

**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO-FINO (*Elionurus muticus* (SPRENG.) KUNTZE):
CARACTERIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE NANOEMULSÕES COMO
INGREDIENTES CONSERVANTES**

Lidia Maria Louzada Mantovi

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade
Tecnológica Federal do Paraná*

Orientado por

**Professora Doutora Joana Amaral
Professora Doutora Filomena Barreiro
Professora Doutora Rosana Buzanello**

Dedico este trabalho à memória dos meus pais, à
minhas orientadoras, pelos momentos de apoio para
concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meu profundo agradecimento a todos que fizeram parte dessa jornada, pelo incentivo, pelos conselhos e pelo acolhimento e a Deus por me guiar e iluminar meus passos.

Às minhas professoras orientadoras, Prof. Doutora Joana Amaral, Prof. Doutora Maria Filomena F. Barreiro e Prof. Doutora Rosana Buzanello, quero expressar minha gratidão por todo suporte e orientação. À Doutora Tatiana Schreiner pelo auxílio, apoio e incentivo durante essa etapa. À Maria João Afonso que se tornou uma grande apoiadora e que viu o meu potencial.

Gostaria de agradecer ao Centro de Investigação da Montanha (CIMO-IPB) pela disponibilidade dos equipamentos e reagentes dessa pesquisa, e pelo auxílio de toda a equipa do CIMO-IPB pelos conhecimentos compartilhados.

À memória dos meus pais, vocês me mostram que a força interior nasce da perseverança e da bondade, cada conquista deste trabalho carrega um eco das lições que me deram, este trabalho, é sobretudo, para vocês. Que ele seja símbolo de toda a gratidão que carrego no coração e da minha eterna vontade de honrar o legado de amor e dedicação que me deixaram. Ao meu irmão, Caio Mantovi, mesmo à distância, você fez o impossível e não mediu esforços para que esse sonho se concretizasse. Aos meus familiares, por todo incentivo e palavras de conforto.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado no Brasil, Adrielly Motta, Larissa Granado, Marcleilton Rufino, Maria Clara, Maira Ribeiro, Carla Jordana, Dunia Sleiman, Estela Sato, Pamela Meireles, Jordana Rahal, Francieli Bergmann, Diogo Salvati e Pedro Costenaro, meu profundo agradecimento, sem o apoio leal de cada um, a jornada teria sido muito mais solitária. Carrego comigo o valor de amizade e de solidariedade que me inspirou superar desafios com alegria e esperança.

Aos amigos de Bragança e que desempenharam um papel fundamental, Leandro Lima, Leonardo Beckhauser, Pedro Zanini, Camila Lima, Alex Nunes, Najla Abou, Carol Marcon, Lucas Pinheiro, quero agradecer pelo apoio e por estarem ao meu lado nos momentos de alegria e tristeza, o tempo se tornou mais leve e permanecerão gravados em meu coração.

Um agradecimento especial aos colaboradores e direção da Escola Superior Agrária de Bragança, Maria Jesus, Carla Santos, Maria Alice, Rosangêla Parente e ao Diretor Pedro Bastos pela oportunidade que me deram e acolhimento durante a colaboração.

RESUMO

A crescente demanda por ingredientes naturais na conservação de alimentos, impulsionada pela preocupação com a segurança alimentar e a resistência microbiana, tem direcionado a pesquisa para o potencial de óleos essenciais. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização química e a avaliação da atividade biológica do óleo essencial (OE) de *Elionurus muticus*, bem como o desenvolvimento e caracterização de sistemas de nanoemulsões e filmes comestíveis para sua incorporação, visando superar suas limitações de uso e otimizar sua aplicação como ingrediente conservante. A análise da composição química do OE por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) revelou a predominância de monoterpênicos, incluindo geranial e neral, cujos teores se mostraram consistentes com a literatura para a espécie, reforçando sua assinatura quimiotípica a nível de compostos majoritários. Variações quantitativas foram observadas para o campheno e outros monoterpênicos como linalol e geranial, quando comparados a estudos prévios, atribuídas a fatores edafoclimáticos e metodológicos. Na avaliação da atividade antimicrobiana, o óleo essencial demonstrou notável eficácia contra cepas bacterianas Gram-positivas como *Bacillus cereus* (MIC de 0,078%) e *Bacillus subtilis* (MIC de 0,078%), apresentando também ação bactericida (MBC \leq 0,156%). Em contraste, a atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (MIC >5%) foi limitada. Para melhorar a estabilidade e a aplicabilidade do OE de *E. muticus*, foram desenvolvidas nanoemulsões contendo 3% e 5% (v/v) de OE. A caracterização físico-química por microscopia óptica confirmou a ausência de agregação, enquanto as análises de potencial zeta (-41,32 a -42,34 mV) e tamanho de partículas (124,4 a 124,7 nm) demonstraram a formação de sistemas coloidais estáveis e na faixa nanométrica. A incorporação do OE não comprometeu a estabilidade das nanoemulsões, indicando um potencial promissor para sua aplicação como ingrediente conservante natural, oferecendo uma alternativa eficaz e segura para a indústria de alimentos. Adicionalmente, filmes comestíveis incorporando o óleo essencial foram desenvolvidos, demonstrando melhorias nas propriedades de barreira e mantendo a atividade antimicrobiana contra as linhagens testadas.

Palavras-chave: *E. muticus*; óleos essenciais; propriedade antimicrobiana; nanoemulsão; filmes ativos.

ABSTRACT

The increasing demand for natural ingredients in food preservation, driven by concerns about food safety and microbial resistance, has directed research toward the potential of essential oils. This work aimed to characterize the chemical composition and evaluate the biological activity of *Elionurus muticus* essential oil, as well as to develop and characterize nanoemulsion systems and edible films for its incorporation, seeking to overcome its usage limitations and optimize its application as a preserving ingredient. GC-MS analysis of the EO revealed the predominance of monoterpenes, including geranial and neral, whose contents showed consistency with literature for the species, reinforcing its chemotypic signature. Quantitative variations were observed for camphene and other monoterpenes such as linalool and geranial, when compared to previous studies, attributed to edaphoclimatic and methodological factors. In the antimicrobial activity evaluation, the essential oil demonstrated notable efficacy against Gram-positive bacterial strains like *Bacillus cereus* (MIC of 0.078%) and *Bacillus subtilis* (MIC of 0.078%), also exhibiting bactericidal action (MBC ≤ 0,156%). In contrast, activity against *Pseudomonas aeruginosa* (MIC >5%) was limited. To improve the stability and applicability of the EO, nanoemulsions containing 3% and 5% (v/v) of *E. muticus* were developed. Physicochemical characterization by optical microscopy confirmed the absence of aggregation, while zeta potential (-41.32 to -42.34 mV) and particle size (124.4 to 124.7 nm) analysis demonstrated the formation of stable colloidal systems within the nanoscale range. The incorporation of the EO did not compromise the stability of the nanoemulsions, indicating a promising potential for its application as a natural preserving ingredient, offering an effective and safe alternative for the food industry. Additionally, edible films incorporating the essential oil were developed, demonstrating improvements in barrier properties and maintaining antimicrobial activity against the tested strains.

Keywords: *E.muticus*; essential oils; antimicrobial properties; nanoemulsion; edible films.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Óleos essenciais	4
3.2	Capim-limão-fino (<i>Elionurus muticus</i> (Spreng.) Kuntze)	5
3.3	Nanoemulsões	7
3.4	Preparação de Nanoemulsões	8
3.4.1	Métodos de alta energia	8
3.4.2	Métodos de baixa energia	9
3.5	Incorporação de nanoemulsões de óleo essencial em filmes ativos e revestimentos	9
3.6	Incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais em matrizes poliméricas e suas aplicações na área alimentar	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1	Materiais	14
4.2	Caracterização do óleo essencial	14
4.3	Preparação das nanoemulsões	17
4.4	Caracterização das nanoemulsões	17
4.5	Elaboração dos filmes	18
4.6	Caracterização dos filmes	18
4.7	Análise estatística	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1	Caracterização do óleo essencial	21
5.1.1	Determinação da composição química volátil do óleo essencial	21
5.1.2	Atividade antioxidante determinada pela Capacidade de captura do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) e Poder Redutor	24
5.1.3	Atividade Antimicrobiana do óleo essencial	26
5.2	Caracterização das nanoemulsões	27
5.2.1	Morfologia	28
5.2.2	Tamanho médio e potencial zeta	31
5.3	Caracterização dos filmes	34
5.3.1	Espessura dos filmes	37
5.3.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em modo de refletância total atenuada (ATR)	38
5.3.3	Determinação de permeabilidade ao vapor de água	42
5.3.4	UV-VIS	45
5.4	Determinação da Atividade Antimicrobiana	47
5.4.1	Atividade Antimicrobiana dos Filmes	47
6	CONCLUSÕES	52
7	TRABALHOS FUTUROS	53

Lista de Tabelas

Tabela 1- Constituintes do óleo essencial capim-limão-fino identificados por GC-MS.....	22
Tabela 2- Concentrações eficazes (EC_{50} , mg/mL) do óleo essencial e do padrão Trolox nos ensaios de atividade antioxidantes: sequestro do radical DPPH e poder redutor.	25
Tabela 3- Valores de concentração Bactericida Mínima (MBC) e Inibitória Mínima (MIC) em percentagem (%v/v) do óleo essencial <i>E. muticus</i> testadas frente a diferentes bactérias.	26
Tabela 4- Tamanho médio de gotícula e Potencial Zeta	31
Tabela 5- Caracterização da espessura dos filmes contendo EOE.....	37
Tabela 6- Permeabilidade ao vapor de água dos filmes contendo 70/30 e 50/50 de emulsão.	44

Lista de Figuras

Figura 1- Capim-limão-fino.....	5
Figura 2- Geranial e Neral	6
Figura 3- Nanoemulsões produzidas sem óleo essencial, com fração 70/30 e 50/50 respectivamente.	28
Figura 4- Microscopia óptica da amostra controle (branco).....	29
Figura 5-Microscopia óptica da emulsão 70/30.....	29
Figura 6-Microscopia óptica da emulsão 50/50.....	30
Figura 7- Tamanho de gotícula das nanoemulsões a) controle, b) 70/30 e c) 50/50.....	33
Figura 8- Filmes de nanoemulsão 70/30 com diferentes volumes adicionados, a) controle, b)2mL, c)3mL e d)5mL de nanoemulsão.	35
Figura 9- Filmes de nanoemulsão 50/50 com diferentes volumes adicionados, a) controle, b)2mL, c)3mL e d)5mL de nanoemulsão.	36
Figura 10- Análise de espectroscopia de infravermelho dos ingredientes K-carragenina e óleo essencial de Capim-limão-fino.	39
Figura 11- Análise de espectroscopia de infravermelho dos filmes KC-3 a partir de nanoemulsões.	40
Figura 12- Análise de espectroscopia de infravermelho dos filmes KC-5 a partir de nanoemulsões.	41
Figura 13- Análise de permeabilidade ao vapor de água ao longo do tempo (0 a 24 horas) dos filmes KC-3.	43
Figura 14- Análise de permeabilidade ao vapor de água ao longo do tempo (0 a 24 horas) dos filmes KC-5.	43
Figura 15- UV-VIS filmes á base de k-carragenina com emulsão 70/30 e 50/50 respectivamente..	46
Figura 16- Teste de inibição de Escherichia coli pelos filmes contendo nanoemulsão de óleo essencial (proporção 50/50).	48
Figura 17- Teste de inibição de Staphylococcus aureus pelos filmes contendo nanoemulsão de óleo essencial (proporção 50/50).	48
Figura 18- Teste de Redução Bacteriana de Escherichia coli pelos filmes contendo nanoemulsão de óleo essencial (proporção 50/50).	49
Figura 19- Teste de Redução Bacteriana de Staphylococcus aureus pelos filmes contendo nanoemulsão de óleo essencial (proporção 50/50).	50

Lista de abreviações e siglas

DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MIC	Concentração Inibitória Mínima
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GRAS	Generally Recognized as Safe
FDA	Food and Drug Administration
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
TIC	Cromatograma de iões totais
PIT	Temperatura de inversão de fase
PIC	Composição de inversão de fase
HPH	Homogeneização de alta pressão
NA	Nutrient Agar
MHB	Mueller-Hinton Broth
BHI	Brain Heart Infusion
UV-VIS	Ultraviolet–Visible Spectroscopy
EOE	Emulsão contendo óleo essencial
OE	Óleo essencial

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais compreendem substâncias produzidas no metabolismo secundário de plantas medicinais e comestíveis, podendo ser extraídos de várias partes, desde o topo (caule, flor, fruto) até a raiz (Chagonda et al., 2012; Veiga et al., 2019). Devido à presença de terpenos e terpenóides, e por vezes compostos fenólicos, os óleos essenciais são altamente aromatizantes, com propriedades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas, sendo ingredientes geralmente reconhecidos como seguros (GRAS, *Generally Recognized as Safe*), permitindo sua aplicação em alimentos (Bakkali et al., 2008).

Elionurus muticus (Spreng.) Kuntze, conhecida como “capim-cidreira-fino”, “capim-limão-fino”, “capim-carona”, entre outros, é uma planta encontrada na região sul do Brasil, sendo o seu gênero encontrado em regiões de clima tropical e subtropical da América do Sul, África, Austrália e Ásia temperada (Hess et al., 2007; Toazza et al., 2021). Dentre os compostos relatados na literatura para *E. muticus* destacam-se o citral (geranial e neral), acetato de geranilo, linanol, mirceno, entre outros (Chagonda et al., 2012; Toazza et al., 2021). Estes compostos bioativos, em especial o citral, que compreende a mistura isomérica dos aldeídos monoterpênicos geranial e neral, são frequentemente utilizados na indústria de fragrâncias e de alimentos (Toazza et al., 2021).

Até ao presente momento foram encontrados poucos trabalhos na literatura que relatam a composição e aplicação do *E. muticus*, não tendo sido encontrados trabalhos que estudam sua incorporação em sistemas tais como filmes ou microcápsulas. Porém, foram encontrados múltiplos trabalhos que relatam a composição de uma espécie morfológicamente similar, o capim-cidreira ou capim-limão, *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, a qual apresenta o citral também como o principal constituinte do seu óleo (Azeredo et al., 2013). O óleo essencial de capim-limão demonstrou ação antimicrobiana e atividade antioxidante quando aplicado diretamente em alimentos ou compreendendo revestimentos comestíveis (Alencar et al., 2022).

Formular óleos essenciais em emulsões permite potencializar os seus benefícios em alimentos (Acevedo-Fani et al., 2015). Essa técnica previne a degradação e permite a estabilização dos compostos ativos dos óleos essenciais. Adicionalmente, as emulsões viabilizam uma liberação controlada e prolongada desses compostos, o que garante uma

cobertura uniforme e duradoura do produto alimentício (Liang et al., 2012). Nanoemulsões com óleos essenciais, incorporados em filmes de polissacarídeos comestíveis, oferecem uma estratégia inovadora para o desenvolvimento de embalagens ativas com propriedades antimicrobianas, abrindo então novas perspectivas para a indústria de alimentos (Acevedo-Fani et al., 2017; Moeini et al., 2022). Nesta, pequenas partículas ou gotículas são envoltas por um revestimento ou introduzidas numa matriz (Sufredini, 2019), protegendo e garantindo o aumento de estabilidade durante o processamento e armazenamento de alimentos (Darvish et al., 2020). Extratos de plantas contendo substâncias bioativas, como óleos essenciais e polifenóis, são estudados devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, o que os tornam viáveis para aplicações em embalagens ativas (Sanches- Silva et al., 2014).

2 OBJETIVOS

É notória a crescente busca por óleos essenciais para diferentes finalidades, incluindo para uso em terapias alternativas, para incorporação em alimentos para prolongar a sua vida útil, e para o desenvolvimento de produtos livres de aditivos artificiais (Berton-carabin et al., 2019). Adicionalmente, têm sido realizados vários estudos com o objetivo de garantir que os óleos essenciais sejam seguros e eficazes quando usados para a substituição de aditivos convencionais (Falleh et al., 2019).

