

# ANÁLISES DAS PROPRIEDADES FÍSICAS E ANTIMICROBIANAS DE FILMES A BASE DE AMIDO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd E *Rosmarinus officinalis* L. - LAMIACEAE

Dariane Mattei<sup>1</sup>  
 Letícia Faciolli Guimarães<sup>1</sup>  
 Fabiana Borges Padilha Ferreira<sup>1</sup>  
 Sandra Regina Da Silva Reis Dos Santos<sup>1</sup>  
 Andressa Amado Martin<sup>2</sup>  
 Zilda Cristiani Gazim<sup>1,3</sup>  
 Douglas Cardoso Dragunski<sup>1,3\*</sup>

MATTEI, D.; GUIMARÃES, L. F.; FERREIRA, F. B. P.; SANTOS, S. R. S. R. dos; MARTIN, A. A.; GAZIM, Z. C.; DRAGUNSKI, D. C. Análises das propriedades físicas e antimicrobianas de filmes a base de amido contendo óleo essencial de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd E *Rosmarinus officinalis* L. - LAMIACEAE. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 2, p. 129-136, jul./dez. 2013.

**RESUMO:** Objetivando reduzir os impactos ambientais decorrentes do acúmulo de plásticos sintéticos, estão sendo desenvolvidas embalagens derivadas de polímeros renováveis, os chamados filmes biodegradáveis. Empregados na cobertura de produtos desidratados e frescos são capazes de conservar suas características sensoriais, valor nutritivo e evitar o desenvolvimento de micro-organismos (MO). Com este intuito, foram produzidos filmes com amido acetilado, gelatina e plastificante impregnados com óleos essenciais de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd e *Rosmarinus officinalis* nas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2 e 3% (em relação à massa total do filme). Os parâmetros avaliados foram a espessura, solubilidade, opacidade e a capacidade de inibição microbiana frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Após a adição do óleo, observou-se redução na espessura nos filmes contendo *R. officinalis* quando comparados ao controle negativo (CN). Já nos filmes com *T. riparia*, os valores foram semelhantes ao CN, indicando melhor compatibilidade entre reagentes dos filmes a esse óleo. As solubilidades desses filmes aumentaram ao incorporar os óleos, exceto nos filmes com 0,25 e 1% do óleo de *T. riparia*, em que os valores ficaram próximos ao CN. A opacidade dos filmes com óleo de *R. officinalis* aumentou com o aumento da concentração deste óleo na composição do filme, porém nos filmes com *T. Riparia*, ocorreu o contrário a opacidade diminuiu com o acréscimo deste óleo nos filmes. Quanto ao filme incorporado com cloranfenicol, nos três parâmetros não houve diferenças significativas ao compará-lo com o CN. No teste microbiológico, para todos os filmes analisados, os MO demonstraram resistência comparados aos halos formados pelo controle positivo. Portanto, novos estudos deverão ser realizados, objetivando aumentar a compatibilidade dos filmes com os óleos, bem como novos óleos poderão ser analisados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alecrim. Amido de mandioca. Antimicrobiano. Filme biodegradável. Mirra.

## ANALYSIS OF PHYSICAL AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF FILMS BASED ON STARCH CONTAINING *Tetradenia riparia* (Hochst.) and *Rosmarinus officinalis* L. Codd - LAMIACEAE ESSENTIAL OIL

**ABSTRACT:** In order to reduce the environmental impacts resulting from the accumulation of synthetic plastic, packaging derived from renewable polymers are being developed, which are known as biodegradable films. Used in dried and fresh products, they are able to retain their sensory characteristics and nutritional value, as well as preventing the development of microorganisms (MO). For this purpose, films with acetylated starch, gelatin and plasticizer impregnated with *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd and *Rosmarinus officinalis* essential oils at concentrations of 0.25, 0.5, 1, 2 and 3% (relative to the total weight of the film) have been developed. This paper assessed the thickness, solubility, opacity and the capacity to inhibit *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in these films. After the addition of oil, a decrease in the thickness of film incorporated with *R. officinalis* could be observed when compared to the negative control (NC). However, the film incorporated with *T. riparia*, the values were similar to the NC, indicating better compatibility between the film reagents and this oil. The solubility of these films increased when the oils were incorporated, except for the films with concentration of 0.25 and 1% of *T. riparia* oil, in which the values were close to the NC. The opacity of the films with *R. officinalis* oil increased with the increase in the concentration of oil in the composition of the film. However, in the films with *T. riparia*, the opposite could be noticed, that is, the opacity decreased with the addition of this oil in the films. For the films with chloramphenicol, there were no significant differences for the three parameters measured when compared to the NC. In the microbiological test, for all films analyzed, the MO showed resistance compared to the inhibition formed by the positive control. Therefore, further studies should be conducted in order to increase the compatibility of the films with the oils, as well

<sup>1</sup>Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Paranaense – UNIPAR;

<sup>2</sup>Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/UNIPAR;

<sup>3</sup>Programa de Pós graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Instituto de Ciências Exatas, Agrárias, Tecnológicas e Geociências, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, cx. p. 224, CEP 87502-210, Umuarama, PR, Brasil. \*Autor para correspondência: dcdragunski@gmail.com

as analyzing new oils.

