina é amplamente utilizada pela indústria de alimentos como agente espessante, gelificante e emulsificante. Também é utilizada em produtos farmacêuticos e cosméticos como um agente de encapsulação (SCHILLING; LEONHARDT, 1999).

O desenvolvimento de plásticos biodegradáveis a partir da pectina é tecnologicamente viável na perspectiva de uso de materiais ambientalmente saudáveis. Uma alternativa

promissora para o aperfeiçoamento de suas propriedades (físicas, químicas e mecânicas) consiste no desenvolvimento de bionanocompósitos, os quais podem ser obtidos pela adição de nanoestruturas à matriz de pectina, como as nanoemulsões.

2.4 Embalagens multifuncionais

Embalagens multifuncionais compreendem um grupo emergente de sistemas de embalagens que apresentam mais de uma função além daquelas apresentadas por uma embalagem convencional (contenção, proteção, conveniência e comunicação). Incluso neste conceito, pode-se citar as embalagens ativas. As embalagens ativas têm ganhado destaque na indústria de alimentos por assegurarem qualidade e segurança extra aos produtos alimentícios. Através da incorporação de agentes ativos, tais como, substâncias antioxidantes, aromatizantes, antimicrobianas, absorvedoras de oxigênio e de etileno, e pela interação entre a embalagem e o alimento, acarreta-se em uma manutenção ou até em um aumento da qualidade do mesmo, conseqüentemente, maior vida de prateleira ao produto (SANTIAGO-SILVA et al., 2009).

Além disso, através da incorporação de, por exemplo, minerais, vitaminas, aminoácidos no material da embalagem, pode-se ter o enriquecimento dos alimentos através da migração destas substâncias. Agentes antioxidantes derivados de fontes naturais, tais como extrato de plantas (AKHTAR et al., 2012; ESTEVES et al., 2011; LI et al., 2014; ZENG et al., 2013), óleos essenciais (BONILLA et al., 2012; PERDONES et al., 2014; RUIZ-NAVAJAS et al., 2013), e outros componentes com atividade antioxidante, como α -tocoferol (BLANCO-FERNANDEZ et al., 2013; JIMÉNEZ et al., 2013), ácido ascórbico (BASTOS; ARAÚJO; LEÃO, 2009; PÉREZ et al., 2012; DE'NOBILI et al., 2013), ácido cítrico (ATARÉS; PÉREZ-MASIÁ; CHIRALT, 2011; ROBLES-SÁNCHEZ et al., 2013), têm sido estudados individualmente ou combinados em filmes e coberturas comestíveis, para melhorar suas propriedades bioativas.

Estudos relacionados a filmes com atividade antimicrobiana também podem ser destacados. Por exemplo, Pintado, Ferreira e Sousa (2009) realizaram estudos com isolado protéico de soro de leite e glicerol os quais foram combinados para formar uma matriz carreadora de agentes antimicrobianos e produzir filmes comestíveis com atividade

antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* estirpes. Filmes biodegradáveis preparadas com amido de batata doce através da incorporação de sorbato de potássio (XIAO et al., 2010) e filmes de maçã com carvacrol contra *Escherichia coli* O157:H7 também apresentaram-se eficientes contra à ação microbiológica (DU et al., 2008).

A incorporação de diferentes compostos bioativos em formulações de alimentos, a fim de desenvolver embalagens ativas aumentou de forma considerável nos últimos anos. A aplicação da nanotecnologia tem ajudado a driblar os desafios e obstáculos técnicos relacionados com a solubilidade, estabilidade e entrega dos compostos bioativos (ABBAS et al., 2016).

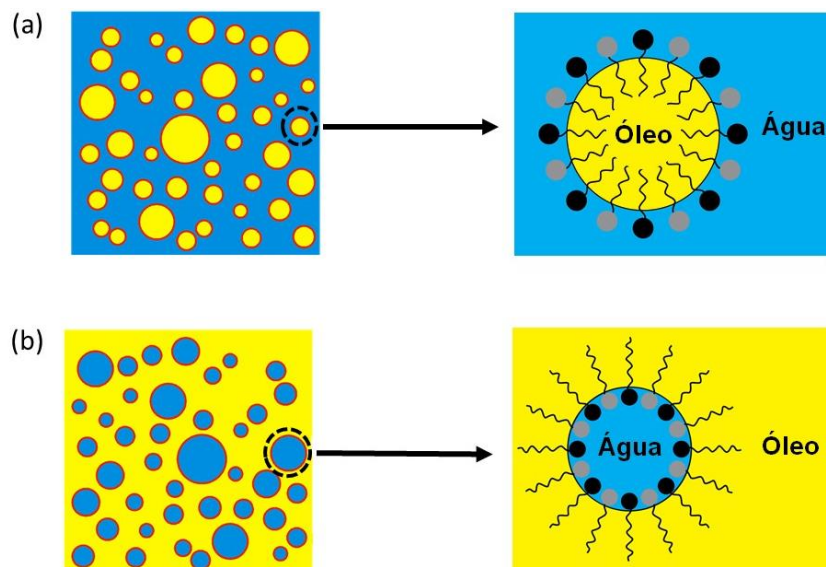
2.5 Nanotecnologia e nanoemulsões

A nanotecnologia envolve o desenvolvimento de tecnologia, controle de estruturas e pesquisa numa faixa de tamanhos de 1 a 100 nm (ROCO; MIRKIN; HERSAM, 2011). É um campo novo da ciência, com aplicação promissora na cadeia produtiva industrial e vem sendo apontada como a próxima revolução em diversas indústrias, incluindo a indústria de alimentos e agricultura (EZHILARASI et al., 2013). Suas aplicações tanto na agricultura quanto ao setor de alimentos são recentes quando comparadas com a sua utilização em produtos fármacos. Movimenta um total de aproximadamente 1 bilhão de dólares e tem projeção de crescer mais de 20 bilhões de dólares até 2021 (ROCO; MIRKIN; HERSAM, 2011).

A preservação dos alimentos tem sido uma preocupação constante da indústria de alimentos ao longo dos anos, a fim de evitar a contaminação e deterioração dos mesmos. Nesse contexto, as embalagens para alimentos desempenham um papel importante para garantir a qualidade e segurança do produto que contem, e a demanda do consumidor por produtos seguros, com vida de prateleira estendida, melhor relação custo-benefício e conveniência, tais como as embalagens ativas que podem empregar a nanotecnologia (PEREZ ESPITIA et al., 2012; RESTUCCIA et al., 2010). A aplicação da nanotecnologia na indústria inclui, por exemplo, a utilização de nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), biosensores e nanoemulsões (ASSIS et al., 2012).

Emulsões são sistemas constituídos de dois ou mais líquidos imiscíveis, sendo, um deles disperso na forma de gotas ou glóbulos (fase dispersa) no outro (fase contínua). Devem conter um agente ativo de superfície, como tensoativos, com duas funções principais: diminuir a tensão interfacial entre as fases, de forma a facilitar a formação da emulsão e estabilizar a fase dispersa contra os mecanismos de desestabilização após sua formação. As emulsões simples podem ser de dois tipos: óleo em água (O/A) onde gotas de óleo estão dispersas em uma fase contínua aquosa ou o inverso, água em óleo (A/O) onde as gotas de água estão dispersas numa fase contínua de óleo (FIGURA 6) (SINGH et al., 2017).

Figura 6 - (a) Emulsão concentrada de óleo em água onde as gotículas de óleo são dispersas dentro de uma fase aquosa contínua e (b) emulsão concentrada de água em óleo onde as gotículas de água são dispersas dentro de uma fase oleosa contínua



Fonte: Adaptado de Singh et al. (2017)

As nanoemulsões consistem em uma dispersão bastante fina, composta por uma fase de óleo (tal como hidrocarbonetos ou triglicerídeos) e uma fase aquosa (água ou água combinada a um eletrólito ou poliol), que apresenta-se como gotas com diâmetro variando de 20 a 200 nm (SIMONNET; L'ALLORET, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN). Devido ao tamanho reduzido das partículas ocorre a redução da força gravitacional, permitindo que o movimento Browniano (movimento aleatório das partículas microscópicas imersas em um fluido) ou taxa de difusão

seja suficiente para superar a força da gravidade e com isso evita a floculação das gotículas, cremeação e a sedimentação durante o período de armazenamento (CAPEK, 2004; FERNANDEZ et al., 2004; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010; SIMONNET; L'ALLORET, 2004; TADROS et al., 2004).

Para a formação das nanoemulsões é necessário o fornecimento de energia para o sistema devido a não se formarem de forma espontânea. De acordo com a literatura elas podem ser preparadas por métodos de baixa energia ou alta energia de emulsificação (SOLÈ et al., 2010).

Os métodos de alta energia utilizam dispositivos mecânicos que geraram forças de cisalhamento capazes de quebrar e deformar as gotículas da fase interna, formando glóbulos de tamanhos reduzidos. Alguns dispositivos utilizados para a produção de nanoemulsões de alta energia são: microfluidizadores, homogeneizadores de alta pressão e ultrassonicadores. Já os métodos que empregam baixa energia, utilizam a energia química armazenada nos componentes são, por exemplo, a emulsificação espontânea e o método da temperatura de inversão de fases (FERNANDEZ et al., 2004).

As nanoemulsões são aplicadas em diversos segmentos industriais, destacando-se na área farmacêutica, cosmética, química e na indústria alimentícia. Devido ao seu tamanho reduzido, as nanoemulsões, por exemplo, podem ser utilizadas para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de compostos, assim como alterar as propriedades sensoriais de alimentos ou ainda promover a liberação controlada de determinados compostos, sobretudo aqueles que têm baixa solubilidade em água (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; KUAN et al., 2012). Além disso, são utilizadas para projetar embalagens ativas e/ou inteligentes de forma a melhorar as suas propriedades físicas (por exemplo, regulando a permeabilidade a gases), o que tem influência direta em parâmetros relacionados com a segurança e qualidade alimentar (CASARIEGO et al., 2009; MEDEIROS et al., 2012; KUAN et al., 2012).

Atualmente, o desenvolvimento de nanoemulsões utilizando óleos vegetais têm sido intensamente valorizado, devido às atividades benéficas que a complexa composição de ácidos graxos presentes nestes óleos podem exercer, além do seu reconhecimento como compostos naturais e seguros, sendo uma alternativa para a produção de alimentos livres de aditivos sintéticos (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

Bovi et al. (2017) prepararam nanoemulsões com óleo de buriti e incorporaram em bebidas isotônicas como uma alternativa natural em substituição aos corantes artificiais. Guerra-Rosas et al. (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Listeria innocua* de nanoemulsões contendo óleos de orégano, tomilho e capim-limão, demonstrando o potencial de aplicação destes óleos. Noori et al. (2018) estudaram o efeito da incorporação de óleo de gengibre em filmes comestíveis de caseinato de sódio e demonstraram que as nanoemulsões aplicadas em filés de peito de frango prolongaram a sua vida de prateleira.

Portanto, a utilização de nanoemulsões de óleo vegetais na indústria alimentícia tem sido amplamente abordada e tem potencial aplicação em embalagens alimentícias (MCCLEMENTS; RAO, 2011). Sendo assim, a utilização do óleo de copaíba para confecção de embalagens alimentícias torna-se uma alternativa viável dada as suas inúmeras propriedades bioativas conhecidas.