Diversos óleos essenciais de plantas demonstraram ser agentes antimicrobianos e conservantes, incluindo o capim-limão (*Cymbopogon citratus*). No entanto, há poucos estudos realizados com o óleo essencial de *Elionurus muticus* (Spreng), conhecido como capim-limão-fino, que permitam avaliar a sua atividade antimicrobiana e conservante. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo geral o desenvolvimento de filmes a partir nanoemulsões contendo óleo essencial de capim-cidreira-fino (*E. muticus*), avaliando as propriedades antioxidantes do óleo essencial, as propriedades físico-químicas das nanoemulsões e dos filmes e antimicrobiana do óleo essencial livre e filmes.

Para tal, consideram-se os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a composição química em compostos voláteis do óleo essencial utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS);
- Determinar o potencial antioxidante do óleo por técnicas espectrofotométricas;
- Elaborar emulsões contendo o óleo essencial estabilizadas por saponinas;
- Avaliar as emulsões obtidas por de infravermelho;
- Caracterizar as emulsões por análise de microscopia ótica, diâmetro médio e potencial *zeta*;
- Desenvolver filmes a partir da emulsão elaborada;
- Caracterizar os filmes por de infravermelho, UV-VIS, espessura, permeabilidade ao vapor de água;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial, livre, emulsionado e dos filmes funcionalizados pela determinação da concentração inibitória mínima frente a estirpes Gram-positivo e Gram-negativo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos essenciais

A maioria dos alimentos processados são preparados e conservados com conservantes artificiais para manter a sua estabilidade. Apesar dos aditivos utilizados pela indústria agro-alimentar serem aprovados pelas autoridades competentes, alguns estudos sugerem que a sua utilização excessiva pode representar riscos para a saúde dos consumidores e prejudicar o ambiente (Faleiro, 2020). Por isso, a crescente demanda pelo uso de óleos essenciais de plantas como uma alternativa para o uso em alimentos é uma escolha promissora para consumidores que desejam produtos mais saudáveis, mas ao mesmo tempo estáveis e seguros (Rehman et al., 2021). Por definição, os óleos essenciais são líquidos naturais, voláteis e aromáticos extraídos de plantas, possuindo uma variedade de metabólitos secundários (terpenos, terpenóides, compostos fenólicos) (Guenther, 1948), sendo classificados quimicamente em três grupos principais: terpenos, fenilpropanoides e hidrocarbonetos. Devido à presença de compostos como carvacrol, linamaldeído, eugenol, citral ou timol observa-se um potente efeito antimicrobiano devido à presença de álcoois terpênicos. Assim, os óleos essenciais são frequentemente utilizados na indústria alimentar para conservar produtos (Inouye et al., 2001; Moghaddam & Mehdizadeh, 2017; Bizzo et al., 2009).

Atualmente, são conhecidos mais de 3.000 óleos essenciais, sendo que 10% deles têm importância comercial e econômica (Nehme et al., 2021). Segundo um relatório da Federação Europeia de Óleos Essenciais, o setor de alimentos e bebidas lidera a demanda por óleos essenciais, seguido pelas indústrias de perfumaria, cosméticos e aromaterapia (Barbieri et al., 2018). Diversos estudos demonstram que, no geral, os óleos essenciais têm propriedades biológicas, como antioxidantes e antibacterianas, que são comparáveis aos conservantes sintéticos mais comuns na indústria de alimentos (Jafarizadeh et al., 2022). Os óleos essenciais são considerados um dos derivados vegetais mais promissores no combate às pragas de grãos armazenados, devido à sua ampla atividade contra fungos e artrópodes (Campolo et al., 2018). Tal deve-se às suas propriedades de repelência, dissuasão alimentar e fumigante, sendo usados como inseticida de contato (Ribeiro et al., 2020; Chaudhari et al., 2021),

sendo responsáveis pela inibição do crescimento micelial e produção de toxinas de fungos deterioradores de alimentos (Achar et al., 2020; Bomfim et al., 2020).

Os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados como aromatizantes nos setores farmacêutico e de cosméticos, além de atuarem como agentes inseticidas, antioxidantes, anti-inflamatórios, antialérgicos e anticancerígenos, destacando-se por sua capacidade de prevenir danos oxidativos, por conta de oferecerem uma barreira contra o estresse oxidativo (da Silva et al., 2022; Dima & Dima, 2015; Halliwell, 2000; Wani et al., 2021). Apesar dessas qualidades, a aplicação direta de óleos essenciais em alimentos enfrenta desafios como odores e sabores intensos e/ou desagradáveis, alta reatividade, volatilidade, vulnerabilidade às condições ambientais e baixa estabilidade (Díaz-Montes & Castro-Muñoz, 2021; Prakash et al., 2018). A encapsulação em métodos apropriados, como nanoemulsões, oferece uma solução viável para superar essas dificuldades, permitindo o seu uso eficaz em segurança alimentar e embalagens comestíveis (Li et al., 2015; Prakash et al., 2018).

3.2 Capim-limão-fino (*Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze)

Elionurus muticus, popularmente conhecido como capim-limão-fino (Figura 1), pertence à família das gramíneas (Poaceae), é nativo do bioma Pampa, ocorrendo em abundância no Brasil, Argentina e Uruguai (Welker e Longhi-Wagner, 2007). Esta espécie é frequentemente eliminada através de queimas regulares por criadores de gado, pois quando ingerida por animais adiciona um gosto amargo ao leite (Deschamps et al., 2013; Hess et al., 2007).



Figura 1- Capim-limão-fino.

Contudo, *E. muticus* tem atraído grande interesse econômico devido à presença de citral, que, como referido corresponde aos isômeros geranial e neral (Figura 2), para além de outros componentes como acorenona (C₁₅H₂₄O), iso-acorenona (C₁₅H₂₄O) e eucaliptol (C₁₀H₁₈O) que lhe confere propriedades antimicrobianas e antioxidante. No entanto, há poucos resultados sobre a sua atividade antimicrobiana, usos e capacidade antioxidante, além de pouco progresso na otimização do processo de extração (Castro e Ramos, 2003; Füller et al., 2010, 2017; Toazza, 2020).

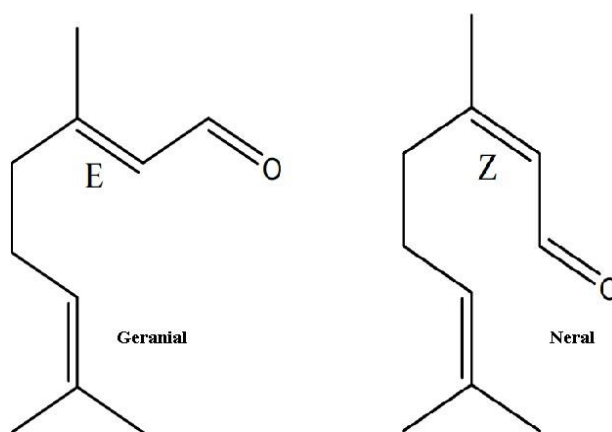


Figura 2- Geranial e Neral

(Adaptado de Adams, 2007)

Como referido por Toazza et al. (2021), o óleo essencial de *E. muticus* demonstrou conter um maior número de compostos quando comparado com *Cymbopogon flexuosus* e *Cymbopogon citratus*, mas os principais compostos identificados foram similares aos de *C. citratus*, nomeadamente geranial (42,64%), neral (23,72%) e mircenol (11,18%). Toazza (2020) demonstrou que a variedade brasileira de *E. muticus* exibe um óleo essencial com composição e propriedades valiosas, exibindo maior atividade antioxidante e efeito conservante em morangos por mais dias. Os resultados deste trabalho sugerem que pode ser aplicado em alimentos, como agente antioxidante e antimicrobiano.

O óleo de *E. muticus* extraído por hidrodestilação indicou alta capacidade de uso em tecnologias pós-colheita, como opção orgânica ideal para revestimentos. A aplicação de soluções diluídas (750 µL/L) de óleo essencial de *E. muticus* e de *Cymbopogon flexuosus*, foram capazes de preservar morangos sem desenvolvimento fúngico durante 15 dias de armazenamento refrigerado, mantendo a qualidade geral

aceitável e, inicialmente, melhorando a sua atividade antioxidante (até 3 dias). Devido à sua biodegradabilidade, sua ação antifúngica, antibacteriana, antioxidante e não possuir toxicidade, o óleo essencial de *Elionurus muticus* merece mais atenção científica (Toazza et al., 2020).

3.3 Nanoemulsões

No artigo de revisão recentemente publicado por Sharma et al. (2024) são demonstrados avanços no uso de revestimentos à base de nanoemulsões de óleos essenciais como uma abordagem promissora para prolongar a vida útil de frutas e vegetais. Este tipo de revestimento consegue liberar, de maneira controlada, compostos bioativos, preservando a qualidade e o frescor de alimentos. Adicionalmente, através da formulação de nanoemulsões, é possível enriquecer alimentos com diferentes nutrientes, possibilitando a obtenção de produtos funcionais e seguros para o consumidor (McClements et al., 2021).

As nanoemulsões são sistemas coloidais termodinamicamente instáveis e cineticamente estáveis (Schreiner et al., 2022) compostos por duas ou mais fases imiscíveis, onde uma fase está dispersa em forma de gotículas com diâmetro na faixa nanométrica de 20-200 nm, caracterizados por sua transparência, isotropia e tamanho de gota extremamente reduzido, sendo geralmente formadas por uma fase oleosa, uma fase aquosa e uma mistura de surfactante ou cosurfactante (Kelidari et al., 2025 ; Jin et al., 2016; Thakur et al., 2024). A estabilidade cinética das nanoemulsões é atribuída ao seu pequeno tamanho e à interação entre a interface óleo- água e as substâncias tensoativas (Goodarzi & Zendeboudi, 2019).

No contexto da nanotecnologia, as nanoemulsões emergem como sistemas de entrega inovadores, capazes de proteger uma ampla gama de ingredientes funcionais, como minerais, vitaminas, compostos antimicrobianos e nutracêuticos, melhorando sua biodisponibilidade e estabilidade em alimentos (McClements et al., 2021; Nile et al., 2020). As nanoemulsões, antes restritas à área farmacêutica, revelam-se como uma tecnologia promissora para a indústria de alimentos, com potencial para revolucionar a forma como embalamos e conservamos nossos alimentos (Mohamed et al., 2020; Torres et al., 2019). Por conta de suas propriedades, são sistemas promissores que podem ser utilizados para melhorar a eficácia de produtos alimentares, uma vez que apresentam a capacidade de libertar compostos bioativos (McClements & Rao, 2011).

Para além de serem amplamente utilizadas para encapsular e proteger compostos bioativos lipofílicos, como vitaminas e antioxidantes, no organismo, as nanoemulsões oferecem diversas vantagens, como o aumento da solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade desses compostos (McClements & Rao, 2011). Além disso, quando incluídas numa solução formadora de filme, as nanoemulsões formam um revestimento comestível que atua como uma barreira eficaz, retardando a perda de umidade, a troca gasosa e a contaminação microbiana, apresentando maior área de contato o que prolonga a vida útil dos alimentos (Hassan et al., 2018; W. Li et al., 2015; Patrignani et al., 2020; Tripathi et al., 2021).

3.4 Preparação de Nanoemulsões

Versáteis e eficientes, as nanoemulsões apresentam um grande potencial para revolucionar o processamento e a preservação de alimentos. Suas propriedades únicas, como alta tensão interfacial óleo-água e biocompatibilidade, as tornam ferramentas valiosas para o desenvolvimento de produtos com maior valor agregado e melhor qualidade nutricional (McClements & Rao, 2011). As nanoemulsões podem ser preparadas por meio de duas abordagens principais: métodos de baixa energia e de alta energia, que variam conforme fornecimento de energia ao sistema que está sendo emulsionado (Mushtaq et al., 2023a; Preeti et al., 2023).

3.4.1. Métodos de alta energia

A preparação de nanoemulsões por métodos de emulsificação de alta energia é realizada utilizando dispositivos mecânicos como homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e geradores de ultrassom (Gupta et al., 2016). No método de homogeneização de alta pressão, a formação de nanoemulsões ocorre através do cisalhamento hidráulico e da cavitação, que fragmentam as gotículas de óleo de uma emulsão pré-existente (Che Marzuki et al., 2019). A pressão exercida por homogeneizadores tradicionais varia entre 50 e 100 MPa. No entanto, em situações que exigem maior fragmentação das partículas, a pressão pode ser intensificada, atingindo valores de até 350 Mpa (Qadir et al., 2016). A técnica de ultrassonicação emprega ondas sonoras de alta frequência (superior a 20 kHz) para a produção de nanoemulsões (Tang et al., 2013). Uma sonda de sonicação, imersa na emulsão, gera vibrações mecânicas

intensas, que resultam na formação e colapso de bolhas de cavitação. Esse fenômeno fornece a energia necessária para romper as gotas de óleo de maior dimensão, formando nanoemulsões (Espitia et al., 2019; Delmas et al., 2011). A microfluidização é caracterizada pela combinação de diversos mecanismos de redução de tamanho de partículas, como atrito, impacto, cisalhamento hidráulico e cavitação. Esses processos atuam simultaneamente, proporcionando uma fragmentação eficiente das gotículas de óleo (Preeti et al., 2023).

3.4.2. Métodos de baixa energia

A abordagem de baixa energia para a produção de nanoemulsões baseia-se principalmente em dois métodos: emulsificação espontânea e inversão de fase (Cenobio-Galindo et al., 2019; Mushtaq et al., 2023b). A emulsificação espontânea é um fenômeno que ocorre quando dois líquidos imiscíveis, ao serem misturados, formam espontaneamente uma emulsão devido à existência de um gradiente de potencial químico entre as fases. Esse gradiente impulsiona a difusão das moléculas, levando à formação de gotículas e à estabilização da emulsão (Solans et al., 2016). Os métodos de preparação por temperatura de inversão de fase, composição de inversão de fase (PIC) e temperatura de inversão de fase (PIT) permitem a produção de nanoemulsões de forma suave e eficiente, sem a necessidade de altas forças de cisalhamento (Ostertag et al., 2012). O método PIT utiliza a característica de que a lipofilicidade de surfactantes não iônicos aumenta com a temperatura para formar nanoemulsões e a emulsificação ocorre fixando a composição enquanto varia a temperatura para atingir o PIT (Gadhav, 2014; Shinoda & Saito, 1968). Em vez de alterar a temperatura, o PIC induz a inversão de fase modificando as composições da solução de emulsão (Maali & Mosavian, 2013).

3.5 Incorporação de nanoemulsões de óleo essencial em filmes ativos e revestimentos

3.5.1 Filmes ativos e revestimentos comestíveis

As embalagens primárias compostas por ingredientes comestíveis são embalagens primárias que podem ser aplicadas diretamente no alimento através de revestimento, imersão e pulverização. Contudo, a distinção entre revestimento e filme comestível reside no fato de que os filmes são produzidos a partir de soluções formadoras de filme e

posteriormente utilizados para embalar em alimentos, ao passo que os revestimentos são aplicados na forma líquida diretamente na superfície do alimento (Espitia et al., 2014; Falguera et al., 2011). Recentemente, tem sido proposto o desenvolvimento de filmes e revestimentos que incorporem substâncias ativas (por exemplo, agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes) os quais podem aumentar ainda mais as propriedades funcionais dos filmes, mantendo a qualidade e segurança dos produtos alimentícios (Liu et al., 2022; Yeddes et al., 2020).

Um material de embalagem conhecido como filme comestível é uma camada fina de material comestível colocada sobre ou entre componentes alimentares. A utilização de filmes comestíveis tem-se tornado cada vez mais popular devido à sua natureza ecológica, segurança alimentar e simplicidade de manuseio (Dou et al., 2018). As características dos filmes comestíveis naturais podem ser melhoradas com a inclusão de componentes aromáticos, intensificadores de sabor, substâncias nutricionais, agentes antioxidantes ou antimicrobianos (Mohamed et al., 2020). Os sistemas de entrega também podem ser utilizados para a liberação controlada de componentes bioativos, nutrientes, e ingredientes alimentares. Eles criam uma barreira semipermeável em torno do produto alimentício embalado, melhorando suas características de barreira ao diminuir a transferência de umidade, lipídios, gases e voláteis (Nair et al., 2020; Wongphan & Harnkarnsujarit, 2020). Portanto, um filme já formado pode ser empregado na embalagem de alimentos sem modificar o processo de formação do revestimento e os materiais empregados (Galus & Kadzińska, 2015).