**KEYWORDS:** Rosemary. Antimicrobial. Biodegradable film. Manioc starch. Myrrh.

## ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y ANTIMICROBIANAS DE PELÍCULAS A BASE DE ALMIDÓN CONTENIENDO ACEITE ESENCIAL DE *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd E *Rosmarinus officinalis* L. – LAMIACEAE

**RESUMEN:** Buscando reducir los impactos ambientales decurrentes del amontonado de plásticos sintéticos, se están desarrollando envases derivados de polímeros renovables, las denominadas películas biodegradables. Empleados en la cobertura de productos deshidratados y frescos son capaces de conservar sus características sensoriales, valor nutricional y prevenir el crecimiento de microorganismos (MO). Para este propósito, se ha producido películas con almidón acetilado, gelatina y plastificante impregnados con aceites esenciales de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd *Rosmarinus officinalis* a concentraciones de 0,25; 0,5; 1; 2 y 3% (en relación a la masa total de la película). Los parámetros evaluados fueron la espesura, solubilidad, opacidad y la capacidad de inhibición microbiana frente a los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Después de la adición del aceite, se observó reducción en la espesura de las películas que contenían *R. officinalis* en comparación con el control negativo (CN). En las películas *T. riparia*, los valores fueron semejantes al CN, indicando mejor compatibilidad entre reactivos de las película a ese aceite. La solubilidad de esas películas aumentaron después de la incorporación de los aceites, excepto en las películas con 0,25% y 1,0% de aceite de *T. riparia*, en que los valores se quedaron cerca del CN. La opacidad de las películas con aceite de *R. officinalis* aumentó con adición mayor de la concentración de ese aceite en la composición de la película, pero en las películas con *T. Riparia* ocurrió el contrario, la opacidad disminuyó con la adición de este aceite en las películas. En la película incorporada con cloranfenicol, no hubo diferencias significativas en los tres parámetros al compararla con el CN. En las pruebas microbiológicas, para todas las películas analizadas, los MO demostraron resistencia en comparación con los halos formados por el control positivo. Por lo tanto, más estudios deben llevarse a cabo con el fin de aumentar la compatibilidad de las películas con aceites, así como nuevos aceites podrán ser analizados.

**PALABRAS CLAVE:** Romero. Almidón de mandioca. Antimicrobiana. Película biodegradable. Mirra.

### Introdução

Com o objetivo de reduzir os impactos ambientais decorrentes do acúmulo de plásticos sintéticos, pesquisadores e indústrias estão em busca de embalagens derivadas de polímeros provenientes de fontes renováveis, as quais se degradam com o tempo por meio de mecanismos naturais (MARTINS, 2010).

A produção desses filmes, denominados biodegradáveis, resulta em diversos benefícios como: baixo custo, abundância de matéria-prima, biodegradabilidade e renovabilidade (CHEN; KUO; LAI, 2009).

Empregados de maneira a substituir o uso de polímeros sintéticos, esses filmes podem levar a sociedade rumo ao desenvolvimento sustentável, reduzindo, durante a produção, a emissão de dióxido de carbono e, conseqüentemente, os efeitos sobre o aquecimento global, bem como diminuindo a toxicidade destes materiais (KOCHUMALAYIL et al., 2010).

Uma das fontes de polímeros biodegradáveis é o amido, muito empregado na cobertura de produtos desidratados e frescos (frutas e hortaliças), conservando suas características sensoriais, textura, frescor e valor nutritivo. Além disso, podem ser utilizados para fins não alimentícios, como sacos de lixo, disponíveis nos mercados da Itália, Finlândia e Dinamarca (HAUGAARD et al., 2001; MANGARAJ; GOSWAMI; MAHAJAN, 2009; FAKHOURI; GROSSO, 2003; YAMASHITA et al., 2006). Outros polissacarídeos também utilizados são os alginatos, os quais são extraídos de algas marrons. Além desses, a quitosana, obtida por desacetilação da quitina (CAMPANA; SIGNINI, 2001). Esses materiais podem ser aplicados nos alimentos por meio de imersão, varredura ou pulverização, aumentando assim o tempo de prateleira (KHWALDIA; ARAB-TEHRANY; DESOBRY, 2010; CHIU; LAI, 2010).

Todavía, alguns estudos epidemiológicos demonstram um aumento de doenças relacionadas à alimentos. Dessa forma, a utilização dos filmes biodegradáveis, além de promover benefícios na manutenção das propriedades dos alimentos já mencionadas, também pode auxiliar na redução da carga microbiana presente na superfície do alimento, quando for adicionado nestes filmes agentes antimicrobianos (PELISSARI et al., 2009).

Mediante tal fato, várias pesquisas vêm sendo realizadas demonstrando ser possível tornar essas embalagens ativas, ou seja, incorporar moléculas de antimicrobianos ao material da embalagem, proporcionando uma melhor eficiência na proteção, melhor estabilidade do agente antimicrobiano e segurança no controle de sua liberação em relação aos alimentos. Isto é de grande valia, pois quando o agente antimicrobiano é aplicado ou incorporado diretamente ao alimento, ocorre rápida perda de sua atividade, devido à diminuição da concentração de ativos em sua superfície, resultante das interações com componentes dos alimentos e diluição (GUIGA et al., 2010; SEBTI et al., 2005; PONCE et al. 2008).