2.6 Óleo de copaíba

As copaibeiras, Figura 7, são árvores do gênero *Copaifera*, da família das Leguminosae-Caesalpiniaceae e são encontradas na América Latina e África Ocidental. No Brasil, são encontradas nas regiões Centro-oeste, Amazônica e Sudeste. As árvores apresentam crescimento lento, com altura variando de 25 a 40 metros e diâmetro entre 0,4 e 4 metros, podendo viver até 400 anos. Dentre as 72 espécies conhecidas, 20 delas são encontradas no Brasil, principalmente nos estados do Amazonas e Pará, sendo mais comuns no Sul da Floresta Tropical Amazônica. Possuem cascas muito aromáticas, folhagens densas, flores pequenas e frutos secos. Além disso, sua madeira é de excelente qualidade, apresentando superfície lisa, durável, lustrosa, com alta resistência ao ataque de xilófagos e baixa permeabilidade, que são características importantes para o uso na fabricação de peças para a marcenaria em geral e torneadas (VEIGA; PINTO, 2002).

Figura 7 - Árvores de copaíba



Fonte: Veiga e Pinto (2002)

Do tronco da copaibeira é extraído uma óleo-resina, encontrado em canais secretores ao longo de toda à árvore. O óleo de copaíba é um dos produtos naturais amazônicos comercializados mais importantes, sendo exportados para países como França, Inglaterra, Alemanha e Estados Unidos (VEIGA; PINTO, 2002).

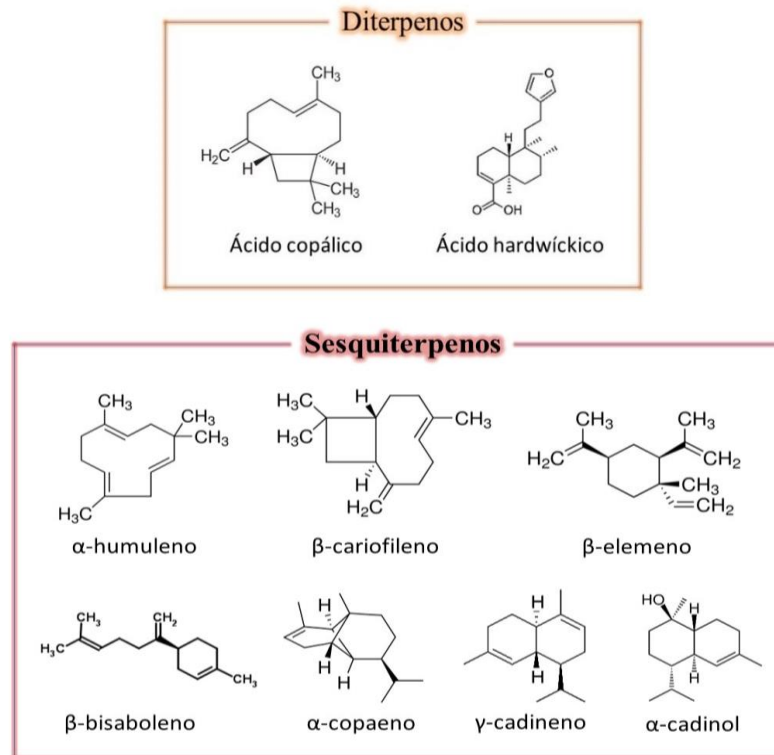
Esta óleo-resina apresenta uma coloração que varia de amarelo ouro a marrom claro, dependendo da espécie, fatores biológicos (fungos e insetos) e fatores abióticos (temperatura, disponibilidade de água, solo e luminosidade). É composto por uma parte resinosa e não volátil (diterpenos) que constituem de 55 a 60% do óleo, utilizada como bálsamo, e por uma parte volátil, o óleo essencial, que é composto por sesquiterpenos (oxigenados e hidrocarbonetos) (VEIGA; PINTO, 2002).

Os principais diterpenos encontrados na parte resinosa são: ácido hardwíckico, ácido copaífero, ácido copálico, ácido calavênico, dentre outros. O ácido copálico é considerado um marcador químico do óleo de copaíba para comprovar a sua autenticidade, uma vez que foi encontrado em todos os óleos conhecidos analisados por cromatografia gasosa (SOARES et al., 2003). Para os sesquiterpenos encontrados óleo de copaíba destaca-se o β -cariofileno, com comprovada ação antifúngica, antibacteriana e anti-inflamatória, o β -bisaboleno que apresenta propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, além do α -bisabolol, α -humuleno, α -copaeno, α -cadinol, β -elemeno, γ -cadineno, entre outros (CRAVEIRO et al., 1981; VEIGA; PINTO, 2002).

Alguns dos sesquiterpenos e diterpenos presentes no óleo-resina de copaíba são mostrados na Figura 8. De acordo com alguns autores, o óleo é produto da desintoxicação do

organismo vegetal e funciona como uma defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (CASCON; GILBERT, 2000).

Figura 8 - Principais sesquiterpenos e diterpenos presentes no óleo-resina de copaíba



Fonte: Do autor (2018)

Antigamente o óleo era extraído através de cortes e machadadas no seu tronco, inutilizando a árvore. Atualmente utiliza-se a técnica de extração direta, onde é feita uma incisão com trado a cerca de 1 metro de altura do tronco (FIGURA 9). Após a finalização da coleta, o orifício é vedado com argila ou tampa vedante de plástico para impedir a infestação da árvore por cupins ou fungos. Relata-se que a extração de óleo chega até 50 litros anualmente. Esta técnica é menos agressiva e não causa o desmatamento (CASCON; GILBERT, 2000).

Figura 9 - Representação do modo de extração direto do óleo de copaíba



Fonte: Imaflora (2014)

As propriedades medicinais dos óleos de copaíba eram conhecidas pelos índios desde a época da chegada dos portugueses ao Brasil, os quais observaram que os animais se esfregavam em troncos de copaíba para curar suas feridas (SANTOS et al., 2008). Posteriormente, os índios latino-americanos utilizavam o óleo para cicatrizar feridas de guerreiros após suas batalhas, curar úlceras e para passar no coto umbilical de recém-nascidos (FRANCISCO, 2005; MACIEL et al., 2002). Seus efeitos gastroprotetor, anti-inflamatório, antitumoral e analgésico já foram comprovados (LANGSDORFII et al., 1994; MORENO-FERNANDES, 1992; PAIVA et al., 1998).

Mendonça e Onofre (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba extraído da árvore *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae) e constataram seu potencial de inibição contra três bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), sendo duas gram-negativas e uma gram-positiva.

Santos (2014) estudou a incorporação de óleos essenciais em filmes de quitosana para utilização como revestimento alimentício em filés de tilápia do Nilo e observou que o uso do óleo de copaíba melhorou e prolongou a vida de prateleira do pescado.

Morelli e colaboradores (2015) investigaram as propriedades do óleo-resina de copaíba extraída da *C. multijuga*, incorporado em filmes de poli(ácido láctico) e folhas de papel com potencial aplicação como embalagens ativas e observaram a inibição da proliferação da bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*. No entanto, Pacheco et al. (2006) não observaram nenhuma atividade do óleo de copaíba de *C. multijuga* contra *S. aureus* e *B. subtilis*.

Bonan et al. (2015) investigaram o efeito da incorporação de óleo de copaíba em nanofibras de poli(ácido láctico)/polivinilpirrolidona e confirmaram a ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, demonstrando o potencial de aplicação das nanofibras na área biomédica.

Marangon et al. (2017) desenvolveram emulsões de óleo de copaíba e incorporaram em géis de quitosana/gelatina e consideraram essa combinação uma estratégia promissora para controlar o crescimento de *S. aureus*.

Além da obtenção de materiais com propriedades diferenciadas e suas possíveis aplicações em diversos segmentos, o grande desafio na área de biopolímeros encontra-se no desenvolvimento de novas e mais simples técnicas de obtenção ou processamento desses materiais.

2.7 Técnicas de processamento de biopolímeros

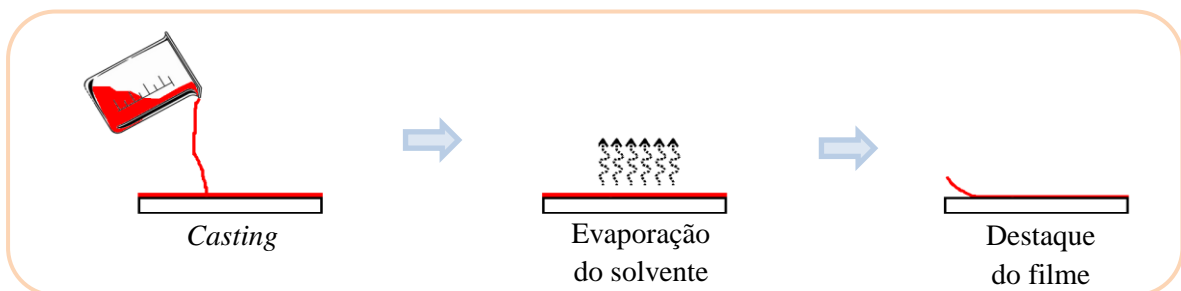
O processamento de biopolímeros pode ser realizado por diversas técnicas, dentre as mais citadas estão as técnicas de *casting* e a extrusão.

O processo de extrusão consiste, basicamente, em alimentar, de forma controlada, por meio de um funil de alimentação, o material polimérico para o interior de um cilindro aquecido. Por meio de uma ou duas roscas, o material será transportado, homogeneizado e compactado durante o processo. As roscas utilizadas no processo de extrusão costumam apresentar três zonas distintas: a zona de alimentação, seguida pela zona de compressão e por fim, a zona de dosagem. Ao final do cilindro, o material é comprimido, sob pressão, através de uma abertura na extremidade oposta da extrusora denominada matriz, produzindo um perfil contínuo, de seção transversal constante e com formato equivalente ao da matriz. Posteriormente, o material extrudado é resfriado, tornando-se um sólido (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). Em geral, o processo de extrusão envolve altas temperaturas e tempos de residência, que podem causar degradações térmicas nas matrizes poliméricas biodegradáveis. Para contornar esta problemática, a técnica de *casting* contínuo pode ser uma alternativa.

A produção de filmes pela técnica de *casting* clássica, Figura 10, consiste em verter uma formulação em placas, como as de Petri e vidro, fazendo o controle da espessura média dos

filmes resultantes da massa de solução vertida na placa, o controle da espessura é feito visualmente e, variações ao longo da placa geralmente são inevitáveis. Este processo não é adequado para formar filmes com espessura superior a 30 μm , levando a dificuldades de disseminação da técnica. A secagem é feita em temperatura ambiente ou em estufas com circulação de ar em temperaturas moderadas em torno de 35°C. Os tempos de secagem são variados, dependendo da composição do material mas, normalmente, é necessário de 10 a 24 horas (GODBILLOT et al., 2006; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009). Embora o método seja extensivamente utilizado na maioria dos projetos de pesquisa, apresenta desvantagens, como: longos tempos de secagem, formação de bolhas e agregados na superfície dos filmes e a dificuldade em aumentar sua produção para escala industrial (OTONI et al., 2017).