Um revestimento é composto por camadas extremamente finas que, em seu estado líquido, é aplicado diretamente na superfície de um alimento para sua proteção e aprimoramento da durabilidade. Eles são mais comumente aplicados para aprimorar a integridade física do produto que está sendo revestido (Kowalska et al., 2021; Panahirad et al., 2021). Os revestimentos alimentares desempenham diversas funções, tais como alterar as propriedades funcionais dos alimentos, funcionar como uma barreira entre o ambiente e os alimentos, e regular a umidade na superfície dos alimentos. Além disso, podem conter diversos ingredientes ativos, tais como aromatizantes, corantes e adoçantes, que aprimoram as características nutricionais e sensoriais de diversos produtos alimentares incluindo frutas e vegetais (Dhall, 2013; Kang et al., 2013). As técnicas de aplicação dos revestimentos são variadas, incluindo imersão(submerso totalmente), pulverização(“spray”), leito fluidizado(partículas suspensas em ar quente com jatos finos da solução) e banhagem(igual a imersão, porém em tambor rotativo). Essas técnicas são selecionadas com base nas particularidades de cada alimento e da solução filmogénica (Suhag et al., 2020).

Ao estender a vida útil e reduzir o desperdício, as embalagens ativas contribuem para um sistema alimentar mais eficiente e respondem às preocupações globais sobre

segurança alimentar e sustentabilidade. Além de controlar a atmosfera interna e liberar substâncias específicas, retarda processos de deterioração, como a oxidação e o crescimento microbiano, garantindo alimentos mais frescos por mais tempo e diminuindo o descarte (Galanakis, 2012; Sani et al., 2021).

3.5.2 *Materiais para formação de filme*

Os polissacarídeos têm sido recentemente utilizados como um recurso sustentável na criação de revestimentos e filmes comestíveis, uma vez que não são tóxicos, estão amplamente presentes na natureza, e possuem uma permeabilidade seletiva ao dióxido de carbono e ao oxigênio (Erginkaya et al., 2014; Mellinas et al., 2016). Polissacarídeos, tais como pectina, carragenina, alginato, amido e goma xantana, têm sido empregados na produção de revestimentos e filmes comestíveis para diminuir o uso de embalagens plásticas convencionais, graças às suas características funcionais (Espitia et al., 2014; Liu et al., 2022). As carrageninas e alginatos têm recebido muita atenção na produção de filmes comestíveis. Segundo a FDA, esses materiais são classificados como GRAS, podendo ser usados para o desenvolvimento de filmes e revestimentos para alimentos. Alginatos e carrageninas possuem uma grande capacidade hidrofílica, funcionando como obstáculo às gorduras e óleos além de atuarem como bons bloqueadores de oxigênio e oferecerem proteção contra a oxidação de lipídios (Cian et al., 2014; Varela & Fiszman, 2011).

Carragenina é uma forma específica de galactana sulfatada linear hidrofílica presente nas paredes celulares de algas marinhas vermelhas (Rhodophyceae). As carrageninas são principalmente obtidas dos gêneros *Chondrus*, *Eucheuma*, *Gigartina* e *Iridaea* e existem 3 tipos principais de carrageninas que diferem na sua estrutura e propriedades químicas, nomeadamente a carragenina kappa (κ -carragenina), carragenina iota (ι -carragenina) e carragenina lambda (λ -carragenina) (Cosenza et al., 2014; Jouanneau et al., 2010; Nanaki et al., 2010). A existência de pontes anidro em κ - e ι -carragenina diminui a hidrofiliabilidade dos resíduos de açúcar e altera a estrutura da cadeia, possibilitando que a carragenina tenha transições conformacionais que favorecem as suas características de gelificação (Rhein-Knudsen et al., 2015).

Os polímeros de κ -carragenina apresentam uma capacidade de gelificação elevada proporcionando excelentes características de formação de filmes compactos, com boas

propriedades mecânicas e de repelência à água, além de uma elevada transparência (El-Fawal, 2014; Nanaki et al., 2010; Paula et al., 2015). Devido à sua excelente capacidade de formar filmes, biocompatibilidade, alta capacidade de gelificação, a carragenina tem sido amplamente explorada no desenvolvimento de embalagens multifuncionais, oferecendo uma alternativa mais sustentável (You et al., 2022). Quando usadas como revestimento comestível, os filmes de carragenina podem manter a textura da fruta e fornecer proteção antibacteriana durante o armazenamento, podendo também restringir a passagem de oxigênio, limitando a desidratação da superfície e funcionando como estabilizadores (Hambleton et al., 2012; Plotto et al., 2010).

3.6 Incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais em matrizes poliméricas e suas aplicações na área alimentar

Em resposta ao aumento da procura por produtos naturais, tem-se observado a substituição de aditivos sintéticos por elementos naturais, tais como óleos essenciais, polifenóis e outros extratos naturais (Poojary et al., 2017). Os revestimentos comestíveis à base de óleos essenciais são ideais para aplicação em alimentos, libertando gradualmente compostos com atividade antimicrobiana e formando uma barreira protetora que inibe o crescimento e a multiplicação de microorganismos. Além disso, estes revestimentos antimicrobianos contribuem para preservar a qualidade dos alimentos, aumentar a estabilidade durante o armazenamento, e reduzir as perdas pós-colheita em geral (Kong et al., 2022; Otoni et al., 2014). Assim, considera-se que os revestimentos comestíveis à base de óleos essenciais são uma estratégia eficiente e inovadora para preservar a qualidade alimentar (Hanan et al., 2024).

Diversos métodos, como emulsificação ou homogeneização, podem ser utilizados para incorporar os óleos essenciais na matriz do filme comestível. Durante a formação de emulsões, os óleos essenciais que contêm polímero costumam-se apresentar de forma dispersa em gotículas muito pequenas formando uma mistura homogênea. Quando se produzem filmes, as gotículas de lipídios são incorporadas à composição do polímero, tornando-se parte do filme em vez de estarem dispersos em forma de gotículas individuais (S. Sharma et al., 2021). A incorporação de óleos essenciais em nanoemulsões potencializa consideravelmente a sua atividade antimicrobiana, ampliando a sua disponibilidade e garantindo uma distribuição homogênea do composto antimicrobiano (Perumal et al., 2022). Este processo pode preservar os componentes de óleos essenciais contra agentes

externos que possam causar sua degradação, simplificar a liberação controlada, aumentar sua estabilidade e aprimorar suas propriedades bioativas. (Maqbool et al., 2011).

A nanoencapsulação de óleos essenciais é uma técnica inovadora que preserva a capacidade de um composto de inibir ou eliminar microrganismos através de uma dissolução melhorada, estabilidade e liberação controlada no sistema alimentar, além de oferecer proteção contra fatores ambientais (Hanan et al., 2024). Segundo a literatura, a adição de nanoemulsões de óleo essencial em filmes revelou que o aumento da concentração de óleo essencial contribui para uma melhoria na rugosidade, diminuição progressiva do módulo de elasticidade e resistência à tração, alongamento melhorado após a ruptura e atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli* (Norcino et al., 2020). Ademais, a nanoemulsão potencializa a atividade antibacteriana quando utilizada em filmes comestíveis. Desta forma, a incorporação de óleo essencial nanoemulsionado em filmes alimentícios é percebida como um método eficaz e inovador para a manutenção da qualidade dos alimentos (Kong et al., 2022).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O óleo essencial de *Elionurus muticus* (Spreng) foi adquirido comercialmente na empresa Brasileira Harmonia Natural a partir de amostras colhidas no Paraná, Brasil. Para a produção das nanoemulsões foram utilizados saponina comercial extraída a partir de Quillaja Bark (PanReac-AppliChem) como surfactante natural e o óleo vegetal Myglyol® 812 N Excipient (IOI Oleochemical). Para a produção dos filmes, foram utilizados K-carragenina (Acros Organic) e glicerol (Merck).

4.2 Caracterização do óleo essencial

4.2.1 Determinação de compostos voláteis

A composição química dos compostos voláteis presentes no óleo essencial de capim-cidreira-fino foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), em um cromatógrafo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com sistema injetor automático (AOC-20iPlus, Shimadzu, Kyoto, Japão) e uma coluna de sílica fundida SH-RXi (30 m × 0,25 mm, espessura da película 0,25 µm (Shimadzu, EUA). A temperatura do forno da coluna cromatográfica foi programada inicialmente de 45 a 175 °C, com uma taxa de aquecimento de 3 °C·min⁻¹, seguida de um aumento de 15 °C·min⁻¹ até atingir 300 °C, sendo então mantida constante por 10 minutos. A temperatura do injetor foi ajustada para 280 °C, com volume de injeção de 1 µL. A temperatura da linha de transferência foi de 280 °C e da fonte de íons, 220 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com velocidade linear ajustada para 30 cm·s⁻¹. O split ratio foi de 1:40, com energia de ionização de 70 eV, faixa de varredura entre 40–300 u e tempo de varredura de 1 s de acordo com as condições descritas por Spréa et al. (2020). Os compostos foram identificados comparando seus espectros de massa com os espectros da NIST17, e nos índices de retenção linear (LRI) determinados com base nos valores obtidos com uma mistura de n-alcanos (C8-C40, ref. 40147-U, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) analisados sob condições idênticas. Os resultados foram expressos em percentagem relativa considerando o somatório das áreas obtidas no cromatograma de iões totais (TIC).

4.2.2 Capacidade de captura do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

O método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizado por espectrofotometria em leitor de microplacas. Após diluição seriada da amostra, adiciona-se 900 µL de solução etanólica de DPPH (6×10^{-5} mol/L) a 100 µL de cada diluição. Após homogeneização, a mistura é mantida no escuro durante 1 hora e feita a medição da absorvância a 517 nm. A atividade captadora de radicais livres (ACR) é calculada em função da percentagem de descoloração de DPPH usando a equação:

$$\%ACR = \frac{Abs\ DPPH - Abs\ Sol}{Abs\ DPPH} \times 100 \quad (1)$$

onde: Abs Sol representa a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e Abs DPPH representa a absorvância da solução de DPPH (branco de reação).

A concentração mínima de antioxidante necessário para reduzir em 50% a concentração inicial da atividade captadora de radicais (EC50) é calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem ACR em função da concentração da amostra.

4.2.3 Poder Redutor

A medida da atividade antioxidante por poder redutor foi realizada por espectrofotometria utilizando um leitor de microplacas. Primeiramente foram preparadas diferentes diluições da amostra (entre 2.5 mg/mL e 0.039 mg/mL). Para cada diluição, 500 µL foram misturados com 500 µL de solução tampão de fosfato de sódio (0.2 mol/L a pH=6.6) e 500 µL de solução de ferricianeto de potássio (1%, m/v). Após homogeneização, a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 minutos e, após arrefecimento, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (10%, m/v). Em seguida, homogeneização e centrifugação (10000 rpm durante 2 minutos), retirou-se 1 mL da fase superior da mistura anterior para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de água desionizada e 0.2 mL de FeCl₃ (0.1%, m/v). A absorvância da mistura obtida é medida a 690 nm num leitor de microplacas para cálculo do valor de EC₅₀ (concentração de extrato correspondente a 0.5 de absorvância).

4.2.4 Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. muticus* foi avaliada face aos seguintes microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método da macrodiluição descrito pelo Clinical and Laboratorial Standards Institute (CLSI, 2009), que consiste na preparação da diluição do agente antimicrobiano num meio de crescimento líquido feito em tubos com um volume mínimo de 2 mL. Inicialmente, a partir de um inóculo inicial preparado em meio nutritivo (NA), preparou-se o inóculo a 0,5 McFarland da bactéria a testar em caldo Mueller-Hinton (MHB) utilizando um densitómetro (DEN-1 McFarland, Grant-bio, Reino Unido), o qual foi posteriormente diluído a uma concentração de 5×10^5 unidades formadoras de colónias por mL (CFU/mL). O óleo essencial foi diluído seriadamente (1/2) em tubos de vidro estéreis contendo MHB adicionado de tween 80 a 0.5%. A cada tubo contendo um volume final de 1mL com diferentes concentrações de óleo essencial (2.5% a 0.0078%, v/v) foi adicionado 1 mL de inóculo a 5×10^5 CFU/mL. Simultaneamente foi preparado um branco contendo apenas MHB com 0.5% tween, sem adição de óleo essencial. Depois de incubação a 37 °C por 24 horas, a concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada visualmente como a concentração mais baixa que inibe o crescimento visível da bactéria. Para confirmação foi adicionado sal de p-iodonitrotetrazólio (0,2 mg/mL) como indicador colorimétrico da viabilidade de microrganismos e os tubos incubados a 37 °C por 30 min. A concentração mínima bactericida (MBC) foi determinada por sub-cultura de uma amostra retirada com ansa descartável em placas de petri contendo NA(Nutrient Agar), as quais foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A MBC foi definida como a concentração de óleo essencial capaz de eliminar todas as bactérias no inóculo, evidenciada pela ausência de crescimento após subcultivo em meio isento de antibiótico. A MIC e MBC foram determinadas, no mínimo, em duplicado para cada microrganismo.

4.3 Preparação das nanoemulsões

A preparação das nanoemulsões foi realizada usando o método descrito por Schreiner et al.(2023), com adaptações. Os sistemas foram produzidos com uma razão óleo/água de 10/90 (*m/m*), para uma massa total de 50 g. A saponina foi utilizada como surfactante a 1.5% (*m/m*). As nanoemulsões foram produzidas utilizando apenas Miglyol 812 e também com a mistura de Miglyol com óleo essencial (OE). Diferentes frações de Miglyol/OE foram testadas, sendo elas 70/30 e 50/50, obtendo uma concentração de OE total de 3 e 5% (*m/m*).

Para a preparação das nanoemulsões, inicialmente preparou-se a pré-emulsão com um Ultraturrax por 5 min e uma taxa de agitação de 11000 rpm. Seguidamente, para redução do tamanho das gotas, a emulsão foi submetida à homogeneização de alta pressão (HPH) (Avestin Emulsiflex C3) por 6 ciclos a 100 Mpa.

4.4 Caracterização das nanoemulsões

4.4.1 Morfologia

A morfologia das emulsões foi analisada por Microscopia Óptica (Eclipse Ci H550S, equipado com câmera DS-Qi2, Nikon, Tóquio, Japão) conectado ao software NIS-Elements. As análises foram realizadas com ampliação de 40 vezes.

4.4.2 Tamanho médio e potencial zeta

O tamanho médio das gotículas foi adquirido pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) em um Zeta Sizer Ultra (WR14 1XZ UK, Malvern Instruments, Reino Unido). Adicionalmente, foi determinado pelo mesmo equipamento o potencial zeta (ζ) das amostras a fim de determinar a estabilidade das mesmas por forças eletrostáticas de repulsão. Ambas as medições foram realizadas em triplicatas consecutivas a temperatura ambiente.

4.5 Elaboração dos filmes

A preparação dos filmes foi baseada na metodologia descrita por De Rezende et al. (2025) com modificações, tendo-se usado K-carrejenina a 2.5% (*m/m*), dissolvida em água destilada, a 70 °C sob agitação. Como plastificante foi adicionado glicerol a 30% (*m/m*) considerando a massa do polímero utilizado. Foram testadas diferentes quantidades de nanoemulsão adicionadas às soluções filmogênicas, incluindo 2, 3 e 5 mL desse sistema em uma solução total de 25 mL. Adicionalmente, foram produzidos filmes sem nanoemulsão, atuando como controle. O volume total de solução filmogênica (25 mL), com ou sem nanoemulsão, foi transferido para uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) e deixada secar à temperatura ambiente durante 7 dias. Foram preparados uma série de filmes codificados como “KC-X-Y”, onde “X” corresponde à quantidade de óleo essencial na nanoemulsão (3 ou 5%) e “Y” ao volume de nanoemulsão adicionada ao filme (2mL, 3mL e 5mL).