Perante o exposto, a busca por substâncias naturais que possuem atividade antimicrobiana vem crescendo a cada ano. Dentre essas substâncias, destacam-se, por exemplo, os óleos essenciais de orégano, alho, manjerição, anis, coentro, erva-cidreira e canela, devido à constatação de que, em algumas pesquisas, em baixas concentrações, estes óleos possuem grande potencial frente a micro-organismos patogênicos e deterioradores (PELISSARI et al., 2009; PRANOTO et al., 2005; ZIVANOVIC; CHI; DRAUGHON, 2005).

Dentre as espécies de plantas que contêm óleos essenciais com atividade antimicrobiana, o alecrim se destaca. Cientificamente conhecido como *Rosmarinus officinalis*, é um arbusto aromático de pequeno porte da família Lamiaceae, cujas folhas abrigam pequenas glândulas, contendo óleo

aromático, apresentando ação sobre fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999).

Outra planta aromática desta família é a *Tetradenia riparia* (Hochst.)Codd, conhecida popularmente como mirra. Este arbusto consiste numa das mais aromáticas e populares plantas medicinais com propriedades antimicrobianas, antiespasmódica, antitrichomonas e antimalárica (GODOY et al., 2001). Portanto, a utilização de embalagens contendo óleos que possuem atividade antimicrobiana poderia ser uma solução alternativa para estender a vida útil e assegurar a inocuidade e conservação dos produtos alimentares (KHWALDIA; ARAB-TEHRANY; DESOBRY, 2010).

No entanto, esta área ainda requer avanços tecnológicos e novos estudos são necessários sobre o potencial de cada agente antimicrobiano, bem como sua interação com o material utilizado para produção dos filmes biodegradáveis, promovendo assim o desenvolvimento neste campo de pesquisa. Dessa forma, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *T. riparia* e *R. officinalis*, quando incorporados aos filmes biodegradáveis à base de amido, bem como analisar possíveis alterações nas suas propriedades físicas para futuro uso na conservação de alimentos.

## Material e Métodos

### Obtenção e Aquisição dos Óleos Essenciais e Cloranfenicol

Folhas de *T. riparia* foram coletadas no Horto de Plantas Mediciniais da UNIPAR (Universidade Paranaense), Câmpus Umuarama (Brasil), a 430 m de altitude em relação ao nível do mar (S23°47'55"-W53°18'48"). Uma exsicata do material botânico encontra-se catalogada sob número 120. As folhas foram coletadas em dois períodos, entre março e abril de 2011, no período da manhã. Para extração do óleo de *T. riparia*, utilizou-se aparelho tipo *Clevenger* modificado através de arraste a vapor. Foram utilizadas 300 g de folhas e 300 mL de água destilada para cada extração, sendo realizadas quatro extrações. O tempo de destilação de cada extração foi de três horas. O óleo foi retirado do aparelho, armazenado em frascos âmbar, e mantido sob refrigeração a 0 °C.

O óleo de *R. officinalis* foi adquirido da empresa Brasil Portrait®<sup>4</sup> e o padrão cloranfenicol, foi adquirido pelo laboratório Ariston®<sup>5</sup>.

### Obtenção do Filme Biodegradável

Os filmes foram produzidos a partir de uma solução de amido (3g) com sorbitol (10% em relação à massa do amido) em 100 mL de água, e outra de gelatina (10g) com sorbitol (5% em relação à massa da gelatina) em 100 mL de água, ambas aquecidas a 85°C, sendo estas misturadas, originando a solução filmogênica. Para a incorporação do óleo, realizou-se a diluição dos mesmos, nas seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 1; 2 e 3% (em relação à massa total do filme) em *tween* 80 (2% em relação à massa do filme) com 4 mL de

água. Para os controles negativos (CN), o mesmo procedimento foi realizado sem a presença do óleo. Para uma comparação com os antimicrobianos naturais, utilizou-se a mesma metodologia para obtenção de uma solução filmogênica, porém incorporando o antimicrobiano padrão, cloranfenicol (Ariston®). Para a diluição, o cloranfenicol foi dissolvido em água, sem a presença do *tween* 80 nas referidas diluições citadas acima. Desta forma, obtiveram-se sete diferentes soluções filmogênicas para cada substância. Dessas soluções, alíquotas de 10 mL foram distribuídas em placas de *teflon* de 7 cm de diâmetro e secas em estufa a 36°C por 48 horas, para elaboração dos filmes de acordo com a técnica de *casting* (YANG; PAULSON, 2000).

## Avaliação das Propriedades Físicas dos Filmes Biodegradáveis

### Espessura

As espessuras dos filmes foram determinadas utilizando-se micrômetro Mitutoyo 2046s Shock Proof. As medidas foram obtidas por meio do valor de três pontos aleatórios em diferentes zonas da superfície dos filmes (AVILA-SOSA et al., 2010).

### Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus como proposto por Gounga, Xu e Wang (2007). Os filmes foram cortados em retângulos e aderidos à parede interna da cubeta do espectrofotômetro. Foram realizadas três leituras de diferentes partes para cada filme. A opacidade foi calculada segundo a equação:

$$\text{Opacidade} = \frac{A}{x}$$

Em que:

A=Absorbância em um comprimento de onda de 450 nm

X= Espessura do filme

### Solubilidade

A determinação da solubilidade em água dos filmes foi realizada em triplicata por método adaptado descrito por Davanço (2006). Inicialmente, três discos de cada amostra de filme com 2,0 cm de diâmetro foram cortados e submetidos à secagem por 24h a 105°C, sendo posteriormente pesados. As amostras foram imersas em 25mL de água destilada, mantidas sob agitação lenta e constante por 24 h à temperatura de 25°C. Após este período, as amostras de filme restante foram retiradas e secas em estufa a 105°C por 24 horas, para determinação da massa seca final dos mesmos. A solubilidade foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{solubilidade (\%)} = 100 \left( \frac{M_i - M_f}{M_i} \right)$$

Em que:

<sup>4</sup>Brasil Portrait®, Sorocaba, SP.

<sup>5</sup>Ariston®, São Paulo, SP.

*SOL*: porcentagem de material solubilizado (%)  
*Mi*: massa inicial da amostra (massa seca inicial) (g)  
*Mf*: massa final da amostra (massa seca final) (g)

## Análise Microbiológica dos Filmes Biodegradáveis

### Micro-organismos Utilizados

Nos experimentos de avaliação das propriedades antimicrobianas foram utilizadas duas diferentes bactérias de referência, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, e um fungo, *Candida albicans* ATCC 10231.

### Controles Positivo e Negativo

Como controle positivo foi utilizado o antimicrobiano padrão Cloranfenicol 30µg (Ariston®) em disco. Como controle negativo foi utilizado o filme com adição de *Tween* 80, ou seja, sem adição de agentes antimicrobianos.

### Teste de Susceptibilidade aos Óleos Essenciais

Foram realizados antibiogramas pelo método de difusão em disco (BAUER; KIRBY, 1966), utilizando como meio de suspensão ágar Mueller-Hinton para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e ágar *Sabouraud* para a levedura *Candida albicans*. Os inóculos foram preparados com o uso de solução salina (cloreto de sódio 0,85%). A densidade da suspensão foi ajustada em cerca de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro, comparando sua turvação com o padrão 0,5 da escala de MacFarland. O inóculo foi distribuído, por meio de varredura, utilizando *swab* estéril, na superfície do ágar. Em seguida, foram colocados os discos de biofilmes impregnados com óleos essenciais com auxílio de uma pinça estéril, bem como o filme impregnado com o controle positivo. Após a aposição dos discos, as placas foram invertidas e incubadas a 36,5°C por 18 a 24 horas.

Para a avaliação da capacidade de inibição dos filmes bioativos frente aos micro-organismos testados adotou-se um método comparativo. Neste método, utilizou-se um padrão biológico de referência, o controle positivo, sendo o halo de inibição de crescimento medido, partindo da circunferência do disco até a margem na qual houve crescimento de microorganismos (BARRY; THORNSBERRY, 1991).

### Análise Estatística

A análise estatística para comparação dos resulta-

dos expressos como média e erro padrão (±)-obtidas para as amostras de filmes foi realizada utilizando ANOVA seguida de pós teste t (LSD) ao nível de 5% de significância (NUNES et al., 2006). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

## Resultados e Discussão

### Propriedades Físicas dos Filmes Biodegradáveis

Foram analisados diversos parâmetros como espessura, solubilidade em água e opacidade dos filmes biodegradáveis, já que tais características podem ser alteradas devido à adição dos óleos essenciais, influenciando assim nas propriedades de barreira, quando esses filmes forem aplicados aos alimentos, bem como interferir na aceitação do produto pelos consumidores.

Além dos óleos essenciais, também foi verificada a eficiência desses filmes à base de amido incorporado com cloranfenicol, pertencente ao grupo dos anfenicóis. O cloranfenicol é um antibiótico de amplo espectro, com ação bacteriostática e bactericida em altas concentrações. Por ser muito tóxico, deve ser reservado para infecções graves em que antibacterianos menos tóxicos são ineficazes ou contra indicados (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2009). Além disso, o uso e abuso de antibióticos nos últimos anos levou a um aumento incessante do número e tipos de micro-organismos resistentes a antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Por essas razões, a finalidade do experimento com cloranfenicol, foi analisar as interações com o filme biodegradável, verificar alterações nas propriedades físicas, bem como analisar possível alteração ou manutenção da atividade antimicrobiana ao ser submetida à metodologia de incorporação aos filmes, para meramente comparar com os filmes contendo os óleos essenciais, não sendo preconizada a utilização desses filmes com essa atividade.

### Análises Realizadas em Filmes Impregnados com Óleos Essenciais

Em uma análise visual, observou-se que a incorporação dos óleos alterou algumas propriedades dos filmes, tornando-os principalmente quebradiços, sugerindo uma possível incompatibilidade entre os óleos e os filmes. Tal fato ficou mais evidenciado para as análises realizadas no filme biodegradável incorporado ao óleo essencial de *R. officinalis* (Tabela 1), em que as amostragens dos filmes preparados nas concentrações de 0,25% e 1% não foram suficientes para a realização dos estudos.

**Tabela 1:** Valores médios de opacidade a 450nm, solubilidade em água (%) e espessura (mm) em filmes compostos de gelatina, plastificante, amido de mandioca e óleo essencial de *R. officinalis*.