Figura 10 - Representação esquemática da produção de filmes pela técnica de *casting* clássica

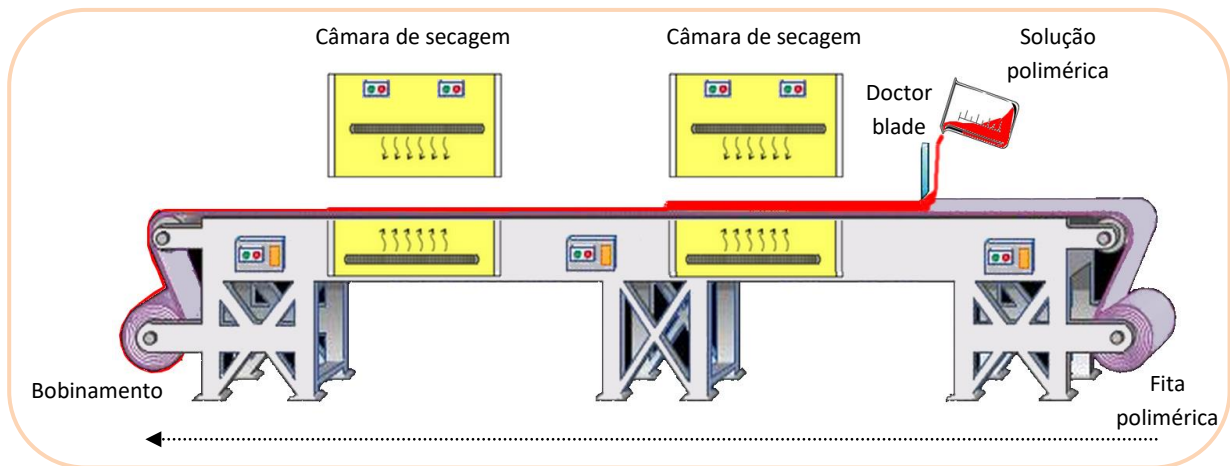


Fonte: Do autor (2018)

A técnica de *casting* contínuo, Figura 11, também conhecida como "tape-casting", "spread-casting" ou "knife-coating", já é bem difundida nas indústrias de papel, cerâmica, tintas e plásticos. No processo de *casting* contínuo, a solução é colocada em um reservatório com uma lâmina niveladora, denominada "doctor-blade", cuja altura pode ser ajustada com o auxílio de parafusos micrométricos, ou seja, na espessura desejada (MISTLER; TWINAME, 2000). A solução é espatulada na espessura pré-determinada sobre um suporte (fita polimérica) devido ao movimento da fita de suporte (LAROTONDA, 2007). A lâmina úmida é posteriormente seca, por circulação de ar, condução de calor e infravermelho, fazendo com que ocorra a

evaporação do solvente e uma redução da sua espessura. As espessuras dos filmes resultantes geralmente variam entre 20 μm e 1 mm. Neste processo é possível preparar materiais multicamadas (TANIMOTO; HAYAKAWA; NEMOTO, 2005).

Figura 11 - Representação esquemática da produção de filmes pela técnica de casting contínuo



Fonte: Do autor (2018)

O processo de *casting* contínuo pode ser considerado um processo promissor para produção de filmes biodegradáveis, quando comparado ao procedimento de *casting* convencional anteriormente descrito, apresentando vantagens relacionadas aos tempos de secagem e capacidade de produção (DU et al., 2008).

3 CONCLUSÃO

O *casting* contínuo é uma técnica emergente de processamento de polímeros e já demonstra grandes vantagens na produção de filmes e compósitos poliméricos. A produção de plásticos biodegradáveis a partir de polissacarídeos ainda necessita do estabelecimento de técnicas de processamento escalonáveis que não causem degradação dos biopolímeros e que gerem plásticos com qualidade estética adequada para o mercado, além de que estes devem apresentar propriedades capazes de atender diversas especificações de projetos. Neste caso, o desenvolvimento de bionanocompósitos de pectina por *casting* contínuo, assim como proposto

neste projeto, se torna relevante, uma vez que a técnica alia produção em larga escala com plásticos de excelente qualidade, complementada pela adição das nanoemulsões do óleo de copaíba que conferiram propriedades antibacteriostática aos biopolímeros estendendo a vida de prateleira e inibindo/controlando a multiplicação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos. Além disso, a incorporação do óleo na escala manométrica levou a modificações significativas nas propriedades mecânicas e na biodegradação dos filmes de pectina, de forma a apresentar potencial para serem aplicados na indústria de alimentos, além de contribuir diretamente para a redução do impacto ambiental das embalagens plásticas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. S. et al. Nanomaterials Used As A Plants Growth Enhancer: An Update. **International Journal of Pharma Research & Review IJPRR**, v. 5, n. 57, p. 17–23, Aug. 2016.
- AKHTAR, K. P. et al. Resistance of Solanum Species to Phytophthora Infestans evaluated in the Detached-Leaf and Whole-Plant assays. **Pakistan Journal of Botany**, 44(3): 1141-1146, July 2012.
- ARFAT, Y. A. et al. Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 265–273, Dec. 2014.
- ARVANITTOYANNIS, I. et al. Biodegradable films made from low-density polyethylene (LDPE), rice starch and potato starch for food packaging applications: Part 1. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2-3, p. 89-104, July 1998.
- ATARÉS, L.; PÉREZ-MASIÁ, R.; CHIRALT, A. The role of some antioxidants in the HPMC film properties and lipid protection in coated toasted almonds. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 649-656, June 2011.
- AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 111-112, June 2004.
- BASTOS, D. da S.; ARAÚJO, K. G. de L.; LEÃO, M. H. M. da R. Ascorbic acid retaining using a new calcium alginate-Capsul based edible film. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, p. 97-103, Mar. 2009.
- BLANCO-FERNANDEZ, B. et al. Edible chitosan/acetylated monoglyceride films for prolonged release of vitamin e and antioxidant activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 2, p. 626-635, July 2013.
- BONAN, R. F. et al. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (Copaifera sp.) oil. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 372–377, Mar. 2015.
- BONILLA, J. et al. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 9–16, Jan. 2012.
- BOVI, G. G.; PETRUS, R. R.; PINHO, S. C. Feasibility of incorporating buriti (Mauritia flexuosa L.) oil nanoemulsions in isotonic sports drink. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 2201–2209, Oct. 2017.
- CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2-3, p. 125–155, Mar. 2004.

- CASARIEGO, A. et al. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1895–1902, Oct. 2009.
- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773–778, Dec. 2000.
- DE'NOBILI, M. D. et al. Hydrolytic Stability of l-(+)-Ascorbic Acid in Low Methoxyl Pectin Films with Potential Antioxidant Activity at Food Interfaces. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 1, p. 186–197, Sep. 2013.
- DU, W. X. et al. Antibacterial activity against *E. coli* O157:H7, physical properties, and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato films. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, p. 378–383, Aug. 2008.
- ESTEVEZ, E. A. et al. Nutritional composition of *Copaifera langsdorffii* Desf. aril flour and its effect on serum lipids and glucose in rats. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2357–2361, Aug. 2011.
- EZHILARASI, P. N. et al. Freeze drying technique for microencapsulation of *Garcinia* fruit extract and its effect on bread quality. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 513–520, Aug. 2013.
- FERNANDEZ, P. et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1–3, p. 53–58, Dez. 2004.
- GODBILLOT, L. et al. Analysis of water binding in starch plasticized films. **Food Chemistry**, v. 96, n. 3, p. 380–386, June 2006.
- GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. **Food Control**, v. 77, p. 131–138, July 2017.
- JIMÉNEZ, A. et al. Physical properties and antioxidant capacity of starch-sodium caseinate films containing lipids. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 3, p. 695–702, June 2013.
- KUAN, C. Y. et al. Nanotech: Propensity in foods and bioactives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 1, p. 55–71, June 2012.
- LANGSDORFF, C. et al. The Isolation and in vivo Potent Antitumor Activity of Clerodane Diterpenoid from the Oleoresin of the Brazilian Medicinal Plant. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 24, p. 2889–2892, Dec. 1994.
- LAROTONDA, F. Biodegradable films and coatings obtained from carrageenan from *Mastocarpus stellatus* and starch from *Quercus suber*. Tese (Doutorado em Engenharia

Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade do Porto, p. 6-315, 2007.

LAROTONDA, F. D. S. et al. Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 4, p. 394–402, Dec. 2005.

LI, J.-H. et al. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 166–173, Jun. 2014.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, Julho 2002.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: Produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137–156, Mar. 2010.

MARANGON, C. A. et al. Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p. 163–171, May 2017.

MARCEL SILVA SANTOS, F. DA. Utilização de quitosana no revestimento de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e na preparação de filmes incorporados com óleos essenciais. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, p. 18-149, Agosto 2014.

MAY, C. D. Industrial pectins: Sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, n. 1, p. 79–99, Jan. 1990.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, Apr. 2011.

MEDEIROS, B. G. de S. et al. Polysaccharide/Protein Nanomultilayer Coatings: Construction, Characterization and Evaluation of Their Effect on “Rocha” Pear (*Pyrus communis* L.) Shelf-Life. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2435–2445, 2012.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2b, p. 557–581, Nov. 2009.

MENSITIERI, G. et al. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 2-3, p. 72–80, Mar. 2011.

MORELLI, C. L. et al. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 134–141, Aug. 2015.

MORENO-FERNANDES; M. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera*

cearensis, Huber). **Rev Bras Farm**, v. 73, p. 53–56, 1992.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 5, p. 1328–1333, July 2009.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 3, p. 605–610, May 2011.

NOORI, S.; ZEYNALI, F.; ALMASI, H. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food Control**, v. 84, p. 312–320, Feb. 2018.

ORTEGA-TORO, R. et al. Properties of starch-hydroxypropyl methylcellulose based films obtained by compression molding. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 155–165, Aug. 2014.

OTONI, C. G. et al. Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables-A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 5, p. 1151–1169, May 2017.

PACHECO, T. A. R. C.; BARATA, L. E. S.; DUARTE, M. C. T. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp) balsams. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.8, n.esp., p.123-124, July 2006.

PAIVA, L. A. F. et al. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 73–80, Aug. 1998.

PERDONES, Á. et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosanecinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. **Food hydrocolloids**, v. 36, p. 256–264, May 2014.

PEREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 996–1002, Feb. 2001.

PÉREZ, C. D. et al. Hydrolytic and oxidative stability of l-(+)-ascorbic acid supported in pectin films: Influence of the macromolecular structure and calcium presence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 21, p. 5414–5422, May 2012.

PEREZ ESPITIA, P. J. et al. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 187–204, Nov. 2012.

PHAN, T. D. et al. Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food

- quality preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 973–981, Feb. 2005.
- PINTADO, C. M. B. S.; FERREIRA, M. A. S. S.; SOUSA, I. Properties of Whey Protein–Based Films Containing Organic Acids and Nisin To Control *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 9, p. 1891–1896, Sep. 2009.
- RESTUCCIA, D. et al. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. **Food Control**, v. 21, n. 11, p. 1425–1435, Nov. 2010.
- ROBLES-SÁNCHEZ, R. M. et al. Influence of alginate-based edible coating as carrier of antibrowning agents on bioactive compounds and antioxidant activity in fresh-cut Kent mangoes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 240–246, Jan. 2013.
- ROCO, M. C.; MIRKIN, C. A.; HERSAM, M. C. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: Summary of international study. **Journal of Nanoparticle Research**, Jan. 2011.
- 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, n. 2, p. 386–392, April 2013.
- SANTIAGO-SILVA, P. et al. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v. 20, n. 1, p. 85–89, Jan. 2009.
- SANTIAGO, L. G.; CASTRO, G. R. Novel technologies for the encapsulation of bioactive food compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 1–108, Feb. 2016.
- SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, Nov. 2008.
- SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 1–9, June 2010.
- SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 854–867, April 2012.
- SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, April 2017.
- SOLÈ, I. et al. Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: Preparation variables and scale up. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, n. 2, p. 417–423, April 2010.
- SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p.