4.6 Caracterização dos filmes

4.6.1 *Espessura dos filmes*

A espessura dos filmes foi medida utilizando um medidor Elcometer 456 (Reino Unido). Realizou-se uma calibração previamente às medições e de seguida as amostras foram medidas em quintuplicata em diferentes regiões do filme.

4.6.2 *Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em modo de refletância total atenuada (ATR)*

As análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em modo de refletância atenuada (ATR) foram realizadas para avaliar a presença de possíveis interações entre os materiais e o óleo essencial do capim-cidreira-fino no filme. Os espectros FTIR-ATR foram determinados no intervalo de comprimento de onda de 4000 a 450 cm^{-1} , com 32 varrimentos e resolução de 4 cm^{-1} . Foram realizadas análises das amostras individuais (K-carragenina e óleo essencial de capim-cidreira-fino) e de todos os filmes obtidos.

4.6.3 Determinação de permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada seguindo o método ASTM E96-95 com adaptações. Para isso, utilizou-se recipientes com diâmetro de 3 cm preenchidos com água até $\frac{3}{4}$ do volume e a amostra do filme cortada e fixada na boca do recipiente utilizando um selante apropriado garantindo a vedação eficaz e evitando interferências no ensaio.

Após preparadas, as amostras foram colocadas em um exsiccador contendo sílica gel. A perda de massa foi monitorada por pesagens de hora em hora ao longo de 8 horas e após 24 horas. A taxa de transmissão de vapor de água (WVTR) foi calculada conforme a equação (2):

$$WVTR = \frac{G}{tA} \quad (2)$$

Onde: G/t representa a perda de peso por unidade de tempo (g/h); A (m²) corresponde à área do filme testado.

A permeabilidade ao vapor de água (WVP) foi determinada considerando a espessura do filme e a diferença de pressão parcial do vapor de água em ambos os lados da amostra por meio da equação (3):

$$WVP = \frac{WVTR \times Th}{\Delta P} \quad (2)$$

Onde: Th (m) representa a espessura do filme; ΔP (kPa) refere-se à diferença de pressão parcial do vapor de água em ambos os lados do filme.

4.6.4 Transparência dos filmes por UV-VIS

A transparência dos filmes foi avaliada por meio de espectroscopia UV-Vis, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Jasco V-730 (Tóquio, Japão). A transmitância da luz, expressa em percentagem, foi medida na faixa de comprimento de onda de 400–800 nm. A transparência foi definida como a percentagem de transmitância a 600 nm,

correspondendo à luz visível.

4.6.5 Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes

Para os filmes foi utilizada a metodologia descrita por De Rezende et al. (2025) que consiste em dois testes: redução e inibição. A atividade antimicrobiana foi avaliada face aos seguintes microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). O inóculo foi ativado em incubadora (Raypa, Incut term, Barcelona, Spain) por 24 horas a 37°C. Para o início dos testes foi medida a densidade celular utilizando um densitômetro (densitômetro DEN-1 McFarland, Grant-bio, Reino Unido) regulado para 550 nm e a concentração do inóculo corrigida para 0.5 McFarland que equivale a $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Após a concentração bacteriana corrigida em meio Brain heart infusion (BHI) para inibição e em solução salina para redução, foi necessário diluir até concentração $1,5 \times 10^5$ CFU/mL.

Para o teste de inibição foram utilizados o inóculo com a concentração ajustada em meio BHI, aplicando 250 µL dessa mistura nos filmes cortados com dimensão 1.5 x 1.5 cm e colocados em placas de petri estéreis. As placas foram incubadas a 37°C durante de 0, 60 e 120 minutos. Depois de cada tempo, os filmes foram lixiviados com 2 mL de água estéril e o lixiviado retirado para realizar contagem de colônias. Para tal, foram feitas diluições decimais do lixiviado com solução salina a 0.9%. O lixiviado puro e as diluições seriadas (0.1 mL) foram espalhadas em placas de Petri pelo método da incorporação utilizando meio Nutrient Agar (NA) mantido líquido a uma temperatura de 45°C. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h antes da contagem de colônias. O teste de redução foi realizado de acordo com as etapas descritas anteriormente, no entanto ao invés de caldo BHI, foi utilizada uma solução salina a 0.9%.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos para as diferentes formulações serão avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). As análises serão realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do óleo essencial

5.1.1 Determinação da composição química volátil do óleo essencial

A análise química realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) permitiu a identificação de 49 compostos distintos, sendo a maioria monoterpenos e sesquiterpenos. Os principais componentes encontrados foram geranial e neral conforme apresentado na Tabela 1. Essa abordagem analítica não só facilita a padronização e o controle de qualidade dos óleos essenciais, como também impulsiona o desenvolvimento de aplicações em indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, fundamentando a relação entre a composição química e as propriedades bioativas observadas.

O óleo essencial de *E. muticus* apresentou, em maior abundância, os compostos geranial, neral e linalol. Ademais, foram identificados compostos secundários, como (Z)-isocitral e (E)-isocitral, que contribuem para a complexidade da composição. Segundo Toazza (2020), resultados semelhantes foram observados para *E. muticus*, evidenciando a presença dos mesmos componentes maioritários; no entanto, algumas discrepâncias na concentração de certos compostos foram notadas, possivelmente decorrentes das variações climáticas, sazonalidade e da localidade de coleta da planta.

Ao comparar com maior detalhe a composição da amostra em estudo com os dados previamente reportados por Toazza et al. (2021), notou-se que no presente trabalho obteve-se uma maior quantidade de neral (29,23%) e linalol (5,17%), comparativamente com os valores de neral (23%) e linalol (1,62%) relatados por Toazza et al. (2021). Por outro lado, o estudo de Toazza et al. (2021) apresentou uma concentração mais elevada de geranial (42,6%) em comparação com os resultados obtidos. Essa discrepância na composição quantitativa, especialmente para os isômeros neral e geranial, pode ser atribuída a uma série de fatores tais como variações no método de extração, parâmetros operacionais empregados no GC-MS, que podem influenciar a recuperação e a detecção dos compostos. Além disso, influências ambientais e fisiológicas inerentes ao material vegetal, como o estágio de

maturação da planta, condições climáticas e o tipo de solo, são conhecidas por afetar a biossíntese e, conseqüentemente, a composição da planta nestes compostos (De Godoy Penteado Bragado Puppín, 2018; Füller et al., 2015; Hess et al., 2007).

Tabela 1- Constituintes do óleo essencial capim-limão-fino identificados por GC-MS.

Composto	TR	LRI cal	LRI teórico	Média ± SD
Triciclono	13.014	918	921	0.108±0.004
α-Tejeno	13.331	924	924	0.044±0.005
α-Pineno	13.636	930	932	0.45±0.03
Canfeno	14.362	944	946	0.60±0.04
Sabineno	15.704	970	969	0.098±0.008
β-Pineno	15.826	973	974	0.024±0.003
6-Metill-5-hepten-2-ona	16.435	984	981	1.3±0.1
2,3-Deidro-1,8-cineol	16.582	987	988	0.13±0.02
β-Mirceno	16.676	989	988	0.73±0.04
p-Cimeno	18.338	1021	1022	0.064±0.002
Limoneno	18.556	1026	1024	0.45±0.02
Cineol	18.657	1028	1026	0.75±0.03
cis-Ocimeno	19.108	1036	1032	0.63±0.02
trans-Ocimeno	19.634	1046	1044	0.72±0.05
Óxido de Linalol cis	20.842	1070	1067	0.14±0.02
Óxido de Linalool trans	21.654	1086	1084	0.16±0.02
Linalol	22.282	1098	1095	5.4±0.4
Nonanal	22.474	1102	1100	0.08±0.02
citronelal	24.92	1151	1148	0.36±0.03
(Z)-Isocitral	25.49	1163	1160	1.8±0.1
Epóxido de rosefuran	26.023	1173	1173	0.06±0.02
(E)-Isocitral	26.377	1181	1177	2.7±0.2
α-Terpineol	26.775	1189	1186	0.13±0.01
Metil-chavicol	27.138	1196	1195	0.28±0.04
decanal	27.482	1203	1201	2.4±0.2
Citronelol	28.699	1229	1223	0.17±0.02
Neral	29.345	1243	1235	30.4±2.5
Piperitona	29.845	1254	1249	0.44±0.03
Geraniol	29.913	1255	1249	0.75±0.08
Geranial	30.626	1270	1264	40.3±2.6
Acetato de bornila	31.339	1286	1284	0.29±0.04
Copaeno	35.365	1376	1374	0.140±0.009
Acetato de geranila	35.602	1382	1379	2.2±0.2

β -Elemeno	36.056	1392	1389	0.12±0.03
Sativeno	36.262	1397	1390	0.18±0.02
dodecanal + acetato de decila	36.669	1406	1408 + 1407	0.72±0.04
β -cariofileno	37.258	1421	1417	0.56±0.04
α -Humuleno	38.688	1455	1452	0.070±0.006
allo-aromadendrano	38.884	1460	1458	0.12±0.01
γ -Muuroloeno	39.621	1477	1478	0.044±0.002
curcumeno	39.823	1482	1479	0.12±0.02
Biciclogermacreno	40.467	1498	1500	0.57±0.07
α -Muuroloeno	40.595	1501	1500	0.098±0.009
δ -Cadineno	41.518	1524	1522	0.11±0.01
Butirato de nerila	42.872	1559	-	0.255±0.008
Spatulenol	43.684	1579	1577	1.33±0.09
Óxido de cariofileno	43.91	1585	1582	0.72±0.06
Tetradecanal	44.887	1611	1611	0.25±0.02
Aromadendrano-4,10 diol	48.924	1719	-	0.33±0.02
<hr/>				
Total				
Não identificados				7.0±0.3
Monoterpenos hidrocarbonados				3.6±0.2
Monoterpenos oxigenados				81.0±0.4
Sesquiterpenos hidrocarbonados				2.0±0.2
Sesquiterpenos oxigenados				2.2±0.2
Outros				3.5±0.2

LRI cal: índice de retenção linear determinado em uma coluna de sílica fundida SH-RXi-5 ms (Shimadzu) em relação a uma série de n-alcenos (C8–C40); LRI teórico: índice de retenção linear relatado na literatura (Adams, 2007). Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3), e os resultados estão expressos como média ± desvio padrão.

Adicionalmente, observou-se que os teores de geranial e neral foram similares aos reportados por Deschamps et al. (2013), reforçando o papel desses monoterpenos como marcadores químicos na caracterização da espécie. De maneira análoga, os níveis de α -pineno na amostra em estudo apresentaram resultados idênticos aos descritos por (Chagonda et al., 2012), o que sugere a presença deste componente em baixas quantidades como um traço característico do perfil volátil dessa planta. Entretanto, um diferencial do presente estudo foi o teor de canfeno, que atingiu 0,60 — valor significativamente superior aos 0,30 reportados pelos autores referenciados.

Adicionalmente, o óleo essencial de *E. muticus* demonstrou uma alta concentração de linalool, que pode ser utilizado em cosméticos decorativos. Além do linalool, a atividade antifúngica do OE de capim-limão-fino pode ser atribuída à presença de citral, que é a

designação da mistura estereoquímica formada pelos isômeros geranial (trans-citral) e neral (cis-citral), a mesma aumenta a eficácia antimicrobiana geral do OE, pois óleos que contêm citral possuem propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Bailly, 2020; Toazza et al., 2021; Zeng et al., 2015). Além do uso do capim-limão ser considerado seguro, os compostos geraniol, acetato de geranila, citronelal e limoneno apresentam atividades anticancerígenas (Ashaq et al., 2024).

Na análise comparativa, o perfil químico do óleo essencial de *Elionurus muticus* com espécies semelhantes do gênero *Cymbopogon*, como *C. citratus* e *C. flexuosus*, a literatura revela variações significativas da sua composição (da Silva Gündel et al., 2018; Lin et al., 2024; Putra et al., 2025; Riaz et al., 2025). Neste estudo, foram identificadas quantidades substancialmente maiores de linalool e (E)- isocitral em *E. muticus* enquanto as espécies de *Cymbopogon* relatadas no estudo de Toazza et al. (2021) não apresentaram esses compostos. Da mesma forma, observou-se que *E. muticus* apresentou quantidades inferiores de geranial e neral, que são comumente proeminentes em *C. citratus* e *C. flexuosus*. Essas diferenças na composição majoritária e minoritária podem ser principalmente atribuídas a fatores intrínsecos à espécie.

5.1.2 Atividade antioxidante determinada pela Capacidade de captura do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) e Poder Redutor

A identificação da atividade antioxidante do OE de *E. muticus* foi determinada através do método de captura do radical DPPH e determinação do poder redutor. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

O radical DPPH roxo se transforma em uma molécula amarela estável e o nível de descoloração funciona como um indicador da eliminação de radicais livre. Dessa forma, o grau de descoloração pode ser interpretado como uma medida do potencial do composto em relação a atividade antioxidante (Bardaweel et al., 2018; Farahmandfar et al., 2020). Na determinação do poder redutor, quanto maior o poder redutor de uma amostra, maior a quantidade de substâncias reduzidas formadas, resultando em uma coloração mais intensa e escura da solução.

Tabela 2-Concentrações eficazes de EC₅₀ (mg/mL): Concentração necessária para atingir 50% da atividade antioxidante do óleo essencial e do padrão Trolox nos ensaios de atividade antioxidantes: sequestro do radical DPPH e poder redutor.

Amostra	EC ₅₀ DPPH(mg/mL)	EC ₅₀ Poder redutor(mg/mL)
<i>E. muticus</i>	23.94±5,05	3.88±0,06
Trolox (Padrão)	0.039±0.001	0.0521±0.0004

Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3) e expressos como média ± desvio padrão.

A composição química dos óleos essenciais é um fator crucial determinante da sua capacidade antioxidante. Em grande parte, o efeito antioxidante dos óleos essenciais deve-se à sinergia entre metabólitos fenólicos e outros compostos secundários. Entre os ingredientes que podem contribuir para esse potencial, destacam-se o linalol, 1,8-cineol, geraniol/neral, citronelal, isomentona, mentona e outros monoterpenos, os quais desempenham papéis importantes na atividade antioxidante dos óleos essenciais (Bhavaniramy et al., 2019).

Os resultados obtidos demonstraram que o óleo essencial de *E. muticus* apresentou atividade antioxidante avaliada por dois métodos distintos. No ensaio DPPH, o valor de EC₅₀ foi de 23.94 ± 5.05 mg/mL, indicando uma baixa eficácia antioxidante dada a elevada concentração necessária para neutralizar 50% dos radicais livres presentes na solução. Adicionalmente o valor obtido foi muito superior quando comparado com o padrão trolox. No ensaio de poder redutor, o óleo essencial apresentou um EC₅₀ de 3.83 ± 0.06 mg/mL. Em contrapartida, o padrão trolox, utilizado para referência na atividade antioxidante, demonstrou um valor de EC₅₀ de 0.052 ± 0.0004 mg/mL, evidenciando sua alta eficácia redutora. Apesar da escassa disponibilidade de estudos específicos sobre a atividade antioxidante do óleo essencial de *E. muticus* na literatura, os dados apresentados sugerem que os compostos bioativos presentes possuem uma capacidade redutora mensurável conferindo alguma atividade antioxidante ao óleo essencial.

Em vista da escassez na literatura sobre as propriedades antioxidantes do EO estudado e específicas, torna-se fundamental que futuras pesquisas aprofundem o estudo deste óleo, ampliando a base de conhecimento e permitindo a comparação com outros extratos ou compostos naturais.