Filme	Opacidade	Solubilidade	Espessura
0.50%	4.32±0.25 <sup>a</sup>	65.92±17.24 <sup>ab</sup>	0.1767±0.02 <sup>a</sup>
2%	5.88±0.25 <sup>ad</sup>	100±0 <sup>b</sup>	0.1667±0.00 <sup>a</sup>
3%	6.36±1.17 <sup>bd</sup>	81.09±18.90 <sup>b</sup>	0.1700±0.02 <sup>a</sup>
<b>Controle Negativo</b>	1.68±0.13 <sup>c</sup>	27.32±3.52 <sup>a</sup>	0.3167±0.02 <sup>b</sup>

Médias seguidas de letras diferentes são significativas com 5% de probabilidade pela análise de variância ANOVA um critério teste t (LSD).

Além disso, para os demais filmes de *R. officinalis*, visualmente verificou-se uma superfície bastante irregular em todas as películas filmogênicas formadas, confirmando a incompatibilidade entre os reagentes. No entanto, em relação às películas formadas com adição do óleo essencial de *T. ri-*

*paria* (Tabela 2), observou-se que os filmes biodegradáveis ficaram quebradiços quando incorporados ao óleo nas concentrações 0,5; 1 e 2%, ao contrário das concentrações 0,25 e 3%, as quais se apresentaram semelhantes ao CN.

**Tabela 2:** Valores médios de opacidade a 450nm, solubilidade em água (%) e espessura (mm) em filmes compostos de gelatina, plastificante, amido de mandioca e óleo essencial de *T. riparia*.

Filme	Opacidade	Solubilidade	Espessura
0.25%	2.52±0.10 <sup>a</sup>	35,14%±5.76 <sup>a</sup>	0.2600±0.01 <sup>a</sup>
0.50%	2.54±0.22 <sup>a</sup>	75,33%±2.23 <sup>b</sup>	0.2467±0.00 <sup>a</sup>
1%	2.38±0.12 <sup>a</sup>	27,27%±4.37 <sup>a</sup>	0.3067±0.01 <sup>a</sup>
2%	1.87±0,11 <sup>b</sup>	96,7%±3.30 <sup>c</sup>	0.2967±0.01 <sup>a</sup>
3%	1.48±0.14 <sup>b</sup>	72,87%±3.58 <sup>b</sup>	0.3033±0.01 <sup>a</sup>
Controle Negativo	1.68±0.13 <sup>b</sup>	27,33%±3.52 <sup>a</sup>	0.3167±0.02 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes são significativos com 5% de probabilidade pela análise de variância ANOVA um critério teste t (LSD).

No que se refere às análises de opacidade do filme incorporado ao óleo de *R. officinalis* (Tabela 1), este apresentou um aumento dos valores com o aumento da concentração do óleo. Este fato também foi observado por Pranoto et al. (2005) em estudos com incorporação de óleo de alho em filmes de alginato, o qual afetou a transparência e aparência do filme, demonstrando-se mais amarelado. No entanto, observou-se um efeito contrário para os filmes com *T. riparia* (Tabela 2), em que a opacidade diminuiu com o aumento da concentração do óleo, principalmente para concentrações de 2 e 3%, em que os valores encontrados foram próximos ao valor do CN. Esse evento possivelmente ocorreu mediante uma melhor interação entre os componentes do óleo com o filme, o que sugere que as espécies químicas presentes nos óleos interferem significativamente nas propriedades filmogênicas.

Quanto à solubilidade, pode-se observar tanto na Tabela 1 (*R. officinalis*), quanto na Tabela 2 (*T. riparia*), que houve um aumento considerável deste parâmetro após a incorporação dos óleos. Esse aumento pode ser decorrente da adição de agentes emulsificantes, no caso o *tween* 80 que, na presença de compostos lipofílicos (óleo), promovem melhor interação com a água, contribuindo assim para sua solubilização, como relatado por Suppakul et al. (2003). Além desse fato, devido à baixa interação do óleo com a matriz polimérica (filme), ele é facilmente retirado, promovendo também um possível aumento da solubilidade. No entanto, somente para as concentrações de 0,25 e 1% do filme incorporado a *T. riparia*, os valores ficaram próximos ao controle negativo, corroborando com o discutido anteriormente. Tal aumento da

solubilidade pode ser benéfico quando considerada a aplicação da película filmogênica em frutas e hortaliças, para posteriormente remoção da mesma (FAKHOURI et al., 2007).

Notou-se que a adição do óleo reduziu a espessura dos filmes incorporados com *R. officinalis* (Tabela 1), comparado com o CN, sendo que entre as concentrações utilizadas, não houve diferença significativa, diferentemente do reportado por Avila-Sosa et al. (2010) em trabalhos realizados com filme de amido, os quais observaram que, aumentando a concentração do óleo, houve um aumento da espessura do filme. Esse evento pode ser explicado por uma retração do filme quando incorporado este óleo, corroborando novamente com os outros dados que indicam uma baixa interação entre os componentes do filme. Entretanto, para os filmes com *T. riparia* (Tabela 2), os valores foram semelhantes ao CN, indicando novamente uma melhor compatibilidade entre os reagentes dos filmes, como já mencionado acima.