145–149, May 2004.

SWAIN, S. N. et al. Biodegradable Soy-Based Plastics: Opportunities and Challenges. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 12, n. 1, p. 35-42, Jan. 2004.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, May 2004.

TANIMOTO, Y.; HAYAKAWA, T.; NEMOTO, K. Tape-casting technique can prepare beta-TCP sheets with uniform thickness and flexibility. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 73, n. 1, p. 157-163, April 2005.

THARANATHAN, R. . Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 71–78, Mar. 2003.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero Copaifera L. **Quimica Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, Julho 2002.

WILLATS, W. G. .; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97–104, Mar. 2006.

XIAO, C. et al. Combined action of pure oxygen pretreatment and chitosan coating incorporated with rosemary extracts on the quality of fresh-cut pears. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1003–1009, Aug. 2010.

ZENG, R. et al. Impact of carboxymethyl cellulose coating enriched with extract of *Impatiens balsamina* stems on preservation of ‘Newhall’ navel orange. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 44–48, Aug. 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTICLE 1 - Pectin-based films containing copaiba oil nanoemulsions obtained by continuous casting

(Artigo submetido de acordo com as normas da revista Carbohydrate Polymers)

ARTICLE 1**Pectin-based films containing copaiba oil nanoemulsions obtained by continuous casting**

Laís B. Norcino¹, Juliana F. Mendes², Anny Manrich³, Juliano E. De Oliveira^{4*}, Luiz Henrique Capparelli Mattoso³

1- Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais (PPGBioMat), Universidade Federal de Lavras, Lavras (MG), Brasil.

2- Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCA), Universidade Federal de Lavras, Lavras (MG), Brasil.

3- Laboratório Nacional de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LNNA), Embrapa Instrumentação, São Carlos (SP), Brasil.

4- Departamento de Engenharia (DEG), Universidade Federal de Lavras, Lavras (MG), Brasil.

* Corresponding author. Tel.: +55 35 3829-4609

E-mail address: juliano.materiais@gmail.com (J. E. Oliveira).

ABSTRACT

Biodegradable pectin plastics with copaiba oil for use as active packaging were prepared by continuous casting. The increase in mean droplet diameter as a function of concentration and storage time was observed. The zeta potential results revealed that nanoemulsions at time zero were stable. After 72 hours of storage, a decrease in zeta potential was observed. Scanning Electron Microscopy (SEM) showed that pure biopolymers have a homogeneous and compact microstructure whereas those with copaiba oil had an increase in roughness as the oil concentration increased. The spectra of the copaiba biopolymers were similar to the pure pectin film. The mechanical characterization evidenced that the incorporation of copaiba oil resulted in the gradual decrease of elastic modulus and tensile strength, while increasing elongation at break. A bacteriostatic effect was observed in the films. The free compounds of copaiba oil inhibited microbial growth, decreasing the evolution of CO₂ in the biodegradation process.

Key words: active packaging, copaiba oil, continuous *casting*, nanoemulsion, biodegradation.

1. Introduction

Biodegradable polymers have been gaining further awareness due to the potential use of these materials in many different industrial areas and also because of topics regarding sustainability and environmental protection. They have great advantages because of their biodegradability, their bio-compatibility and the fact that they are extracted from renewable sources, for example, polysaccharides (Arfat, Benjakul, Prodpran, Sumpavapol, & Songtipya, 2014; Müller, Renner, Móczó, Fekete, & Pukánszky, 2014; Ortega-Toro, Jiménez, Talens, & Chiralt, 2014).

Pectins are anionic, amorphous, atoxic polysaccharides and are easily solubilized in water. The chemical composition of pectins is mainly defined by helicoidal chains of poli[α -(1 \rightarrow 4)-D-galacturonic acid] or homogalacturonan (HG) (Willats, Knox, & Mikkelsen, 2006). The largest sources of pectins are residues from the processing of citric fruits, sugarcane and apples. According to the newest report from the IMARC group, titled "Pectin Market: Global

Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2017-2022”, the global pectin market has reached a volume of approximately 103 thousand tons in 2016. It is predicted that the worlds pectin market will reach a volume of around 144 thousand tons until 2022 (IMARC, 2017). Moreover, pectins are known for their excellent filmogenic capacity and potential use in bio-active packaging (Voragen, Coenen, Verhoef, & Schols, 2009).

Multi-functional packages are part of an emerging group of packaging systems that present more than two functions other than those presented by conventional packaging (containing, protection, convenience and communication). In this concept, we have the active packaging concept. Active packaging has been gaining awareness in food engineering for having assured extra quality and security for food products. Through the incorporation of active agents, such as antioxidant, aromatizing, antimicrobial and oxygen and ethylene absorbing substances and through the interaction between package and food product, with the objective of hindering the deterioration of the product or extending its shelf life (Santiago-Silva et al., 2009).

Copaiba oil is a promising alternative for the confection of active films. It is an oil resin that is directly extracted from the trunk of its tree and its color may vary from a golden yellow to brown (John, & Lloyd, 1898), depending on the species. The copaiba is native to tropical regions, and in Brazil it is easily found in the Amazon and Central regions (Veiga & Pinto, 2002). Its oil has many important properties, such as analgesic, anti-parasitic, anti-inflammatory, larvicidal, expectorant, diuretic activities and antibacterial properties (Bonan et al., 2015; A. O. Dos Santos et al., 2008; Gelmini et al., 2013; Trindade, Stabeli, Pereira, Facundo, & Silva, 2013).

The bio-active substances present in the largest quantities in the oil are sesquiterpenes and diterpenes. Since it is a natural product, it is attractive for use in the food industry due to consumers seeking healthier alternatives to the more conventional synthetic additives. Moreover, copaiba oil has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) since 1972, having been properly adequate for contact with foods (Veiga & Pinto, 2002).

In regards to what has been exposed until now, the development of new biodegradable polymer-based materials has been used as a way of evading the overdependence on petroleum-derived products for the manufacturing of packages. Thus, this work has the objective of

developing biodegradable pectin films incorporated with nanoemulsions of copaiba oil, forseeing a future application in the food industry as an active package. The biopolymers were produced through continuous casting, an emerging technique of biodegradable film processing. It was intended to study the interactions which occurred between the nanoemulsion particles and the pectin matrix and how it influenced its mechanical and morphological properties in addition to the biodegradation of the biopolymers.

2. Materials and methods

2.1 Materials

High-methoxyl pectin (PEC), methoxylation degree (MD) of 84% and weight average molecular weight (M_w) of 1.3×10^5 g mol⁻¹ was kindly provided by CP Kelco (Limeira, SP, Brasil). Copaiba oil (CP) was purchased from Pharmakos D'Amazônia (Manaus, Brazil). Glycerol (>99.5 % pure) and Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween 80) were purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil). Deionized water ($\rho > 18.2$ M Ω cm) was obtained by a purification system Barnstead Nanopure Diamond™ (Thermo Fisher Scientific Inc, USA).

2.2 Preparation of nanoemulsions

Direct oil-in-water (O/W) emulsions were prepared by adding 1, 3 and 6% (wt.) of copaiba oil (dry pectin mass basis) and 1% (wt.) of Tween 80 to ultrapure water. Then, both oily and aqueous phases were mixed under magnetic stirring (3400 rpm) for 1 min at room temperature to obtain the coarse emulsion and were treated ultrasonically in water for 3 min (450 Branson sonifier, tapped step horn 1/2" tip diameter, amplitude of 50%).

2.3 Particle size, size distribution, and short-term stability

The average particle size and size distributions of emulsion droplets were determined by dynamic light scattering in a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, U.K.) 24 h and 72 h after emulsification. Ultrapure water was used as dispersant to avoid multiple scattering effects and interdroplet interactions. The cumulant mean (z-average) diameter and the polydispersity index (PdI) were used to describe droplet size and size

distribution, respectively. The analyses were performed at room temperature at 25 °C in triplicate.

2.4 Pectin–copaiba oil biopolymers preparation

Solutions (6% wt.) of PEC was prepared by dissolving powdered pectin in ultrapure water and the mixture was totally homogenized with the aid of a T25 Ultra-Turrax mixer (IKA Werk GmbH & Co, Staufen, Germany) operating at 12.000 rpm for 10 minutes, until complete solubilization. The solutions were then centrifuged (Continent R centrifuge from Hanil Science Industrial Co., Korea) at 10.000 rpm and 25°C for 20 minutes to eliminate the air bubbles formed during the homogenization step. The solutions were also incorporated with the previously formed emulsions producing CP1%, CP3% and CP6%. The pectin/copaiba oil films were obtained in a coating equipment (Mathis® KTF-S-B, Germany) by continuous casting. Aqueous mixtures were poured in a coating device where they were spread onto a polyester sheet conveyor using a doctor knife type B. The wet layer thickness was controlled at 1.5 mm by setting up accurately (± 0.01 mm) the knife height above the conveyor. The wet layer was then conveyed at rolling speed of 10 cm min^{-1} across two convective air oven running at 80 °C. The dried film was collected at the last oven outlet. PEC/CP biopolymers films having CP loadings of 1, 3 and 6 wt.% (dry pectin mass basis) were produced. All films were conditioned at $50 \pm 5\%$ relative humidity (RH) for 72 h prior to testing.

2.5 Thermogravimetric Analyses (TG)

Film samples (5-6 mg) were accurately weighed in a platinum pan and heated from 25 to 600°C at a rate of $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, within an atmosphere comprising synthetic air (21% O₂) flowing at 40 mL·min⁻¹. Sample weight was monitored by a high-precision balance within an atmosphere comprising nitrogen flowing at 60 mL·min⁻¹ as function of temperature on a TA Q500 (TA Instruments, Inc., New Castle, USA) equipment in order to obtain thermogravimetric (TG) and derivative TG (DTG) curves.

2.6 FT-IR Vibrational Spectroscopy

Fourier Transform Infrared Spectroscopy measurements were obtained using a FTIR model Vertex 70 Bruker spectrophotometer (Bruker, Germany) equipped with a single reflection diamond crystal ATR module. Spectra were recorded at a spectral range between 400 and 4000 cm^{-1} at a scan rate of 32 scans and spectral resolution of 4 cm^{-1} .

2.7 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Morphological characterization was performed using a JSM-6510 microscope (JEOL Ltd., Japan) running at 1–5 kV and a working distance of between 2 and 3 mm. Cross-sectional views of polymer samples were prepared by freeze-fracturing in a liquid nitrogen bath (-165°C for 3 minutes). All samples were coated with gold (~ 5 nm) in an argon atmosphere. Nanoparticle samples were prepared by deposition of powders on conductive graphite paint (SPI Supplies, USA). All images were recorded using the secondary electron mode.

2.8 Mechanical properties

Elastic modulus (E , MPa), tensile strength (σ_T , MPa), and elongation at break (ϵ_B , %) of the films were determined following the ASTM D882-09 standard (ASTM, 2009). The mechanical tests were performed on specimen strips (10 cm \times 1 cm) using an EMIC DL3000 Universal Testing Machine (EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio LTDA, Brazil) equipped with a 10 kgf (98.06 N) load cell. Samples were preconditioned at $50 \pm 3\%$ relative humidity for at least 48 h prior to testing. A clamp-to-clamp distance of 100mm and cross-head speed of 10 mm min^{-1} were used in these experiments. Film thickness was previously measured at three random positions of each specimen using a digital micrometer (Mitutoyo, Japan). Five repetitions were performed for each film composition, and mean values were reported.