5.1.3 Atividade Antimicrobiana do óleo essencial

Na perspectiva da microbiologia, a busca por agentes naturais capazes de inibir o crescimento bacteriano é fundamental para o desenvolvimento de terapias inovadoras e para o combate à resistência antimicrobiana. Nesse contexto, os resultados obtidos na Tabela 3 demonstraram que o óleo essencial de *E. muticus* apresenta atividade expressiva, evidenciada pelos baixos valores de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) contra várias cepas testadas. Observa-se que tais valores indicam não apenas a eficácia do extrato em interromper o crescimento bacteriano, mas também sua capacidade de eliminar as bactérias sob determinadas condições, o que corrobora estudos prévios que associam os componentes voláteis à ação antimicrobiana.

Tabela 3- Valores de concentração Bactericida Mínima (MBC) e Inibitória Mínima (MIC) em percentagem (% v/v) do óleo essencial *E. muticus* testadas frente a diferentes bactérias.

Bactéria	MBC	MIC
<i>Escherichia coli</i>	0.313%	0.313%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.156%	0.156%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.156%	0.156%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.313%	0.156%
<i>Proteus mirabilis</i>	0.156%	0.156%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.5%	2.5%
<i>Bacillus cereus</i>	0.078%	0.078%
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0.156%	0.156%
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.156%	0.156%
<i>Bacillus subtilis</i>	0.078%	0.078%

Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3).

Os dados ilustrados na Tabela 3 revelam que o óleo essencial de *E. muticus* exibe um perfil antimicrobiano distinto entre as cepas testadas, evidenciado tanto nos valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) quanto na Concentração Bactericida Mínima

(MBC). Em geral, as cepas Gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, demonstraram maior sensibilidade, com valores de MIC inferiores, variando de 0.156% a 0.078%, sugerindo que concentrações baixas já são eficazes na inibição do seu crescimento bacteriano.

As bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* exibiram MICs similares ou mais elevados comparativamente às bactérias Gram-negativas, variando entre 2.5% a 0.156%, o que indica no geral eficácia inibitória inferior as Gram-positivas. Esses resultados ressaltam a relevância de *E. muticus* como agente antimicrobiano e abre caminho para pesquisas complementares. Adicionalmente ao potente efeito bacteriostático, a análise dos valores de MBC evidencia igualmente um efeito bactericida relevante do óleo essencial de *E. muticus* para a maioria das cepas testadas. Para várias bactérias o OE demonstrou atividade mesmo em concentrações muito baixas, apresentando valores de MBC que variam entre 0.078% e 0.313%. A exceção verificou-se para *P. aeruginosa* para a qual o OE não apresentou capacidade bactericida nas concentrações testadas.

Esses resultados sugerem que pequenas quantidades de óleo essencial são suficientes para não apenas inibir, mas efetivamente eliminar essas bactérias, evidenciando uma atividade bactericida. De fato, a eficácia antimicrobiana depende fortemente da composição química do OE. Os dados obtidos neste trabalho, conforme evidenciado na Tabela 1 e Tabela 3, corroboram com as hipóteses de Teixeira et al. (2022) e Ekpenyong & Akpan (2017) que destacam a elevada atividade dos monoterpenos oxigenados contra as células microbianas, sendo geraniol, geranial e neral, melhores compostos antimicrobianos de óleos essenciais que exibem capacidade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

5.2 Caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões foram obtidas de acordo com a metodologia Schreiner et al.(2023), com adaptações conforme descrito no item 4.3.



Figura 3- Nanoemulsões produzidas sem óleo essencial, denominada de controle (EB), com fração 70/30 (EOE 3%) e 50/50 (EOE5%), respectivamente.

Foram testadas duas frações de Miglyol/OE e amostra branco sem óleo essencial (Figura 3), sendo elas EB (emulsão branco), EOE3% (70/30) e EOE5% (50/50), obtendo uma concentração de OE total de 3 e 5% (*m/m*). As formulações resultaram em nanoemulsões homogêneas, estáveis e de bom aspecto visual, atestando a eficiência do método e da concentração do óleo essencial. As frações 70/30 e 50/50 apresentaram uma coloração levemente acentuada em comparação com o controle, o que indica a concentração do óleo essencial.

5.2.1 Morfologia

A análise das imagens obtidas por microscopia ótica revela diferenças importantes na estrutura das nanoemulsões formuladas com e sem óleo essencial. Na amostra controle, a visualização tende a apresentar menor turbidez evidenciando a ausência ou a presença reduzida de gotículas dispersas que interferem na passagem da luz. Em contrapartida, nos sistemas contendo 3% e 5% de óleo essencial, observa-se a presença de pontos ou regiões de maior opacidade, os quais correspondem às gotículas formadas devido à incorporação do óleo essencial na matriz da nanoemulsão.

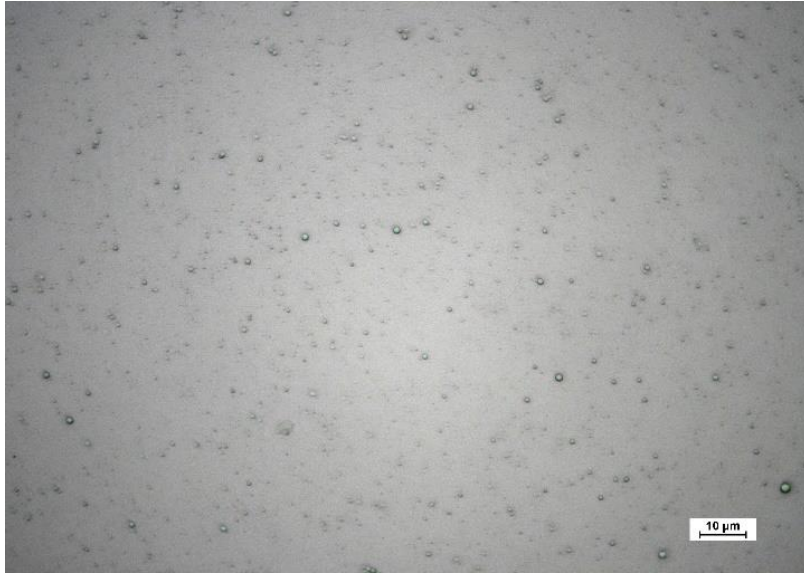


Figura 4- Microscopia óptica da amostra controle (branco).

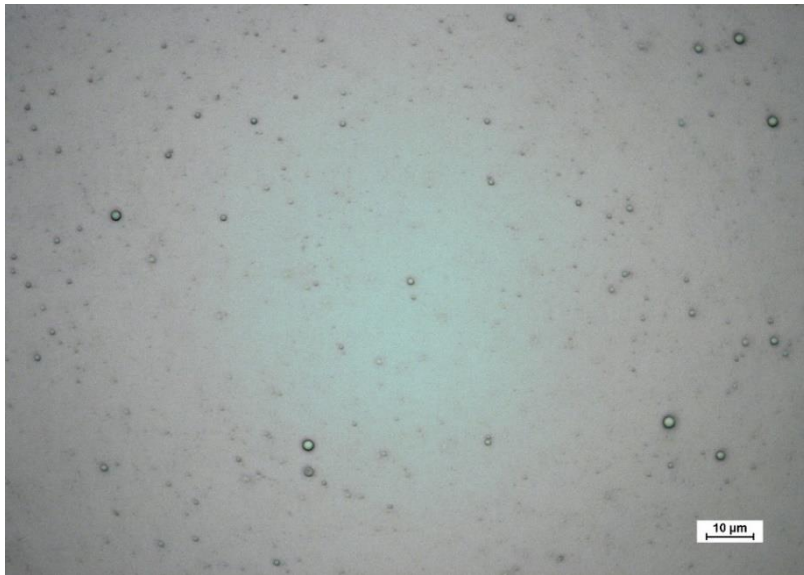


Figura 5-Microscopia óptica da emulsão 70/30.

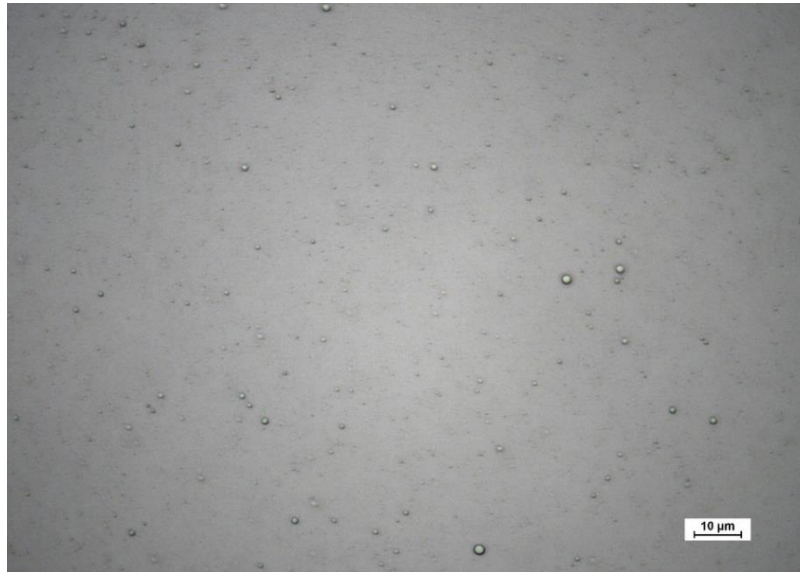


Figura 6-Microscopia óptica da emulsão 50/50.

A presença de óleo essencial altera as propriedades óticas da nanoemulsão. Conforme os níveis de óleo essencial aumentam, a maior quantidade de fase oleosa disponível gera uma intensificação de nível de polidispersão e tamanho de partícula geral, o que resulta em uma dispersão mais uniforme por toda a matriz sem quaisquer sinais de agregação ou aglomeração, indicando um perfil de estabilidade extremamente alto para o sistema (Zhang & Xia, 2025).

A análise morfológica das nanoemulsões apresentadas na Figura 5 e Figura 6 revelou que, independentemente da formulação, as gotículas apresentaram formatos arredondados e bem definidos, demonstrando alta uniformidade na distribuição. Observou-se que a nanoemulsão sem a adição de óleo essencial (Figura 4) exibiu gotículas com dimensões ligeiramente superiores às dos sistemas que continham OE. Essa diferença sugere que a presença do OE pode influenciar a redução do tamanho das gotículas, possivelmente devido à interação dos compostos presentes no óleo com a matriz da nanoemulsão.

A análise comparativa entre as formulações com 3% e 5% de óleo essencial não revelou diferenças estatisticamente significativas no tamanho, revelando gotículas esféricas bem dispersas dentro da faixa de tamanho nanométrico, conforme representado. Tal constatação demonstra que, para maximizar a incorporação do óleo essencial nos filmes, a formulação com 5% se mostra mais vantajosa. Sendo assim, ao elevar a concentração para

5%, é possível aumentar o teor do OE nos filmes sem comprometer as características morfológicas fundamentais da nanoemulsão.

5.2.2 Tamanho médio e potencial zeta

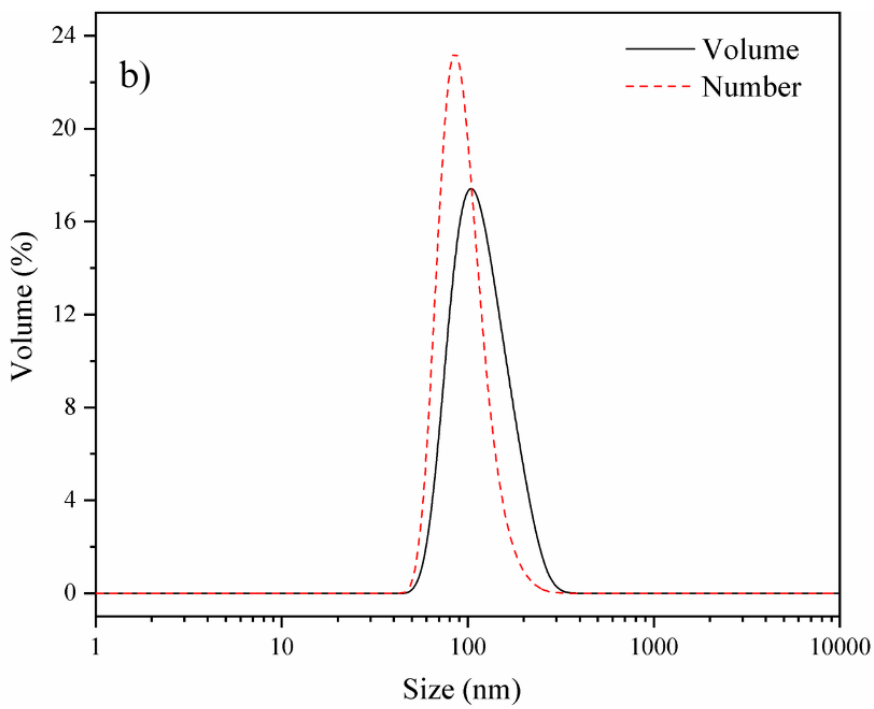
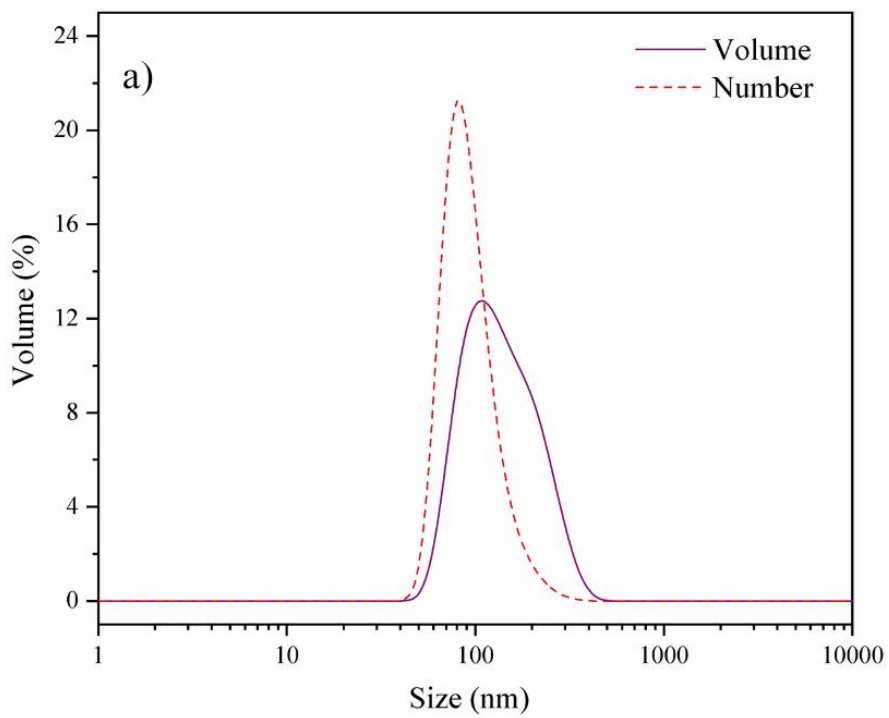
O potencial zeta é um fator principal que representa a carga elétrica das partículas e indica a estabilidade das nanoemulsões. Os resultados obtidos para as diferentes concentrações de óleo essencial mostraram que EB (sem a adição do óleo essencial), apresenta um potencial zeta de -41.68 mV e com 3% do óleo essencial e 5% do óleo essencial o potencial zeta é de -41.32 mV e -42.34 mV, respectivamente. Os mesmos mostraram que as nanoemulsões apresentaram valores de potencial zeta negativos, que podem ser associados ao surfactante (saponina) e à carga negativa dos óleos essenciais (Tinh et al., 2025).

Tabela 4- Tamanho médio de gotícula e Potencial Zeta

Amostra	Potencial Zeta (mV)	Tamanho(nm)
EB	-41.68 ± 0.6614	142 ± 2.58
EOE 3%	-41.32 ± 0.8728	124.4 ± 0.89
EOE 5%	-42.34 ± 0.2986	124.7± 0.35

Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3).
Valores expressos como média ± desvio padrão.