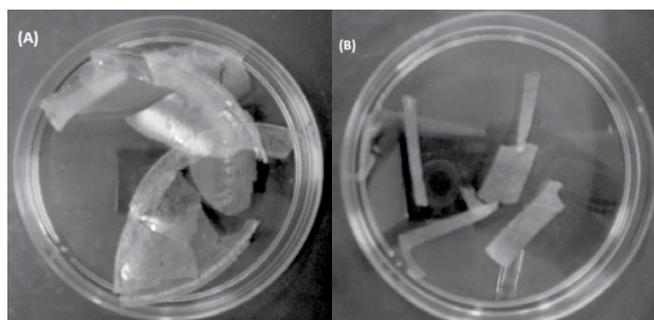
#### Análises Realizadas em Filmes Impregnados com Cloranfenicol

Os valores encontrados na Tabela 3 demonstraram que a incorporação de cloranfenicol ao filme não apresentou diferenças significativas, quando comparados ao controle negativo, sendo isto válido para os três parâmetros analisados. Somente a solubilidade para 0,5% foi maior, também corroborando com uma melhor compatibilidade desta substância com os outros componentes dos filmes. Porém, mesmo assim, o filme ainda apresentou-se visualmente quebradiço e com uma superfície irregular (Figura 1).

**Tabela 3:** Valores médios de opacidade a 450nm, solubilidade em água (%) e espessura (mm) em filmes compostos de gelatina, plastificante, amido de mandioca e cloranfenicol.

Filme	Opacidade	Solubilidade	Espessura
0.25%	4.35±1.30 <sup>a</sup>	36.93±1.34 <sup>a</sup>	0.15±0.04 <sup>a</sup>
0.50%	2.6±0.54 <sup>a</sup>	45.37±4.03 <sup>b</sup>	0.15±0.01 <sup>a</sup>
1%	2.76±0.43 <sup>a</sup>	33.08±1.46 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>a</sup>
2%	2.56±0.11 <sup>a</sup>	SA*	0.22±0.02 <sup>a</sup>
3%	2.77±0.31 <sup>a</sup>	33.86±1.52 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>a</sup>
Controle Negativo	2.92±0.05 <sup>a</sup>	36.00±0.57 <sup>a</sup>	0.11±0.01 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes são significativos com 5% de probabilidade pela análise de variância ANOVA um critério teste t (LSD). \*SA = Sem quantidade de amostra suficiente para realizar o teste.



**Figura 1:** Filmes biodegradáveis compostos de gelatina, plastificante, amido de mandioca e cloranfenicol nas concentrações 1% representado por (A) e 2% representado por (B).

### Atividade Antimicrobiana nos Filmes Impregnados com Óleos Essenciais

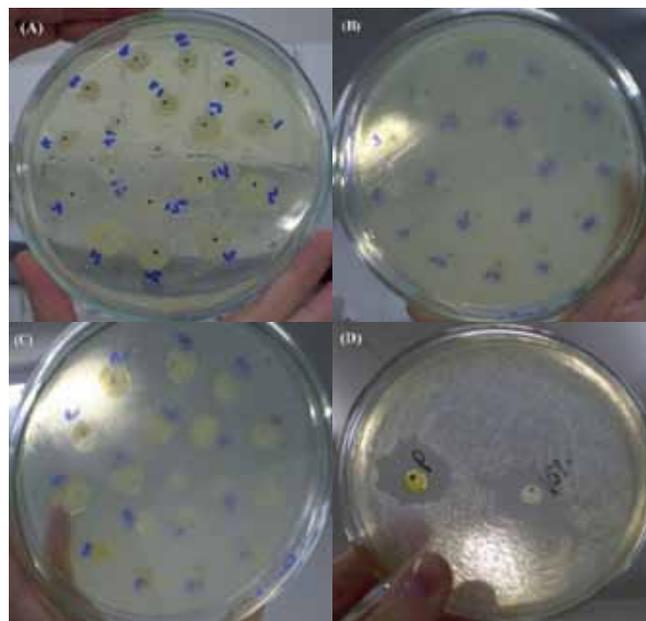
Após o crescimento dos micro-organismos, observou-se que os discos de filme biodegradável impregnado ao óleo essencial em diferentes concentrações não foi capaz de formar halo inibitório, dado este também observado por Seydim e Sarikus (2006), na utilização do óleo de *R. officinalis*. Apenas os óleos puros impregnados em papel filtro, de ambas as plantas, foram capazes de formar zona de inibição (Tabela 4). Sendo que o óleo essencial de *T. riparia* foi capaz de inibir o micro-organismo *S. aureus*, apresentando valor médio de halo igual a 20 mm (Figura 2-C e D), diferentemente do que se observou com o óleo de *R. officinalis*, que inibiu diferentes micro-organismos, a *C. albicans* (Figura 3-A) e *E. coli* (Figura 3-B), sendo que os valores dos halos foram 20 mm e 15 mm, respectivamente. Entretanto, mesmo com a formação de halos inibitórios, não é possível considerar estas substâncias efetivas contra o crescimento de micro-organismos, devido à comparação com o controle positivo, sendo 27 mm para *S. aureus* e 30 mm para *E. coli*, de acordo com a metodologia proposta por Karaman et al. (2003) e Springfield et al. (2003).