2.9 Antimicrobial properties

Stock cultures of *E. coli* (ATCC 11229) and *S. aureus* (ATCC 6538) were maintained at -80°C until grown in tubes with tryptic soy broth (TSB) (Acumedia Manufactures, Inc., Lansing, MI) at 37°C for 24 h, and then in different tubes with TSB at 37°C for 12 h. The suspensions were

streaked on solidified tryptic soy agar (TSA) (Acumedia Manufactures, Inc.) and incubated at 37°C for 18 and 24 h. Disk inhibition tests were performed according to CLSI (2012). Colonies isolated from the cultures were inoculated into 0,85% w/v NaCl solutions until 0.5 McFarland standard turbidity was matched (10^8 CFU mL⁻¹). The suspensions were plate with swabs onto solidified Mueller Hinton agar (Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD). Film disks (1 cm diam) were exposed to UV light (110 V and 254 nm) for 2 min on each side before being placed at the midpoint of the inoculated Petri dishes, which were incubated at 37 °C for 16-18 h. The diameters of the inhibition zones around the films (colony-free areas) were measured to the nearest 0.01mm with a digital caliper (Mitutoyo Corp.), and the growth below the film disks was visually evaluated.

2.10 Biodegradation

The polymer films were subjected to respirometry testing to quantify the production of carbon dioxide released by microbial respiration and to evaluate their biodegradation, according to the NBR 14283 - ABNT (ABNT, 1999). Biometer flasks used as originally suggested by Bartha and Pramer (Bartha & Pramer, 1965), each containing 50 g of soil + polymer sample (duplicate) were incubated at 28°C ± 2°C for 28 days. CO₂ production was measured volumetrically at intervals of approximately 24 h. The tests of biodegradation by the respirometry are described in Campos and co-workers (2007) paper, which gives details of the Brazilian standard (ABNT - NBR 14283, 1999).

2.11 Statistical analyses

The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Tukey test at a confidence level of 95% ($p < 0.05$). All statistical calculate were performed with the software Origin, version 6.0 (Origin Lab, Northampton, MA, USA).

3. Results and discussion

3.1 Droplet Size, Zeta-potencial and Polydispersity Index (PdI)

The average diameter of the droplets, zeta potential and nanoemulsion polydispersity index at the moment of preparation, after 24 and 72 hours are showed on table 1.

Table 1 Droplet sizes, zeta potential and polydispersity index of copaiba aqueous nanoemulsions

Copaiba oil (wt.%)	Droplet diameter (nm)	Zeta potencial (mV)	PdI
0 hours			
1	41.2 ± 0.4 ^c	-35.0 ± 1.6 ^a	0.30 ± 0.03 ^a
3	52.3 ± 0.5 ^b	-32.0 ± 0.8 ^a	0.20 ± 0.01 ^a
6	68.9 ± 0.4 ^a	-30.0 ± 0.1 ^a	0.20 ± 0.01 ^a
24 hours			
1	114.1 ± 1.0 ^a	-25.0 ± 0.5 ^a	0.50 ± 0.04 ^a
3	116.8 ± 1.8 ^a	-21.0 ± 0.2 ^a	0.20 ± 0.01 ^b
6	135.5 ± 0.4 ^b	-17.0 ± 0.4 ^a	0.20 ± 0.01 ^b
72 hours			
1	120.7 ± 0.9 ^b	-17.0 ± 0.4 ^a	0.50 ± 0.07 ^a
3	121.6 ± 0.6 ^b	-16.0 ± 0.6 ^a	0.20 ± 0.01 ^b
6	152.9 ± 1.0 ^a	-15.0 ± 0.5 ^a	0.20 ± 0.01 ^b

Averages followed by different lowercase letters in the same column differ from one another ($p < 0.05$), through the Tukey test.

For zero time, the nanoemulsions presented values varying between 41.2 and 68.9 nm, while after 24 hours they varied between 114.1 and 135.5 nm. After 72 hours, the values varied between 120.7 and 152.9 nm. A significant difference ($p < 0.05$) in the average droplet diameter in function of the concentration and time is perceivable, with an increase during storage time. This increase may be related to the Ostwald ripening phenomenon, where the smaller oil droplets diffuse through the continuous phase and deposit themselves in larger droplets, therefore causing an increase in their average dimensions (Kumari et al., 2018; Terjung, Löffler,

Gibis, Hinrichs, & Weiss, 2012). The nanoemulsion with 1wt.% of copaiba oil was the one which presented the smallest droplet size. In all storage times, the nanoemulsions droplet sizes were all contained in the nanometric scale.

Dias et al. (2014) prepared copaiba oil nanoemulsions through spontaneous emulsification methods and high pressure homogenization, techniques which respectively apply low and high energy and they obtained average diameter values for both varying between approximately 160 to 300 nm.

This difference is related to the smaller concentrations of oil used in this study, from 1 to 6%, while Dias et al. (2014) used concentrations of 10 and 20%. The increase in oil concentration causes an increase in dispersed phase viscosity and, consequently, reveals an increase in flux resistance and in restricted rates of droplet breakage (Tang, Manickam, Wei, & Nashiru, 2012).

The ζ -potential is an indicator that the nanoemulsion droplets possess significantly strong repulsion forces to prevent coalescence from happening, keeping them stable and being capable of influence from interface changes with the dispersing medium (Roland, Piel, Delattre, & Evrard, 2003). At zero time, the nanoemulsions presented values between -30mV and -35mV. Therefore, they demonstrate sufficient potential to create energetic barriers between the droplets, preventing coalescence (Shanmugam & Ashokkumar, 2014). It is suggested that the use of the Tween 80 surfactant, used to stabilize the oil droplets, had made the superficial charge of the nanoemulsion droplet more negative, most likely due to the adsorption of OH⁻ ions in the oil/water interface or the atmospheric dissolved CO₂ HCO₃⁻ and CO₃²⁻ ions (Liu, Sun, Li, Liu, & Xu, 2006; Marinova et al., 1996). Moreover, the negative zeta potential values may be associated to other components in the copaiba oil, such as the resinous acids that may divide themselves in the nanoemulsion interface (Leandro et al., 2012). After 72 hours of storage, a decrease in zeta potential may be observed, related to a larger tendency of nanoemulsion flocculation, denoting an inadequate electrostatic repulsion on the droplets surfaces (Maruno & da Rocha-Filho, 2010).

The nanoemulsions stability may be related to the relative magnitude of van der Waals attractive forces and the repulsive interactions (electrostatic and steric) between the dispersed phase droplets due to the presence of the non-ionic Tween 80 surfactant. The surfactants

promote a reduction in interfacial oil/water tensions, hindering natural destabilization processes which occur in the emulsions, such as Ostwald ripening and coalescence (Liu et al., 2006; Solans, Izquierdo, Nolla, Azemar, & Garcia-Celma, 2005). Also, the nanometric size of the droplets allows the diffusion rate or brownian motion to surpass the force of gravity, therefore preventing the phenomena of instability (Fernandez, André, Rieger, & Kühnle, 2004).

The formulations containing 1, 3 and 6% of copaiba oil, during the observed period, presented PDI values varying between 0.2 and 0.5, indicating a unimodal behavior, with a narrow distribution of droplet sizes in the formulations (Frozza et al., 2010). Despite the fact that the droplet sizes grew, the PDI value remained under 0.6, indicating a homogeneity of the droplets in the formulations (Tang et al., 2012).

3.2 Thermal properties

The thermogravimetric analysis (TGA) was made to monitor the variation between the samples masses, in function of a temperature programming, and to evaluate the thermal stability of the biopolymers.

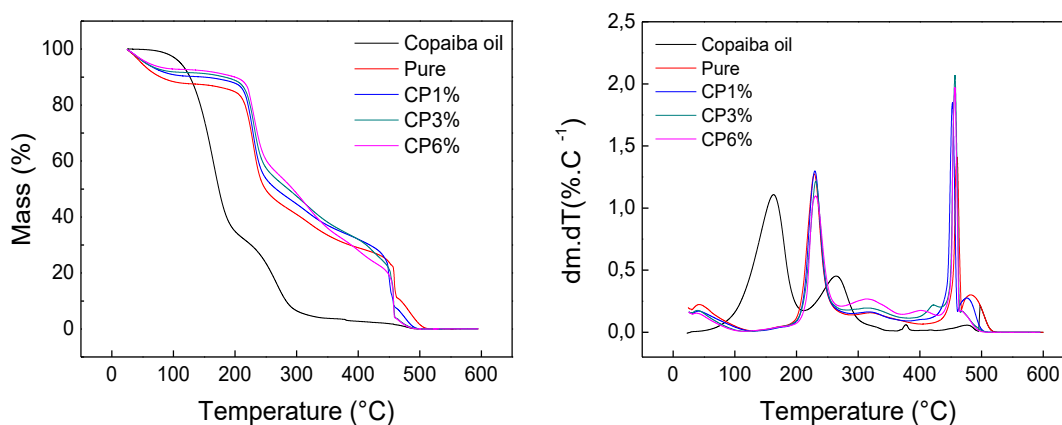


Figure 1 Thermogravimetric curves of copaiba oil and the biopolymers

Copaiba oil is a natural oil-resin composed of a solid, resinous and non-volatile fraction, comprehending the diterpenes. This resinous and viscous fraction is diluted in another fraction, a volatile and fluid essential oil, including sesquiterpenes such as α -humulene, α and β -selinene, β -bisabolene and β -caryophyllene (Veiga, Rosas, Carvalho, Henriques, & Pinto,

2007). Due to the existence of different types of oil-resins, each fraction differs and, consequently, the copaiba oil contains a varied composition.

The copaiba oils thermogram indicates that the process of thermal decomposition was divided in three events. The first event (50-215°C) is related to the vaporization of the volatile fraction, pertaining to the sesquiterpenes above 170°C; the second event (220-380°C) was explained as the solid fractions boiling point, pertaining to the diterpenes above 260°C and the third event ($T > 380^\circ\text{C}$) was attributed to the degradation of the reminescent substances (Favvas, Kouvelos, Papageorgiou, Tsanaktsidis, & Mitropoulos, 2015; Hazra, Alexander, Dollimore, & Riga, 2004; Svetlichny et al., 2017).

In general, the DTG curve for the pure film presented three defined phases of mass loss. The first one occurred between 50 and 150°C, corresponding to the elimination of physically connected water and the loss of low molar mass volatile substances. The second phase occurred between 180 and 300°C, these events may be related to the thermal degradation of the pectin, originating from the depolymerization of the polymeric chains, the liberation of CO₂, H₂O and CO and the generation of aliphatic composites. The third phase ($T > 400^\circ\text{C}$), related to the combustion of carbonaceous aromatic residue (Gorrasi, Bugatti, & Vittoria, 2012). It was observed that the thermal behavior of the biopolymers was modified after the addition of the copaiba oil, particularly the apparition of the degradation peak around 370°C, referring to the resinous fraction of the oil.

An important thermal parameter given by the thermogravimetry is the initial temperature of thermal degradation (T_{onset}), since it corresponds to the materials thermal stability. For the copaiba oil, it was approximately 90°C while for all the other films it was approximately 215°C. Therefore, the addition of copaiba oil to the concentrations of 1, 3 and 6% (% wt.) originated similar values to T_{onset} ($p > 0,05$).