Como reportado anteriormente, o tamanho médio das partículas em “EB” é ligeiramente maior (142 nm) em comparação com aquelas contendo 3% e 5% de emulsão (aproximadamente 124 nm). Esses dados sugerem que a incorporação do óleo essencial não compromete a estabilidade e sim, influencia positivamente nas propriedades interfaciais, indicando uma melhoria evidente na formulação com 5% de OE (Nunes et al., 2018; Zhang & Xia, 2025). O potencial zeta permite avaliar a estabilidade das nanoemulsões formuladas, tanto na amostra controle (sem óleo essencial) quanto nas nanoemulsões com 3 e 5% de óleo essencial. Os resultados mostram que todas as amostras apresentam valores de potencial zeta elevados em módulo (em torno de -41 a -42 mV). Em sistemas coloidais, quando o potencial zeta em módulo é maior do que 30 mV, isso geralmente indica uma forte repulsão eletrostática entre as partículas, o que reduz a tendência de aglomeração e confere boa estabilidade (Chang et al., 2020; Showkat et al., 2025).



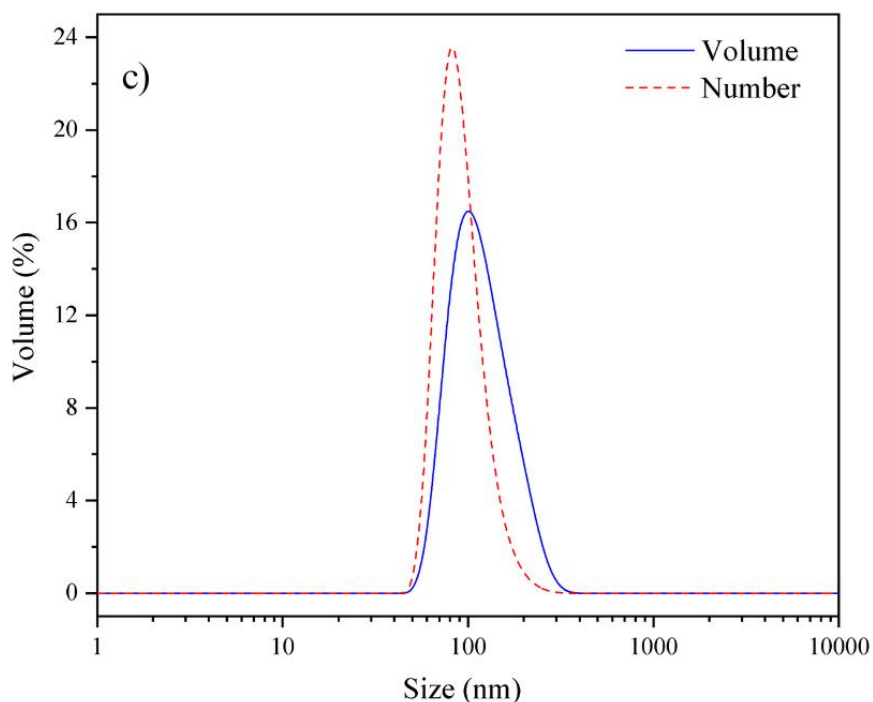


Figura 7- Tamanho de gotícula das nanoemulsões a) controle, b) 70/30 e c) 50/50.

O potencial zeta é um parâmetro fundamental para avaliar a estabilidade das emulsões. Valores absolutos elevados nesse parâmetro indicam uma repulsão eletrostática mais intensa entre as partículas e impede a floculação e a coalescência das gotículas (Zhu et al., 2023).

Inicialmente, a amostra controle (Figura 7a) apresenta o volume máximo próximo a 400 nm, evidenciando que poucas partículas maiores dominam o volume total. Esse desalinhamento indica uma maior polidispersidade, o que pode reduzir a estabilidade da formulação e alterar o perfil de liberação dos compostos ativos (Showkat et al., 2025). Além disso, o pico observável é mais amplo e menos definido que o das amostras contendo óleo, ainda que o valor de potencial zeta elevado (-41mV) sinalize boa estabilidade coloidal, ao adicionar óleo essencial, esse pico estreitou-se, indicando uma distribuição homogênea e uma estabilidade mais robusta. (Guerra-Rosas et al., 2017). Nesse sentido, as nanoemulsões com óleo essencial (Figura 7b e 7c) são de forma geral, estáveis, uma vez que os picos estão próximos de 100 nm e esse valor indica uma boa estabilidade coloidal, o que pode ser

relacionado à intensificação da repulsão eletrostática entre as gotículas ou nanopartículas e à melhoria da estabilidade coloidal que asseguram comportamento uniforme durante armazenamento (Zhou et al., 2022).

A presença de pico único e relativamente estreito indica distribuição razoavelmente homogênea das partículas. Contudo, em comparação com as macroemulsões tradicionais, as nanoemulsões demonstram maior resistência à agregação de partículas — envolvendo processos como floculação e coalescência — atribuída ao seu reduzido tamanho de gotícula (McClements & Rao, 2011; Tadros et al., 2004).

5.3 Caracterização dos filmes

Os filmes foram desenvolvidos baseado na metodologia por De Rezende et al. (2025) com modificações descrito no item 4.5, tendo-se usado K-carregenina a 2,5% (*m/m*) e como plastificante foi adicionado glicerol a 30% (*m/m*).

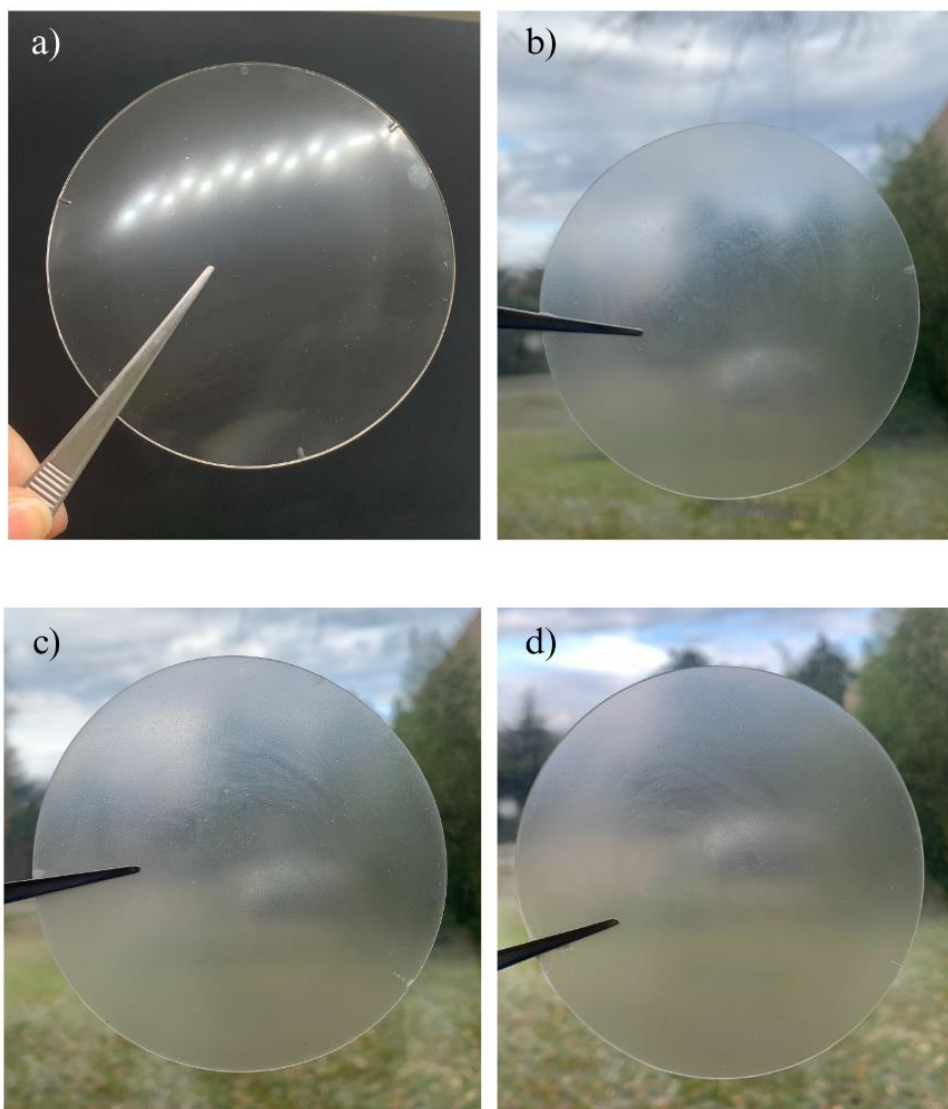


Figura 8- Filmes de nanoemulsão 70/30 com diferentes volumes adicionados, a) controle, b) 2mL, c) 3mL e d) 5mL de nanoemulsão.

A Figura 8 apresenta os filmes correspondentes à quantidade de óleo essencial na nanoemulsão de 3%. A Figura 8 a), corresponde ao controle, sem adição de nanoemulsão, apenas K-carregenina e glicerol. As demais figuras, b), c) e d) foi variado apenas o volume de nanoemulsão incorporado – 2mL, 3mL e 5 mL, respectivamente, o que justifica o aumento progressivo da turbidez observada em cada filme.

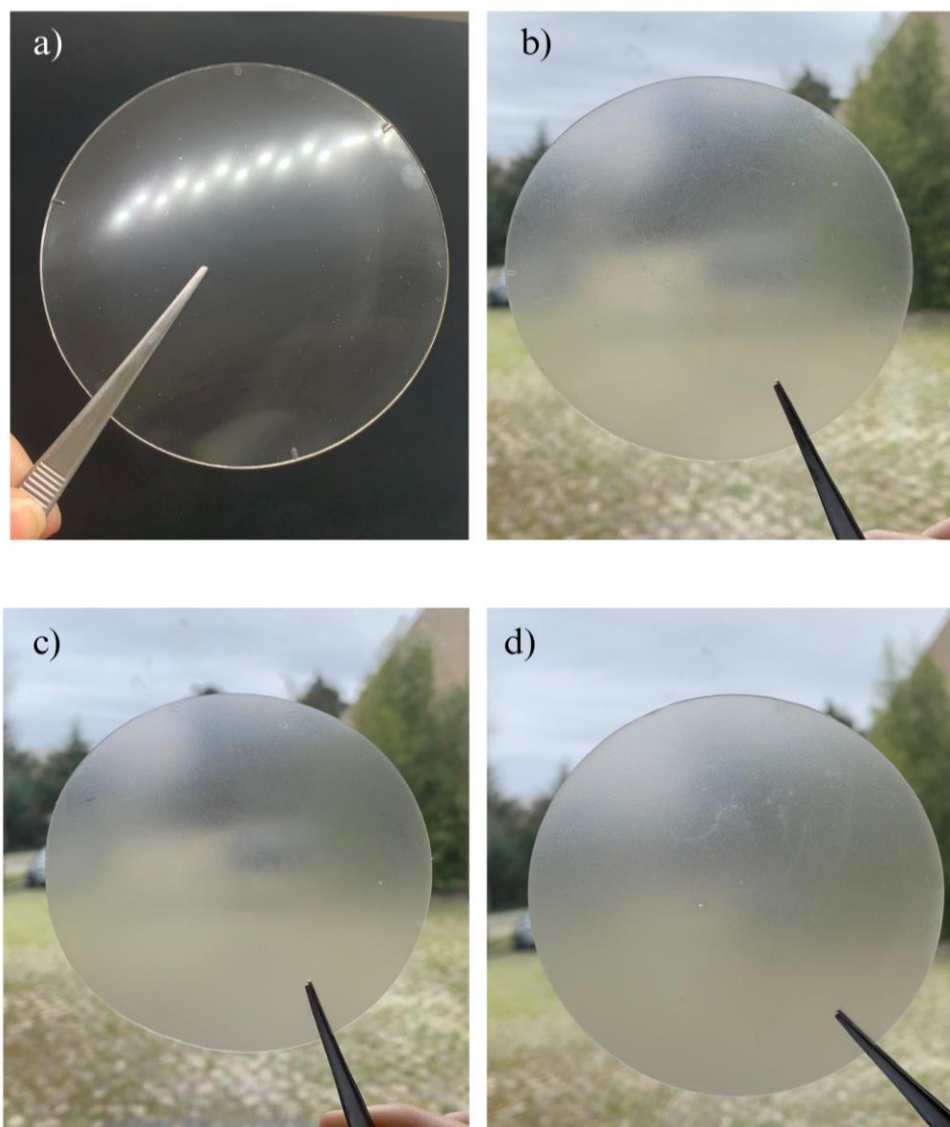


Figura 9- Filmes de nanoemulsão 50/50 com diferentes volumes adicionados, a) controle, b) 2mL, c) 3mL e d) 5mL de nanoemulsão.

A Figura 9 apresenta os filmes produzidos com nanoemulsão contendo 5% de óleo essencial. Na subfigura a), demonstra o controle preparado com K-carragenina e glicerol sem nanoemulsão. Nas subfiguras b), c) e d) foram adicionados respectivamente, 2mL, 3 mL e 5mL de nanoemulsão. Em comparação com as turbidezes observadas nos filmes contendo 3% de óleo essencial (Figura 8), nota-se que os preparados com 5% exibiram opacidade ainda mais acentuada, confirmando o impacto da concentração de óleo essencial na aparência dos filmes.

5.3.1 Espessura dos filmes

Foram realizados testes para os filmes produzidos a partir das nanoemulsões, sendo eles nomeados “KC-X-Y”, onde “X” corresponde à quantidade de óleo essencial na nanoemulsão (3 ou 5%) e “Y” a quantidade em mL da nanoemulsão utilizada na preparação dos filmes, como referido na secção de materiais e métodos. Os resultados de espessura apresentados na Tabela 5 revelaram o aumento na espessura devido à adição da nanoemulsão. O filme branco (KC-0) apresentou 71.3 μm , e um aumento gradual na espessura foi observado com a adição de emulsão contendo óleo essencial de capim-limão-fino. A espessura do filme com concentração máxima de OE (KC-5-5) aumentou para 101 μm , sendo possível observar a mesma tendência para a amostra KC-3-5 que apresentou um aumento de 38.7 μm em relação ao filme branco.

Tabela 5- Caracterização da espessura dos filmes contendo EOE.

Código da amostra	Espessura (μm)
KC-0	71.3 \pm 3.8 ^e
KC-3-2	92.4 \pm 6.17 ^{b,c,d}
KC-3-3	104.00 \pm 7.48 ^{a,b}
KC-3-5	110 \pm 14.3 ^a
KC-5-2	81.9 \pm 3.06 ^{de}
KC-5-3	86.3 \pm 5.32 ^{cde}
KC-5-5	101.00 \pm 7.78 ^{abc}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Letras diferentes em cada coluna correspondem a diferenças significativas ($\alpha = 0,05$).

A espessura é um dos atributos mais importantes em filmes e revestimentos, pois não só define a sua cor e aparência, mas também influencia diretamente a resistência mecânica e a capacidade de atuar como barreira contra o vapor de água e outros gases. Em resumo, variações sutis nessa característica podem transformar completamente o desempenho e a durabilidade do material, afetando sua eficiência em diversas aplicações (Erfanifar et al., 2023). A espessura dos filmes varia de acordo com a quantidade de sólidos que permanecem após o processo de desidratação. No estudo, observou-se que o filme controle, sem adição de componentes extras, resultou na menor espessura, o que evidencia

como o conteúdo residual influencia essa propriedade.

Ao elevar a concentração de óleo essencial e incorporar nanoemulsões de OE, os filmes ficaram visivelmente mais espessos. Esse resultado pode ser explicado pela presença de nanogotas que se integram à estrutura do filme, aumentando a densidade do material e a quantidade de compostos. Vale ressaltar que, mesmo aplicando a mesma quantidade de solução em cada placa de Petri, as variações na composição acabaram gerando diferenças importantes na espessura final dos filmes. Além disso, as variações na composição química volátil do óleo essencial podem ampliar a distância entre as partículas na matriz, promovendo a formação de camadas mais espessas (Jiang et al., 2020).