De acordo com a dimensão do halo, os micro-organismos foram classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição foi maior ou não mais do que três mm menor que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que dois mm, mas menor que o controle positivo de mais de três mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que dois mm (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003).

Ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com estudos realizados por Hammer, Carson e Riley (1999), pode-se afirmar que o óleo essencial de *R. officinalis* obteve melhores resultados em relação aos óleos de *C. sempervirens*, *D. carota*, *S. album*, *Z. officinale*, *V. zizanioides*, *S. sclarea*, porém os valores foram inferiores aos óleos de *C. citratus*, *C. martinii*, *M. quinquenervia*, *M. spicata*, *O. vulgare*, *P. graveolens*, quando utilizando os mesmos micro-organismos (*S. aureus*, *E. coli*).

**Tabela 4:** Valores médios dos halos de inibição (mm) formados frente aos micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* na presença de óleos essenciais de *T. riparia* e *R. officinalis*.

Planta	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<i>T. riparia</i>	20	—	—
<i>R. officinalis</i>	—	15	20
Padrão	27	30	—



**Figura 2:** Avaliação da capacidade de inibição do filme biodegradável quando incorporado óleo essencial de *T. Riparia*, frente aos micro-organismos: *C. albicans* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (C e D).

Quanto às análises de atividade antimicrobiana nos filmes incorporados com o cloranfenicol, observou-se nesta análise a formação de zonas de inibição nas diferentes concentrações testadas do filme biodegradável impregnado com cloranfenicol (Tabela 4). As medidas dos halos de inibição encontraram-se muito próximos no teste com a bactéria *E. coli* (Figura 4-B) nas concentrações de 0,25; 2 e 3%. Nas concentrações 0,5 e 1%, estas medidas foram menores. Nos testes com a bactéria *S. aureus* (Figura 4-A), o maior halo formado foi a 0,25%. No entanto, nas concentrações 1; 2 e 3%, verificou-se formação de halo crescente.

Pode-se constatar com estes resultados que filmes com 0,25% do princípio ativo apresentaram atividade contra estes micro-organismos. Isso ocorre possivelmente devido à menor quantidade de droga impregnada promover uma maior compatibilidade com o filme, facilitando desta maneira sua difusão na placa. Por outro lado, ao se observar quantidade acima de 2%, o excesso superficial deste princípio pode ser o responsável pela atividade semelhante apresentada no filme de 0,25%.

Em comparação com dados obtidos por Seydim (2006), pode-se observar que o cloranfenicol apresentou melhores resultados em comparação com óleos essenciais de alho e orégano, para todas as concentrações analisadas, em que, ocorreram inibição apenas nas concentrações acima de 2 e 1 % respectivamente.

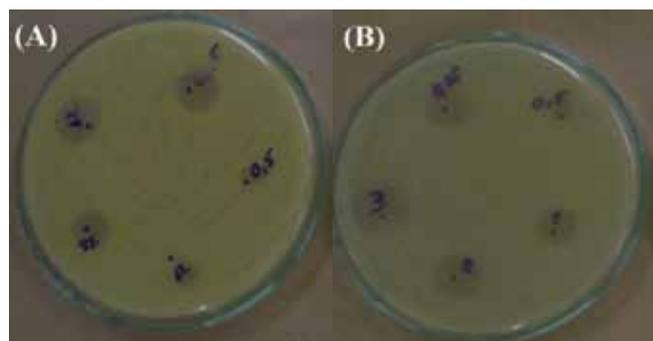
No entanto, mesmo com a formação das zonas de

inibição, as bactérias demonstraram resistência, pois quando comparadas aos halos formados pelo controle positivo, aqueles foram insuficientes, de acordo com a metodologia proposta por Karaman et al. (2003) e Springfield et al. (2003). Dessa maneira, a matriz utilizada (filme biodegradável) está afetando a atividade do princípio ativo, sendo necessário utilizar novos componentes que possibilitam a obtenção de resultados mais significativos.

**Tabela 5:** Valores médios dos halos de inibição (mm) formados frente aos microorganismos *E. coli* e *S. aureus* na presença de filmes compostos de gelatina, plastificante, amido de mandioca e Cloranfenicol.

Filme	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>
0,25%	19.67±0.33 <sup>a</sup>	23.33±0.33 <sup>a</sup>
0,5%	9.33±0.33 <sup>b</sup>	SA*
1%	14.33±0.66 <sup>c</sup>	13.00±0.00 <sup>b</sup>
2%	19.33±0.33 <sup>a</sup>	17.00±1.00 <sup>c</sup>
3%	19.00±0.00 <sup>a</sup>	20.33±0.88 <sup>d</sup>

Médias seguidas de letras diferentes são significativas com 5% de probabilidade pela análise de variância ANOVA um critério teste t (LSD). \*SA = Sem quantidade de amostra suficiente para realizar o teste.



**Figura 4:** Avaliação da capacidade de inibição do filme biodegradável quando incorporado ao Cloranfenicol. Sendo os microorganismos: *S. aureus* representada por (A), *E. coli* representada por (B).

## Conclusão

Os resultados encontrados demonstram que a incorporação dos óleos essenciais influenciou na formação da película, uma vez que os filmes encontraram-se quebradiços e com superfície irregular, bem como apresentaram variação nas suas propriedades de solubilidade e opacidade.