The results found of T_{onset} evidenced that the drying temperature (80°C) used during the continuous *casting* process was adequate for the confection of the biopolymers, since both the composites present in the oil and the biopolymers presented degradation temperatures over 90 and 150°C, respectively.

3.3 Fourier transformed infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

The infrared spectroscopy was applied in order to detect chemical interactions between the pectin and copaiba oil. Figure 2 shows the FT-IR spectrum.

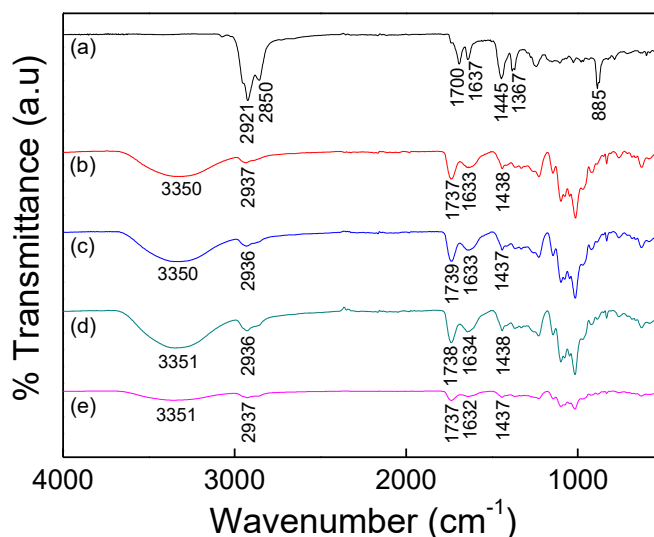


Figure 2 FTIR spectra collected in transmittance mode for (a) copaiba oil; (b) neat; (c) CP1%; (d) CP3% and (e) CP6%

The pure pectin films spectrum (Fig. 2b) showed typical vibration brands of 3370 – 3350 cm^{-1} related to the O-H stretching of water molecules and the pectins hydroxyl groups. The band centered around 2937 cm^{-1} was attributed to the elongation of C-H connections of pyranoid ring carbons. The band at 1737 cm^{-1} was clearly observed and is related to the C=O stretching vibration of the carboxylic groups and esters. The vibration bands below 1000 cm^{-1} are of complex nature and englobe the polysaccharides “fingerprint” region. Also, in the biopolymer spectrum, two additional vibration bands related to the carboxylic groups in their carboxylate form were observed: asymmetric elongation at 1633 cm^{-1} and symmetric stretching at 1438 cm^{-1} . The spectral region of 1200-1000 cm^{-1} is related to the C-O and C-C vibrations of glycosidic connections and pyranoid rings (Synytsya, Čopíková, Matějka, & Machovič, 2003).

The copaiba oil infrared spectrum (Fig. 2a) presented bands which are characteristic of its composition, with special mention of the region between 2921 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} , attributed

to axial deformations of C-H connections in aliphatic hydrocarbonates, like the sesquiterpenes and other organic composites found in copaiba oil (Bonan et al., 2017).

Bands in 1700 cm^{-1} are attributed to carbonyl groups found in diterpenes such as copalic acid. The bands from 1693 cm^{-1} to 1637 cm^{-1} refer to the axial deformation of the acid carbonyl of carboxylic acids. Bands from 1445 cm^{-1} to 1369 cm^{-1} refer to the axial deformations of C-H connections. The band in 1367 cm^{-1} referring to the CH_3 connected to the acid carbonyl. And the band in 885 cm^{-1} is characteristic of angular olefine deformations (Fayad, Zanetti-Ramos, Barreto, Soldi, & Minatti, 2013).

The pectin film spectrums incorporated with different concentrations of copaiba oil presented spectrums similar to the pure pectin film. This indicates that there was no interaction between the copaiba oil active groups and the pectin functional groups. Therefore, these composites were free, possessing the ability to act as inhibitors of possible microorganisms (Altiok, Altiok, & Tihminlioglu, 2010). A similar behavior was observed by Nisar et al. (2018) when they added clove oil to the pectin matrix. They observed no structural changes in the spectrums of the films incorporated with the oil, possibly attributing the effect to the low concentration of existing oil.

3.4 Scanning Electron Microscopy

The transversal sections surface SEM and the biopolymers fracture in the presence and absence of copaiba oil were analyzed with the aim of evaluating the droplets morphology and distribution on the films matrix. Figure 3 represents the typical morphology of the pectin films.

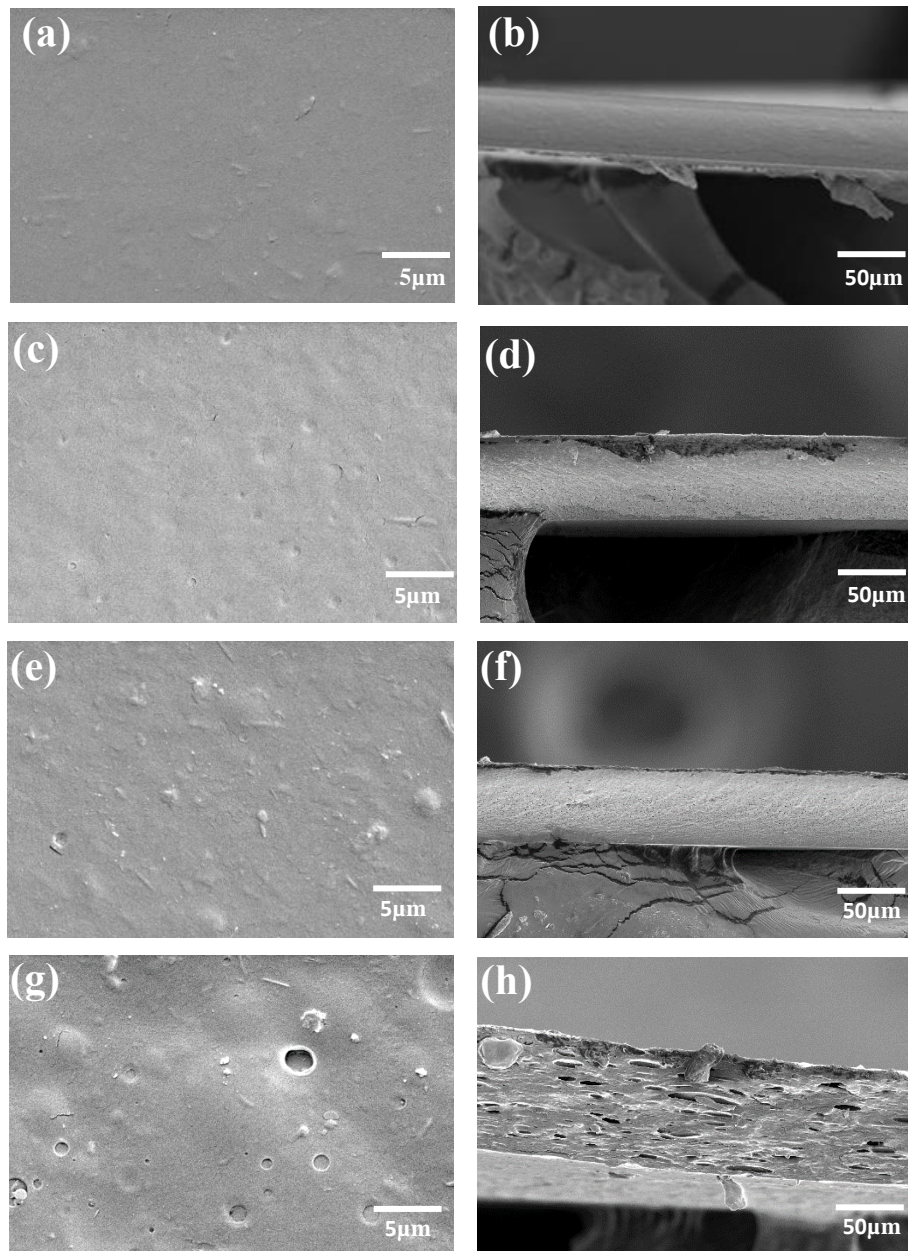


Figure 3 Surface micrographies and bipolymer fractures (a) and (b) Neat; (c) and (d) CP1%; (e) and (f) CP3%; (g) and (h) CP6%

As expected, the pure pectin films surface presents a homogeneous and compact microstructure, without great faults. However, the pectin films incorporated with copaiba oil showed a few imperfections, such as pores and oil agglomerations. Therefore, the oil affected the polymeric chains organization and modified the films microstructure. This effect may be

associated to the decrease in traction resistance seen in the uniaxial traction tests. By the SEM images of films fractures, it can be observed that the films prepared with 1% and 3% (% wt.) of copaiba oil presented smaller micropores when compared to the ones with 6% (% wt.) of oil. The average pore size was of approximately 2.6 μm , 3.4 μm and 5.2 μm for the samples CP1%, CP3% and CP6%, respectively. An increase in roughness as the concentration of oil increased is noticeable, indicating the migration of aggregates to the top of the film during the drying process, leading to superficial irregularities, with the occurrence of, for example, creaming and oil droplet flocculation, resulting in the formation of larger pores, denoting films with structures similar to those of a sponge (Sánchez-González, Chiralt, González-Martínez, & Cháfer, 2011). This effect is more pronounced in the film with 6 wt.% concentration of copaiba oil. Similar observations were made for pectin films incorporated with the essential oil of cloves (Nisar et al., 2018).

3.5 Mechanical properties

A study of the mechanical behavior of a material is essential to the evaluation of its performance for a specific application. For that, it is necessary to make it undergo tests that simulate the real conditions which it will be exposed (Grigoriadou et al., 2011). The mechanical parameters of the biopolymers are summarized on Table 2. Figure 4 shows representative curves of the tensile deformation of these pure biopolymers and with the addition of copaiba oil.

It is observed that the copaiba oil incorporation caused structural changes in the biopolymers, leading to different values of elastic modulus (E), elongation at break (ϵ_B) and tensile strength (σ_T) in comparison to the pure pectin biopolymer.

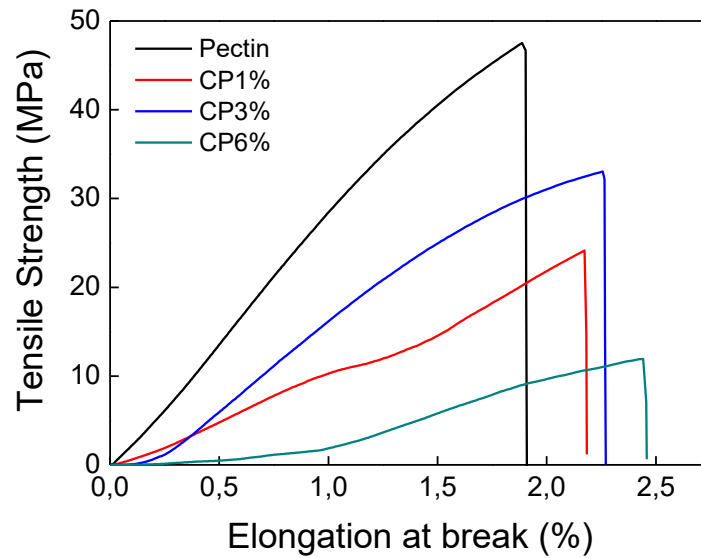


Figure 4 Representative stress-strain curves of pectin biopolymers with different concentrations of copaiba oil

Table 2 Elastic modulus (E), elongation at break (ϵ_B) and tensile strength (σ_T) of the pectin biopolymers and with copaiba oil in concentrations of 1, 3 and 6 wt.%.