Segundo Shojaee-Aliabadi et al(2014) e Xue et al(2019) que investigaram o efeito de incorporar emulsões com óleo essencial de orégano, limão e toranja em uma matriz formulada com isolados de proteína de soja e conjugados de goma acácia, essa adição resultou em um aumento marcante na espessura dos filmes, o que esteve diretamente relacionado a um acréscimo na massa total de sólidos da matriz. Este resultado evidencia como a composição dos óleos essenciais pode influenciar as características físicas dos filmes (Xue et al., 2019). Os resultados relatados por Shojaee-Aliabadi et al. (2014) em filmes de k-carragenina contendo óleo essencial de *Satureja hortensis* se alinham perfeitamente com os resultados que obtivemos neste estudo, ambos apontando para tendências semelhantes nas propriedades dos filmes.

5.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em modo de refletância total atenuada (ATR)

A análise de espectroscopia de infravermelho possibilitou identificar os principais grupos funcionais moleculares da amostra, uma vez que o perfil espectroscópico está diretamente relacionado à sua composição (Kalschne et al., 2020). Nas Figuras 7, 8 e 9 são apresentados os espectros FTIR-ATR do óleo essencial de capim-limão-fino, da k-carragenina e dos filmes KC-3 e KC-5 — estes últimos formulados à base de k-carragenina como agente formador de filme e glicerol como plastificante.

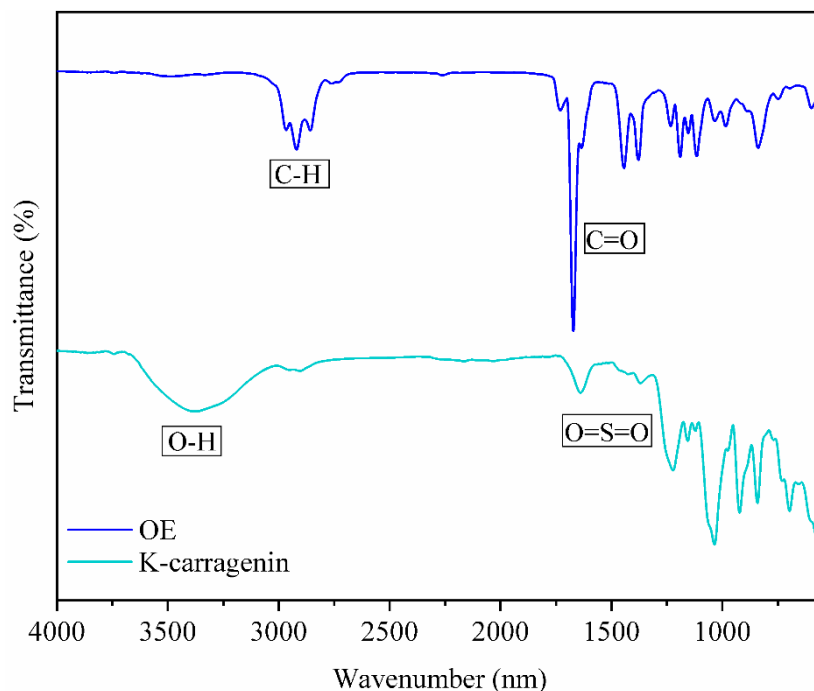


Figura 10- Análise de espectroscopia de infravermelho dos ingredientes K-carragenina e óleo essencial de Capim-limão-fino.

Em filmes de κ -carragenina, a análise por FTIR revela diversos picos característicos que auxiliam identificação dos grupos funcionais presentes e permitem inferir sobre as interações na matriz, observa-se uma banda larga entre 3200 e 3500 cm^{-1} , atribuída ao estiramento das ligações O–H dos grupos hidroxilo, com um pico específico em 3361 cm^{-1} reforçando essa presença. Na região dos hidrocarbonetos, picos entre 2800 e 2900 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento C–H dos grupos CH_2 e CH_3 , típicos da cadeia de açúcares presente na carragenina (Yadav & Chiu, 2019). Uma banda em torno de 1640 cm^{-1} , relacionada à vibração de flexão O–H, evidencia a água residual na amostra, ressaltando a sua hidratação natural. Adicionalmente, um pico proeminente em torno de 1206 e 1220 cm^{-1} é atribuído ao estiramento assimétrico do grupo sulfato de éster (O=S=O), fundamentais para identificar a carragenina e distinguir entre seus tipos (kappa, iota e lambda), sendo que na kappa essa banda é particularmente característica (Jancikova et al., 2020; Martins et al., 2012). Estudos recentes, como o de Martins et al.(2021) relataram bandas semelhantes em filmes comestíveis à base de carragenina, corroborando a validade desses achados. No espectro de FTIR do óleo essencial, destacam-se padrões vibracionais que elucidam a presença e a natureza dos componentes lipofílicos, característicos dos óleos essenciais. Inicialmente, os picos entre 3000 e 2850 cm^{-1} estão associados aos estiramentos

das ligações C–H em cadeias alifáticas longas, evidenciando a abundância desses segmentos presentes nos compostos lipofílicos. De forma complementar, bandas intensas na faixa de 2900–2800 cm^{-1} representam as vibrações de estiramento dos grupos CH_2 , CH_3 e CH , reforçando a forte presença das ligações alifáticas comuns nos componentes dos óleos essenciais. Ademais, as bandas localizadas entre 1600 e 1500 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos das ligações $\text{C}=\text{C}$ em estruturas aromáticas ou fenólicas, o que sugere a presença de terpenos ou de outros compostos fenólicos, frequentemente relacionados às propriedades bioativas desses extratos. Essas características, em conjunto, fornecem uma visão da composição molecular do sistema e das interações dos grupos funcionais, contribuindo para uma melhor compreensão da eficácia e do perfil dos componentes incorporados.

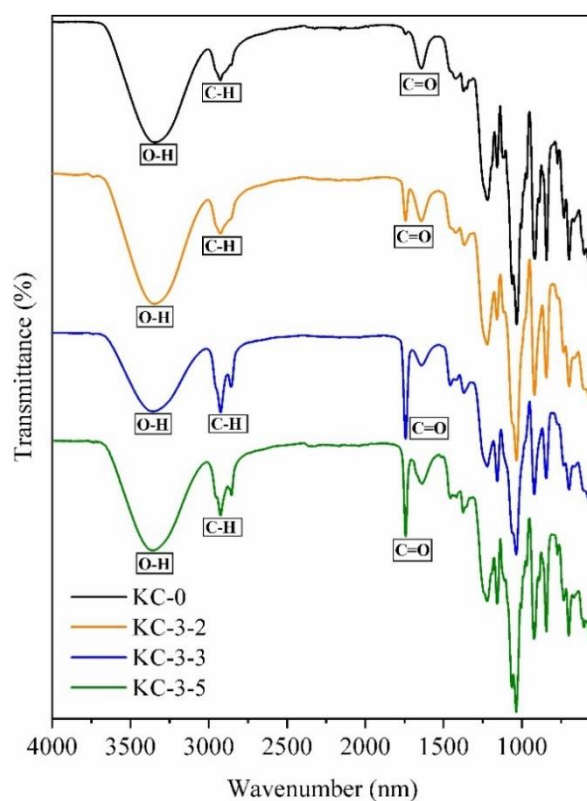


Figura 11- Análise de espectroscopia de infravermelho dos filmes KC-3 a partir de nanoemulsões.

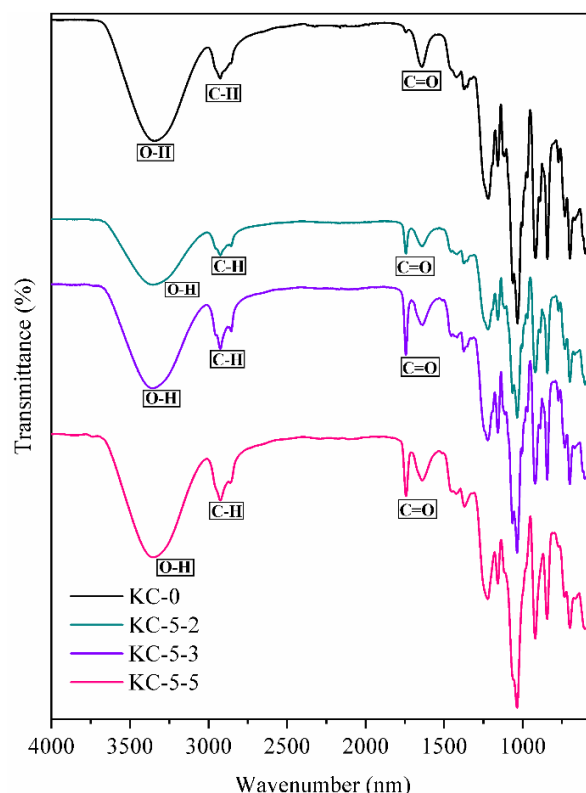


Figura 12- Análise de espectroscopia de infravermelho dos filmes KC-5 a partir de nanoemulsões.

Na análise dos espectros de FTIR dos filmes, evidencia-se uma complexa interação entre o polímero constituinte e os componentes presentes no óleo essencial. Em ambos os casos, destaca-se uma banda larga e intensa na faixa de $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, atribuída principalmente aos estiramentos dos grupos O–H. Essa faixa é característica dos grupos hidroxilos abundantes no polímero, podendo também refletir vestígios de água residual ou até mesmo a contribuição dos componentes do óleo essencial. Além disso, os picos situados entre 2850 e 2950 cm^{-1} são resultado dos estiramentos das ligações C–H alifáticas, ocorrendo nos grupos metil e metileno. Essa região do espectro é indicativa da presença marcante de constituintes lipofílicos, como os derivados do Miglyol, reforçando a importância dos componentes da emulsão na composição dos filmes (Simona et al., 2021).

Outro aspecto notório é a presença de um pico bem definido em torno de 1740 cm^{-1} , associado ao estiramento das ligações C=O. Esse pico não apenas indica a presença de grupos carbonilo oriundos dos ésteres do Miglyol, mas também pode evidenciar as interações intermoleculares entre o óleo essencial e a matriz polimérica.

A comparação dos espectros entre os filmes KC-3-X (3% de óleo essencial) e KC-5-X (5% de óleo essencial) confirma que as amostras com maiores concentrações de óleo essencial apresenta picos, especialmente na região do carbonilo, com intensidade mais acentuada. Em suma, os resultados de FTIR mostram que a presença do óleo essencial altera significativamente o perfil espectral dos filmes, ressaltando a influência dos componentes lipofílicos na definição das interações interfaciais e na modulação da estrutura do polímero. Essas mudanças podem ter implicações importantes nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes, potencializando seu desempenho em aplicações específicas.

Observa-se que os espectros medidos evidenciam claramente a presença dos componentes estruturais principais. No espectro da amostra de controle (KC-0), constata-se a combinação das vibrações características da carragenina, principal formadora do filme, com as do glicerol, que atua como plastificante. Dessa forma, é plausível que a emulsão contendo óleo essencial incorporada nos filmes contribua para algumas das características espectrais.

5.3.3 Determinação de permeabilidade ao vapor de água

Permeabilidade ao vapor de água constitui uma propriedade fundamental na avaliação da eficácia de um filme como barreira contra a umidade. Em se tratando de filmes comestíveis, essa capacidade torna-se ainda mais crítica, pois minimiza significativamente a transferência de umidade entre o alimento e a atmosfera, preservando as características sensoriais e prolongando a vida útil do produto (Saidi et al., 2025). Os gráficos apresentam a evolução da permeabilidade ao vapor de água dos filmes, mensurada pela percentagem de perda de massa ao longo do tempo (de 0 a 24 horas). Nele, são comparados quatro tipos de filmes: três com nanoemulsões de óleo essencial e um filme controle sem a incorporação do óleo (KC-0).

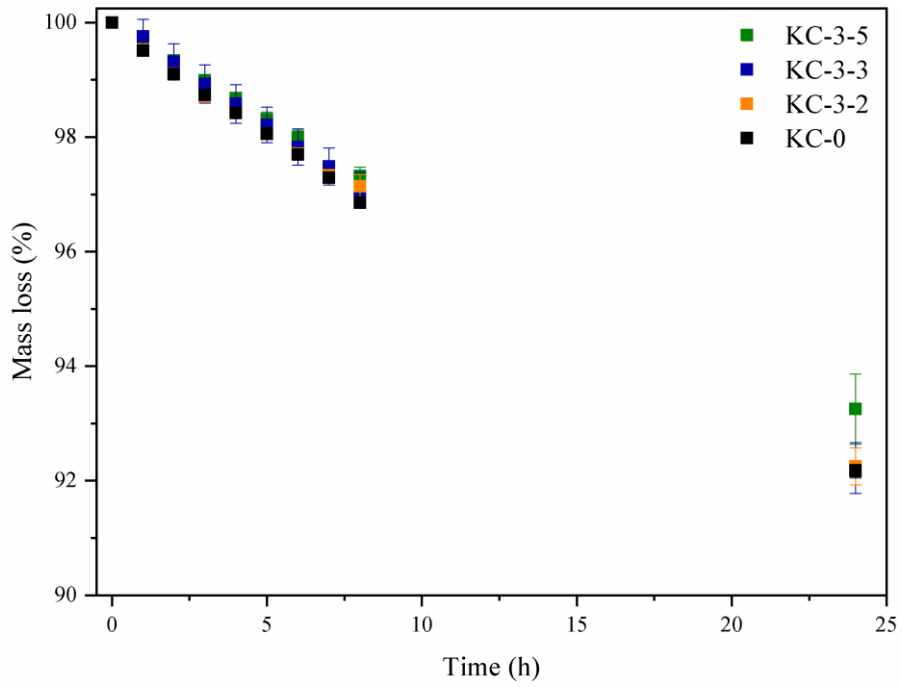


Figura 13- Análise de permeabilidade ao vapor de água ao longo do tempo (0 a 24 horas) dos filmes KC-3.

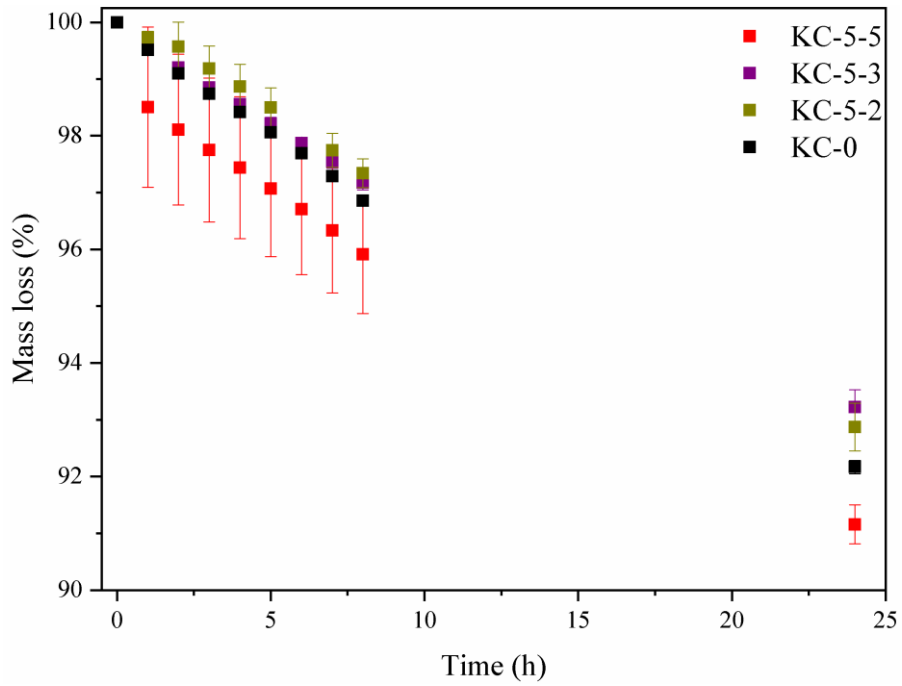


Figura 14- Análise de permeabilidade ao vapor de água ao longo do tempo (0 a 24 horas) dos filmes KC-5.

Tabela 6- Permeabilidade ao vapor de água dos filmes contendo 70/30 e 50/50 de emulsão.