Não foi observada atividade antimicrobiana, tanto para os óleos puros quanto em concentrações testadas, frente aos micro-organismos estudados. No entanto, utilizando-se o antimicrobiano cloranfenicol, os filmes apresentaram formação de halos, porém ainda considerados ineficientes perante o controle positivo.

Dessa forma, este estudo demonstrou que apesar do óleo essencial possuir atividade antimicrobiana, quando este é incorporado em filmes, esta atividade pode diminuir ou simplesmente desaparecer. Assim, novas pesquisas serão necessárias para aprimorar os conhecimentos sobre interações dos óleos com o filme. Além disso, devem-se utilizar outros óleos com alta atividade antimicrobiana comprovada, para analisar o quanto desta atividade poderá diminuir quando es-

tes forem incorporados a filmes biodegradáveis.

## Referências

- AYRES, M. et al. BIOESTAT 5.0, Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e da saúde Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Belém- IDSM/MCT/ CNPq. 2007.
- AL-SEREITI, M. R.; ABU-AMER, K. M.; SEN, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 37, p. 124-130, 1999.
- AVILA-SOSA, R. et al. Fungal Inactivation by Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Essential Oil Added to Amaranth, Chitosan, or Starch Edible Films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 3, p. 127, 2010.
- BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: \_\_\_\_\_. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. p. 1117-1125.
- BAUER, A. W.; KIRBY, E. M. Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, Birmingham, v. 45, p. 493-496, 1966.
- CAMPANA, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 11, n. 4. p. 169-173, 2001.
- CHEN, C. H.; KUO, W. S.; LAI, L. S. Rheological and physical characterization of film-forming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tso leaf gum. **Food Hydrocolloids**, Wrexham, v. 23, p. 2132-2140, 2009.
- CHIU, P. E.; LAI, L. S. Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tso leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 139, p. 23-30, 2010.
- DAVANÇO, T. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capríco e surfactantes**. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- FAKHOURI, F. M. et al. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Revista Ciência e Tecnologia Alimentar**, Galicia, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.
- FAKHOURI, F. M.; GROSSO, C. Efeito de coberturas comestíveis aplicadas em goiabas in natura (*Psidium guajava*). I. Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis de gelatina, triacetina e ácidos graxos.

- Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 301-308, 2003.
- GODOY, R. L. O. et al. Composição química e atividade antiinflamatória de óleo essencial de *tetradenia riparia* Hochst Codd. JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 5., 2001, Botucatu- SP. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2001. p. 01.
- GOUNGA, M. E.; XU, S. Y.; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 83, p. 521-530, 2007.
- GUIGA, W. et al. Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlin, v. 11, p. 352-360, 2010.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, p. 985-990, 1999.
- HAUGAARD, V. K. et al. Potential food applications of biobased materials. An EU-concerted Action Project. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 5, n. 1, p. 189-200, 2001.
- KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, 85, p. 231-235, 2003.
- KHWALDIA, K.; ARAB-TEHRANY, E.; DESOBRY, S. Biopolymer coatings on paper packaging materials. **Food Science and Food Safety**, Pequin, v. 9, p. 82-91, 2010.
- KOCHUMALAYIL, J. et al. Tamarind seed xyloglucan – a thermostable high-performance biopolymer from non-food feedstock. **Journal of Materials Chemistry**, Cambridge, v. 20, p. 4321-4327, 2010.
- KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário terapêutico Guanabara**. 16. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- MANGARAJ, S.; GOSWAMI, T. K.; MAHAJAN, P. V. Applications of Plastic Films for Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables: A Review. **Food Engineering Reviews**, Davis, v. 1, p. 133-158, 2009.
- MARTINS, A. P. C. **Preparação e caracterização de biofilmes com aplicação em embalagens de alimentos**. 2010. 14f. Monografia (Graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis.
- NUNES, M. C. N. et al. Physicochemical changes during strawberry development in the field compared with those that occur in harvested fruit during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Glasgow, v. 86, p. 180-190, 2006.
- PELLISSARI, F. M. et al. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with orégano essential oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 7499-7504, 2009.
- PONCE, A. G. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plants extracts: *in vitro* and *in vivo* studies. **Postharvest Biology and Technology**, Auckland, v. 49, p. 294-300, 2008.
- PRANOTO, Y. et al. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. **Food Research International**, Campinas, v. 38, p. 267-272, 2005.
- SEBTI, I. et al. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, p.100-104, 2005.
- SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research Internacional**, Campinas, v. 39, p. 639-644, 2006.
- SPRINGFIELD, E. P. et al. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, Muenchen, v.10, p. 434-439, 2003.
- SUPPAKUL, P. et al. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 51, p. 3197-3207, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global strategy for containment of antimicrobial resistance. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/en/>>. Acesso em: 15 set. 2011.
- YAMASHITA, F. et al. Embalagem ativa para frutos de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 95-100, 2006.
- YANG, L.; PAULSON, A. T. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. **Food Research Internacional**, Campinas, v. 33, n. 7, p. 563-570, 2000.
- ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, E. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, p. 45-51, 2005.

Recebido em: 15/12/2013

Aceito em: 01/02/2014