Sample	Thickness (mm)	Elastic modulus (MPa)	Elongation at break (%)	Tensile strength (MPa)
Pectin	0.04 ± 0.01^a	1589 ± 201^a	2.1 ± 0.9^a	40.8 ± 6.5^a
CP1%	0.05 ± 0.01^a	1347 ± 135^a	2.3 ± 0.5^a	25.6 ± 5.1^b
CP3%	0.06 ± 0.01^b	1289 ± 106^a	2.4 ± 0.9^a	24.0 ± 6.4^b
CP6%	0.06 ± 0.02^b	853 ± 159^b	3.4 ± 0.2^b	12.4 ± 4.7^c

Averages followed by different lowercase letters in the same column differ from one another ($p < 0.05$), through the Tukey test.

Thickness values of pectin films are shown in Table 2. While the addition of 1% of copaiba oil did not affect film thickness ($p > 0.05$), the films added at the concentration of 3% and 6% were thicker ($p < 0.05$) than those which contained only pectin. This is attributable to the increased solid contents in copaiba-oil-containing film-forming solutions when compared with pectin control films, leading to thicker dried films (Table 2).

The incorporation of copaiba oil resulted in a gradual decrease of E and σ_T , while ϵ_B ($p < 0.05$) grew. In this study, σ_T dropped from 40.8 to 12.4 MPa, the elastic modulus dropped from 1589 to 853 MPa and the elongation increased from 2.1 to 3.4%, while the oil concentration grew. However, there was a decline of approximately 30% and 54% in the tensile strength and the elastic modulus, respectively. Regarding the elongation, an increment of approximately 62% of this property may be observed. The addition of the copaiba oil at a concentration of 6% noticeably led to significant drops in E and σ_T , with a simultaneous growth of ϵ_B ($p < 0.05$), implicating in films with low stiffness and good flexibility (Gilfillan, Moghaddam, & Doherty, 2014). This result suggests a plastifying effect of the copaiba oil on the pectin matrix (Zullo & Iannace, 2009). According to Kokoszka, Debeaufort, Hambleton, Lenart, & Voilley (2010), plasticizers cause a weakening of the molecular interactions between polymeric chains causing an increase in free volume and molecular mobility, leading to a decrease in stiffness and an improvement in the extensibility and flexibility of the films. In literature, there are reports demonstrating that a reduction of the polysaccharide-based films tensile strength occurs when hydrophobic composites, such as lipids are added to its matrix. (Arrieta, Peltzer, Garrigós, & Jiménez, 2013; Giménez, López de Lacey, Pérez-Santín, López-Caballero, & Montero, 2013; Otoni et al., 2014). This effect on the reduction may be attributed to the development of a heterogeneous filmogenic structure, presenting discontinuities in the polymeric network, triggered by the lipids disperse phase (Perez-Gago & Krochta, 2001; Sánchez-González et al., 2011; Shellhammer & Krochta, 1997). These results are according to the micrographies presented previously, in Figure 3. A similar behavior was found in literature when the mechanical properties of polysaccharide-based films combined with oils were analyzed (Kanmani & Rhim, 2014; Kavooosi, Derakhshan, Salehi, & Rahmati, 2018; Nur Fatin Nazurah & Nur Hanani, 2017; Rodrigues et al., 2018).

3.6 Antimicrobial activity

The disc diffusion test was made in order to evaluate the biopolymers containing copaiba oil antimicrobial activities against *E. coli* and *S. aureus*.

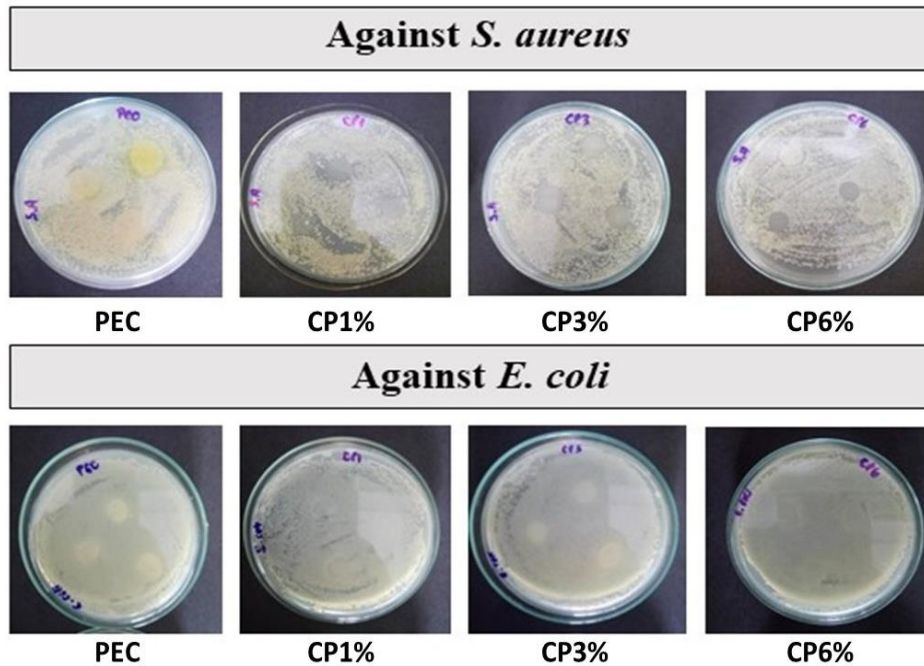


Figure 5 Antibacterial test done in Petri dishes with pectin/copaiba oil biopolymers

As expected, the films without the addition of copaiba oil presented no antimicrobial effect, indicating that the pectin presents no antimicrobial properties against the tested bacteria.

In the antibacterial test, the samples containing copaiba oil presented no inhibition zone around the discs. However, no bacterial spread to the agar in the area directly below the film samples was noticed, for all three studied concentrations. This result indicates that, in all likelihood, the bacterial inhibition occurred through direct contact with the surface of the biopolymers containing copaiba oil, denoting that the oil diffusion on the film was small.

Therefore, a bacteriostatic effect was observed on the films, preventing the bacteria growth, that is, maintaining it in the stationary growth phase (Pankey & Sabath, 2004). The use of packaging with bacteriostatic action by the food industry is a viable strategy since they may prolong the food shelf lives, maintaining their integrity and preventing that these bacteria put the medium at hand at risk. Similar results were reported by Morelli et al. (2015) when they studied films of polylactic acid and copaiba oil.

The results regarding the *E. coli* and *S. aureus* cultures support those presented by the FTIR, since they presented inhibition by contact, evidencing that the oils are free to act on the microorganisms.

3.7 Biodegradation

The influence of the incorporation of copaiba oil on the biodegradation of the pectin biopolymer was investigated. Figure 6 shows the evolution of CO₂ in the samples in soil.

The results obtained in the respirometric tests during the 28 observed days evidenced that the four analyzed materials underwent aerobic biodegradation in soil, which is indicated by the more rapid evolution of CO₂ – mineralization – in the tubes in which they were contained in relation to those that contained only the control sample (soil), which presented less evolution.

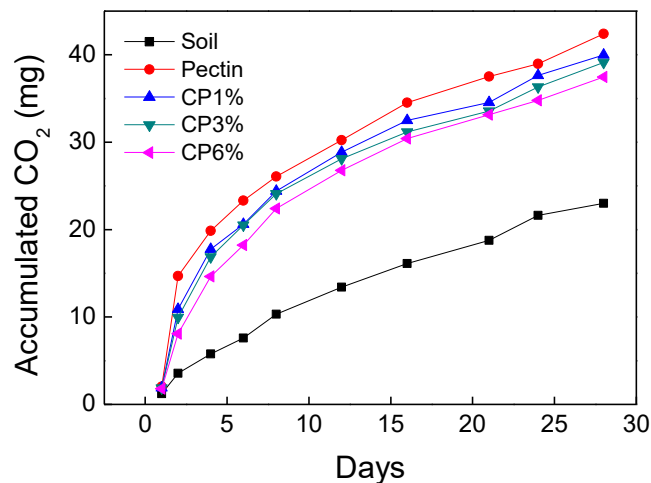


Figure 6 Cumulative CO₂ production during 28 days of incubation in soil

It is noticeable that the pure biopolymer presented the largest CO₂ evolution when compared to the other samples. This is due to the presence of carbohydrates, such as glucose, fructose and sucrose, which are more easily assimilable by microorganisms. The degradation of pectic substances may follow two main routes: depolymerization through β -elimination under action of pectate lyases and pectin lyases of microbiological origin or by demethylation with the help of the pectinesterase, followed by the acid hydrolysis of the $\alpha(1\rightarrow4)$ connections

by polygalacturonases (Singthong, Cui, Ningsanond, & Goff, 2004). Therefore, it is suggested that the biodegradation process had followed these routes.

Through Figure 6, two distinct phases of the biodegradation process are observed. An initial phase in which a sharp increase in the formation of carbon dioxide occurs and, after 20 days, it is possible to observe a phase in which the production of CO₂ tends to stabilize. It is observable that the inclusion of copaiba caused an incremental decrease in CO₂ evolution, throughout the increase in its concentration, hindering the biopolymers biodegradation.

According to Pepper and his coworkers (1996), in the soil there is a predominance of bacteria pertaining to the genera *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and the fungi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria* and *Rhizopus*. In the literature, copaiba oil demonstrated antimicrobial potential against many microorganisms, including *Pseudomonas spp* (Marangon et al., 2017; Masson, Salvador, Polizello, & Frade, 2013), *Aspergillus flavus* (Deus, Alves, & Arruda, 2011), *Bacillus subtilis* (Santos et al., 2008; Morelli et al., 2015), *Fusarium spp*, *Penicillium spp* (Santos et al., 2013), *Rhizopus spp* (Santos et al., 2013). This antibacterial activity of the copaiba oil is attributed to the combination of diterpenes and sesquiterpenes that affect the integrity of the microorganisms cell wall, causing a decrease in cellular volume and subsequently a liberation of cytoplasmic composites (Santos et al., 2008; Santos et al., 2013). Therefore, it is suggested that the presence of free copaiba oil composites had caused a certain inhibition of the microbial growth, decreasing CO₂ evolution in the biodegradation process. These results may be associated to those found in the antimicrobial and FTIR tests.

4 Conclusion

Continuous *casting* is an emerging polymer processing technique and it already demonstrates great advantages in film and polymeric composite production. The production of biodegradable plastics from polysaccharides still needs the establishment of scalable processing techniques that do not cause biopolymer degradation and generate plastics with adequate aesthetic quality for the market. These plastics must also present properties which are capable of meeting diverse project specifications. In this case, the development of pectin films through

continuous casting, as proposed in this project, becomes relevant, since the technique combines large-scale production with plastics of excellent quality, complemented with the addition of copaiba oil nanoemulsions which give antibacteriostatic properties to the biopolymers, extending the shelf life and inhibiting/controlling the multiplication of pathogenic and deteriorative microorganisms in foods. Also, the incorporation of the oil in nanometric scale lead to significant changes in the mechanical properties and biodegradation of the pectin films, in a manner that presented a potential application in the food industry, also contributing directly to the reduction of the environmental impact of plastic packaging.

Acknowledgment

The authors are grateful to Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) for the facilities and equipment and CAPES (1744107), FAPEMIG (APQ-01505-15, APQ-00906-17) and CNPq (403357/2016-0, 302469/2018-4, 141823/2017-8) for the financial support.

REFERENCES

- ABNT. (1999). Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1–8.
- ASTM D882-09. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In Annual Book of American Standard Testing Methods; ASTM: Philadelphia, PA, 2009.
- Altiok, D., Altiok, E., & Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(7), 2227–2236. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4065-x>
- Arfat, Y. A., Benjakul, S., Prodpran, T., Sumpavapol, P., & Songtipya, P. (2014). Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 41, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.023>
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., Garrigós, M. D. C., & Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.002>

- Bartha, R., & Pramer, D. (1965). Features of flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*. <https://doi.org/10.1097/00010694-196507000-00011>
- Bonan, R. F., Bonan, P. R. F., Batista, A. U. D., Perez, D. E. C., Castellano, L. R. C., Oliveira, J. E., & Medeiros, E. S. (2017). Poly(lactic acid)/poly(vinyl pyrrolidone) membranes produced by solution blow spinning: Structure, thermal, spectroscopic, and microbial barrier properties. *Journal of Applied Polymer Science*, *134*(19), 1–9. <https://doi.org/10.1002/app.44802>
- Bonan, R. F., Bonan, P. R. F., Batista, A. U. D., Sampaio, F. C., Albuquerque, A. J. R., Moraes, M. C. B., Oliveira, J. E. (2015). In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. *Materials Science and Engineering: C*, *48*, 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.021>
- Campos, A., Martins-Franchetti, S.M., Marconato, J.C., Agnelli, J.A.M., Monteiro, M. (2007). Biodegradation of blend films in soil and soil with chorume. I. PVC/PCL. *Research Journal of Biotechnology*, *2*(4), 20-25. <https://doi.org/10.1002/biot.200790008>
- Deus, R. J. A., Alves, C. N., & Arruda, M. S. P. (2011). Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *13*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000100001>
- Dias, D. de O., Colombo, M., Kelmann, R. G., Kaiser, S., Lucca, L. G., Teixeira, H. F., ... Koester, L. S. (2014). Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. *Industrial Crops and Products*, *59*, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.007>
- Dos Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Veiga, V. F., Pinto, A. C., & Nakamura, C. V. (2008). Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *103*(3), 277–281. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000015>
- Dos Santos, E. C. G., Donnici, C. L., da Silva Camargos, E. R., de Rezende, A. A., de Aguiar Andrade, E. H., Soares, L. A. L., ... das Graças Almeida, M. (2013). Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*. *Journal of Medical Microbiology*, *62*(PART7), 1032–1037. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.060046-0>
- Favvas, E. P., Kouvelos, E. P., Papageorgiou, S. K., Tsanaktsidis, C. G., & Mitropoulos, A. C. (2015). Characterization of natural resin materials using water adsorption and various advanced techniques. *Applied Physics A*, *119*(2), 735–743. <https://doi.org/10.1007/s00339-015-9022-6>
- Fayad, S. J., Zanetti-Ramos, B. G., Barreto, P. L. M., Soldi, V., & Minatti, E. (2013). Morphology of soy protein isolate at oil/water and oil/air interfaces. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *24*(6), 1012–1017. <https://doi.org/10.5935/0103->

5053.20130130

- Fernandez, P., André, V., Rieger, J., & Kühnle, A. (2004). Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *251*(1–3), 53–58. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2004.09.029>
- Frozza, R. L., Bernardi, A., Paese, K., Hoppe, J. B., Da Silva, T., Battastini, A. M. O., Salbego, C. (2010). Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *6*(6), 694–703. <https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1161>
- Gelmini, F., Beretta, G., Anselmi, C., Centini, M., Magni, P., Ruscica, M., ... Maffei Facino, R. (2013). GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *International Journal of Pharmaceutics*, *440*(2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.021>
- Gilfillan, W. N., Moghaddam, L., & Doherty, W. O. S. (2014). Preparation and characterization of composites from starch with sugarcane bagasse nanofibres. *Cellulose*, *21*(4), 2695–2712. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0277-4>
- Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2013). Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.014>
- Gorrasi, G., Bugatti, V., & Vittoria, V. (2012). Pectins filled with LDH-antimicrobial molecules: Preparation, characterization and physical properties. *Carbohydrate Polymers*, *89*(1), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.061>
- Grigoriadou, I., Paraskevopoulos, K. M., Chrissafis, K., Pavlidou, E., Stamkopoulos, T. G., & Bikiaris, D. (2011). Effect of different nanoparticles on HDPE UV stability. *Polymer Degradation and Stability*, *96*(1), 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.10.001>
- Hazra, A., Alexander, K., Dollimore, D., & Riga, A. (2004). Characterization of some essential oils and their key components. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *75*, 317–330. <https://doi.org/10.1023/B:JTAN.0000017352.86803.6d>
- IMARC Group (2017). Pectin Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2018-2023.
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014). Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydrate Polymers*, *102*(1), 708–716. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.099>
- Kavoosi, G., Derakhshan, M., Salehi, M., & Rahmati, L. (2018). Microencapsulation of zataria

- essential oil in agar, alginate and carrageenan. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.010>
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Hambleton, A., Lenart, A., & Voilley, A. (2010). Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(3), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.01.006>
- Kumari, S., Kumaraswamy, R. V., Choudhary, R. C., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., ... Saharan, V. (2018). Thymol nanoemulsion exhibits potential antibacterial activity against bacterial pustule disease and growth promotory effect on soybean. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24871-5>
- Leandro, L. M., De Sousa Vargas, F., Barbosa, P. C. S., Neves, J. K. O., Da Silva, J. A., & Da Veiga-Junior, V. F. (2012). Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules*, 17(4), 3866–3889. <https://doi.org/10.3390/molecules17043866>
- Liu, W., Sun, D., Li, C., Liu, Q., & Xu, J. (2006). Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303(2), 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.07.055>
- Marangon, C. A., Martins, V. C. A., Leite, P. M. F., Santos, D. A., Nitschke, M., & Plepis, A. M. G. (2017). Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria. *Industrial Crops and Products*, 99, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.007>
- Marinova, K. G., Alargova, R. G., Denkov, N. D., Velev, O. D., Petsev, D. N., Ivanov, I. B., & Borwankar, R. P. (1996). Charging of Oil–Water Interfaces Due to Spontaneous Adsorption of Hydroxyl Ions. *Langmuir*, 12(8), 2045–2051. <https://doi.org/10.1021/la950928i>
- Maruno, M., & da Rocha-Filho, P. A. (2010). O/W nanoemulsion after 15 years of preparation: A suitable vehicle for pharmaceutical and cosmetic applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31(1), 17–22. <https://doi.org/10.1080/01932690903123775>
- Masson, D. S., Salvador, S. L., Polizello, A. C. M., & Frade, M. A. C. (2013). Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(4), 664–669. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500006>
- Morelli, C. L., Mahrous, M., Belgacem, M. N., Branciforti, M. C., Bretas, R. E. S., & Bras, J. (2015). Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. *Industrial Crops and Products*, 70, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.036>

- Müller, P., Renner, K., Móczó, J., Fekete, E., & Pukánszky, B. (2014). Thermoplastic starch/wood composites: Interfacial interactions and functional properties. *Carbohydrate Polymers*, *102*(1), 821–829. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.083>
- Nisar, T., Wang, Z.-C., Yang, X., Tian, Y., Iqbal, M., & Guo, Y. (2018). Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *106*, 670–680. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.08.068>
- Nur Fatin Nazurah, R., & Nur Hanani, Z. A. (2017). Physicochemical characterization of kappa-carrageenan (*Euchema cottoni*) based films incorporated with various plant oils. *Carbohydrate Polymers*, *157*, 1479–1487. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.026>
- Officinalis, C., John, B. Y., & Lloyd, U. R. I. (1898). *Copaifera officinalis*. *Lloydia (Cincinnati)*.
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A., Talens, P., & Chiralt, A. (2014). Properties of starch-hydroxypropyl methylcellulose based films obtained by compression molding. *Carbohydrate Polymers*, *109*, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.059>
- Otoni, C. G., Moura, M. R. de, Aouada, F. A., Camilloto, G. P., Cruz, R. S., Lorevice, M. V., ... Mattoso, L. H. C. (2014). Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. *Food Hydrocolloids*, *41*, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.013>
- Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, *38*(6), 864–870. <https://doi.org/10.1086/381972>
- Perez-Gago, M. B., & Krochta, J. M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(2), 996–1002. <https://doi.org/10.1021/jf000615f>
- Rodrigues, D. C., Cunha, A. P., Silva, L. M. A., Rodrigues, T. H. S., Gallão, M. I., & Azeredo, H. M. C. (2018). Emulsion films from tamarind kernel xyloglucan and sesame seed oil by different emulsification techniques. *Food Hydrocolloids*, *77*, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.003>
- Roland, I., Piel, G., Delattre, L., & Evrard, B. (2003). Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *International Journal of Pharmaceutics*, *263*(1–2), 85–94. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00364-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00364-8)
- Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*, *105*(2), 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.028>

- Santiago-Silva, P., Soares, N. F. F., Nóbrega, J. E., Júnior, M. A. W., Barbosa, K. B. F., Volp, A. C. P., ... Würllitzer, N. J. (2009). Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, *20*(1), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.006>
- Shanmugam, A., & Ashokkumar, M. (2014). Ultrasonic preparation of stable flax seed oil emulsions in dairy systems - Physicochemical characterization. *Food Hydrocolloids*, *39*, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.006>
- Shellhammer, T. H., & Krochta, J. M. (1997). Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *Journal of Food Science*, *62*(2), 390–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04008.x>
- Singthong, J., Cui, S. W., Ningsanond, S., & Douglas Goff, H. (2004). Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (Cissampelos pareira) pectin. *Carbohydrate Polymers*, *58*(4), 391–400. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2004.07.018>
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *10*(3–4), 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2005.06.004>
- Svetlichny, G., Külkamp-Guerreiro, I. C., Dalla Lana, D. F., Bianchin, M. D., Pohlmann, A. R., Fuentefria, A. M., & Guterres, S. S. (2017). Assessing the performance of copaiba oil and allantoin nanoparticles on multidrug-resistant *Candida parapsilosis*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *40*, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.05.020>
- Synytysya, A., Čopíková, J., Matějka, P., & Machovič, V. (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, *54*(1), 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00158-9)
- Tang, S. Y., Manickam, S., Wei, T. K., & Nashiru, B. (2012). Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, *19*(2), 330–345. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.07.001>
- Terjung, N., Löffler, M., Gibis, M., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2012). Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. *Food and Function*, *3*(3), 290–301. <https://doi.org/10.1039/c2fo10198j>
- Trindade, F. T. T., Stabeli, R. G., Pereira, A. A., Facundo, V. A., & Silva, A. de A. (2013). *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *23*(3), 464–470. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000038>
- Veiga, V. F., & Pinto, A. C. (2002). O Gênero *Copaifera* L. *Quimica Nova*.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200016>

- Veiga, V. F., Rosas, E. C., Carvalho, M. V., Henriques, M. G. M. O., & Pinto, A. C. (2007). Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.005>
- Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Willats, W. G. ., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008>
- Zullo, R., & Iannace, S. (2009). The effects of different starch sources and plasticizers on film blowing of thermoplastic starch: Correlation among process, elongational properties and macromolecular structure. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.007>