Código da Amostra	WVP ($10^{-6}\text{g}\cdot\text{m} / \text{h}\cdot\text{m}^2 \cdot\text{Pa}$)
KC-0	$1.74 \pm 4.21 \cdot 10^{-9}$
KC-3-2	$2.91 \pm 5.67 \cdot 10^{-8}$
KC-3-3	$2.40 \pm 2.75 \cdot 10^{-7}$
KC-3-5	$2.30 \pm 1.94 \cdot 10^{-7}$
KC-5-2	$1.80 \pm 8.52 \cdot 10^{-8}$
KC-5-3	$1.80 \pm 9.23 \cdot 10^{-8}$
KC-5-5	$2.52 \pm 4.38 \cdot 10^{-7}$

Os ensaios foram realizados em duplicata (n = 2).
Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Inicialmente, todos os filmes registaram valores semelhantes, mas a partir de aproximadamente 10 horas, observa-se uma queda mais acentuada na percentagem da massa retida – ou, inversamente, um aumento na perda de massa – indicando o início de um processo contínuo de passagem do vapor de água através do filme. Comparando os diferentes sistemas, nota-se que os filmes incorporados com óleo essencial demonstram uma menor perda de massa ao longo do tempo em relação ao filme controle, o que pode estar relacionado com o teor de óleo essencial que impede a difusão de água (Mora-Palma et al., 2024). Entre eles, o filme KC-3-5, que contém a maior concentração de óleo essencial, mantém valores mais elevados (isto é, menor permeabilidade), sugerindo que a presença de uma quantidade maior do componente hidrofóbico atua significativamente como barreira à transmissão de umidade. Segundo Wang et al. (2023), o que resulta na diminuição da permeabilidade ao vapor de água (WVP) dos filmes, é a formação de barreira ao vapor de água, a hidrofobicidade reforçada e o entrecruzamento formam um caminho mais tortuoso para as moléculas de H₂O, diminuindo sua permeação através do filme. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que a incorporação de nanoemulsões de óleo essencial na matriz polimérica preenche os poros e interfere na formação de vias condicionantes para a migração do vapor (Saidi et al., 2025).

Em todas as amostras há uma tendência de diminuição na percentagem de massa retida conforme o tempo, evidenciando a passagem do vapor d'água através da matriz do filme. No entanto, é de destacar que a amostra KC-5-5 apresenta a queda mais acentuada na percentagem de massa, o que indica que, para essa formulação, a incorporação máxima dos

componentes da nanoemulsão possivelmente comprometeu a continuidade da rede polimérica. Essa situação pode ter gerado microestruturas ou canais que facilitam a migração do vapor d'água, resultando em uma barreira menos eficaz. Em contrapartida, as amostras KC-5-3 e KC-5-2 demonstram uma perda de massa menos pronunciada, sugerindo que uma dosagem moderada da emulsão promove um melhor equilíbrio entre a incorporação dos componentes lipofílicos e a manutenção da integridade da matriz polimérica, melhorando assim as propriedades barreira. De maneira similar, Daeialiakbar et al. (2025) observaram que a adição excessiva de nanomateriais hidrofóbicos em filmes de quitosana resultava na formação de canais microscópicos, promovendo uma maior transmissão de vapor. Adicionalmente, a incorporação de óleos essenciais em filmes formulados à base de polissacarídeo pode intensificar as interações hidrofóbicas entre as cadeias polissacarídicas, dificultando a passagem do vapor de água e, conseqüentemente, reduzindo a permeabilidade ao vapor nesses filmes (Nazurah et al., 2022).

5.3.4 UV-VIS

A técnica de espectrofotometria UV-VIS foi empregada para investigar as propriedades ópticas dos filmes, permitindo não só a identificação dos componentes ativos, como os óleos essenciais, mas também a avaliação das interações moleculares que ocorrem na interface. Os efeitos das diferentes proporções de miglyol/OE na transparência óptica dos filmes são demonstrados na Figura 15. À medida que conteúdo de nanoemulsão foi incrementado, notou-se uma redução na transparência, o que resultou em uma ligeira opacidade nos filmes.

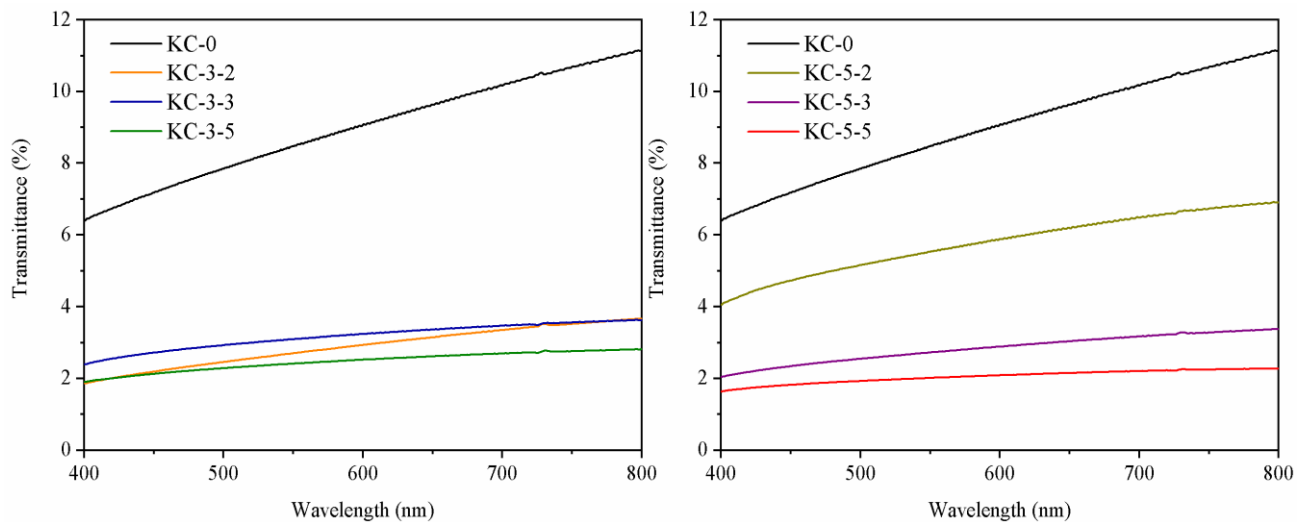


Figura 15- UV-VIS filmes á base de k-carragenina com emulsão 70/30 e 50/50 respectivamente.

Segundo os estudos realizados por Shojaee-Aliabadi et al. (2013) e Simona et al. (2021) a adição de óleos essenciais em filmes poliméricos, como no presente trabalho à base de carragenina, revelou uma redução significativa na transparência dos filmes, atribuída ao teor de compostos fenólicos presentes nos OEs. Além disso, com o aumento gradual da quantidade de emulsão, observou-se uma maior opacidade nos filmes, indicando uma relação direta entre a transparência e a quantidade de emulsão.

A Figura 15 exibe a transmitância (em %) de filmes à base de k-carragenina em função do comprimento de onda (de 400 a 800 nm). Observa-se que os valores de transmitância ficam em uma faixa baixa (0 a 12 %), o que sugere que os filmes apresentam alta opacidade ou, alternativamente, um elevado grau de dispersão e absorção da luz. Essa característica pode estar relacionada à estrutura interna dos filmes, onde a incorporação de emulsão nos filmes pode reduzir a transmitância da luz, em razão das gotículas dispersas presentes na emulsão (Shen et al., 2021).

Sendo assim, quanto menor a concentração de emulsão, maior é a transparência do filme. As amostras contendo emulsão 70/30 designadas como KC-3-X, apresentaram uma diferença sutil na opacidade em comparação com as amostras da fração 50/50, denominadas KC-5-X. Isso sugere que frações maiores de emulsão resultam em uma transparência reduzida. Esse comportamento é ainda mais evidente na comparação com a amostra controle, KC-0, que exibiu maior transparência em relação aos filmes contendo OE em diferentes concentrações. Portanto, a diminuição da transmitância indica um potencial

aumento da capacidade do filme de absorver energia luminosa.

5.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana

5.4.1 Atividade Antimicrobiana dos Filmes

A incorporação de nanoemulsões contendo óleos essenciais em filmes poliméricos torna-se uma estratégia promissora para inibir a proliferação de microrganismos patogênicos, contribuindo para a extensão da vida útil dos alimentos e para a redução dos riscos de contaminação, pois permite uma liberação controlada dos princípios ativos. Foram selecionados, para a análise de atividade antimicrobiana, os filmes com maior proporção de óleo essencial na nanoemulsão, isto é 50/50. A nomenclatura passou a ser “KC-X”, em que X representa o volume de nanoemulsão incorporado ao filme (em mL). Assim, KC-0 corresponde ao filme sem nanoemulsão, e KC-2, KC-3 e KC-5 referem-se aos filmes contendo 2, 3 e 5 mL de nanoemulsão, respectivamente. Para a avaliação, esses filmes foram testados contra bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, nomeadamente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, causadoras de infecções ou intoxicações alimentares, permitindo verificar a eficácia do sistema ativo na inibição e redução desses microrganismos. As Figura 16 e Figura 17 apresentam a variação da contagem bacteriana (em log CFU/mL) ao longo do tempo (0, 60 e 120 minutos), enquanto que as Figura 18 e Figura 19 demonstram a redução bacteriana em %.

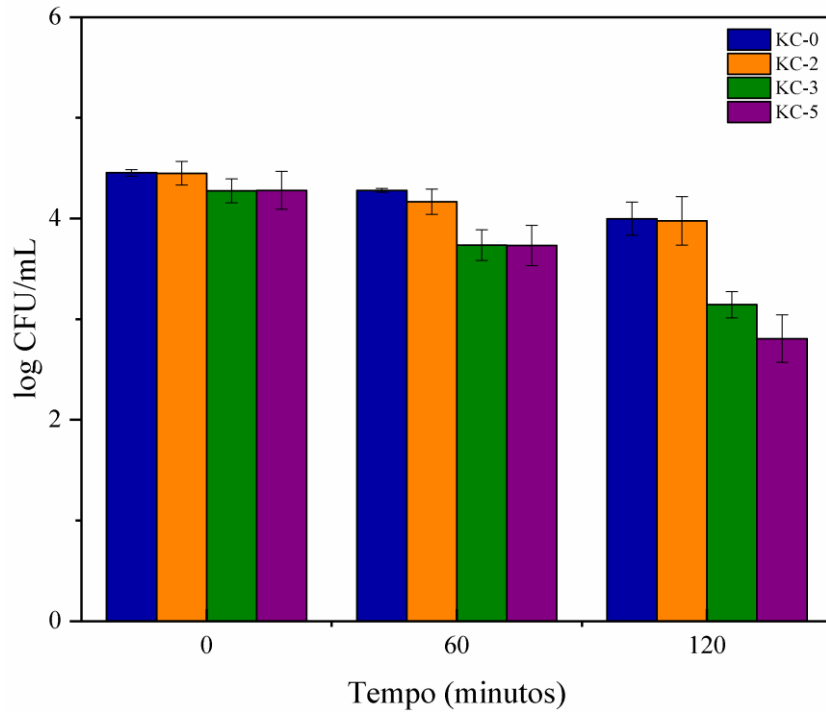


Figura 16- Teste de inibição de *Escherichia coli* pelos filmes contendo nanoemulsão de óleo essencial (proporção 50/50).

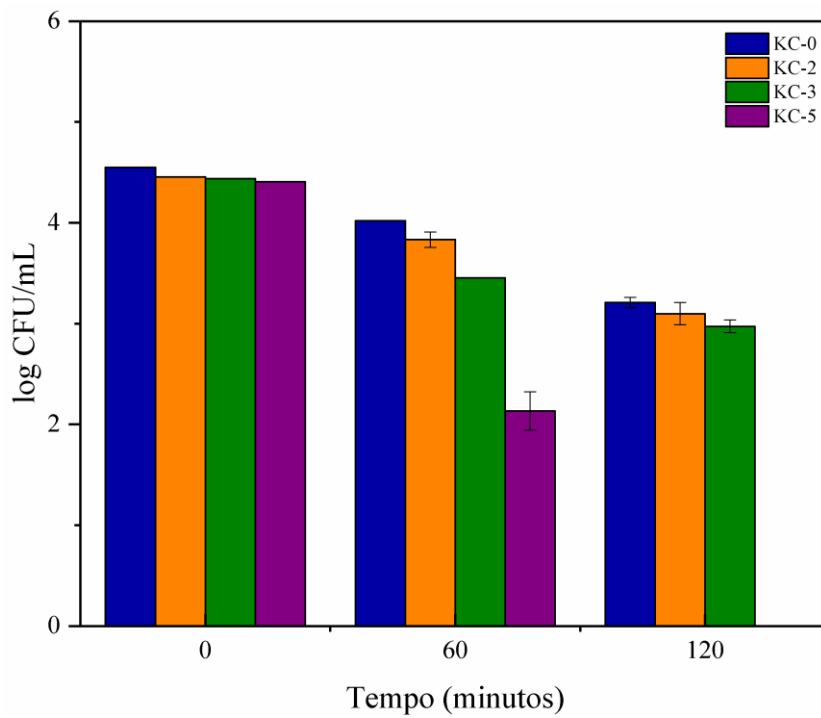


Figura 17- Teste de inibição de *Staphylococcus aureus* pelos filmes contendo nanoemulsão de óleo essencial (proporção 50/50).

No gráfico de inibição da bactéria *E. coli*, inicialmente, todas amostras iniciam o teste com contagens bacterianas semelhantes, evidenciadas pelos valores em log CFU/mL uniformes. Essa homogeneidade confirma que as amostras possuíam uma carga bacteriana inicial praticamente igual, garantindo a confiabilidade dos resultados subsequentes. Após 120 minutos, o efeito inibitório dos filmes se torna mais pronunciado, demonstrando uma eficácia cumulativa ao longo do tempo. Destaca-se que a condição KC-5 apresenta a contagem de *E. coli* mais baixa, indicando um desempenho superior na redução da população bacteriana. As demais condições, embora também tenham mostrado diminuição, não atingiram a mesma expressividade alcançada pelo KC-5. Ademais, para inibição do crescimento de *S. aureus* após 120 minutos de exposição, o efeito inibitório em log CFU/mL, do filme KC-5 se intensifica, evidenciando uma eficácia cumulativa do tempo de contato. Essa progressão temporal reforça o potencial dos filmes ativos para uma ação prolongada e eficaz contra *S. aureus*.

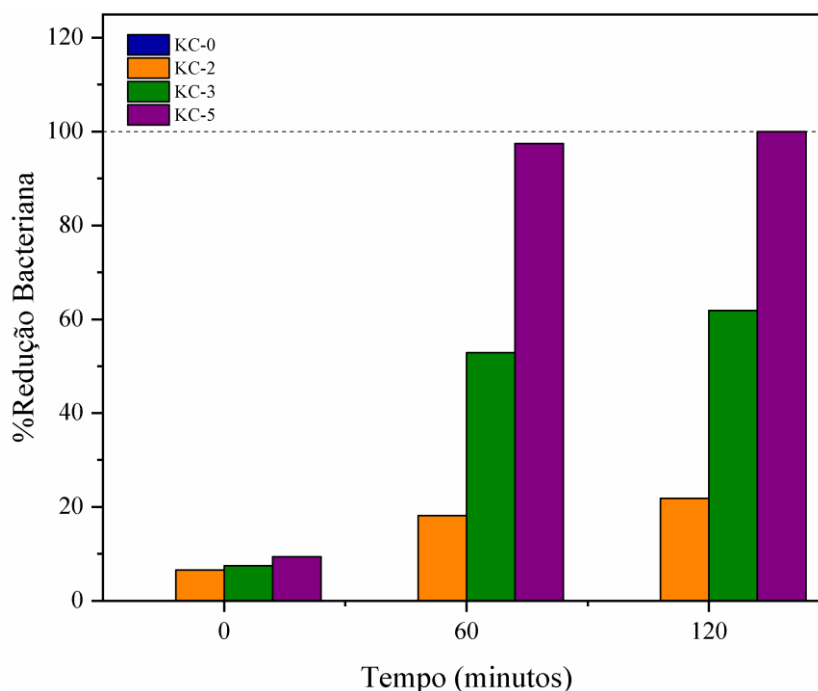


Figura 18- Teste de Redução Bacteriana de *Escherichia coli* pelos filmes contendo nanoemulsão de óleo essencial (proporção 50/50).

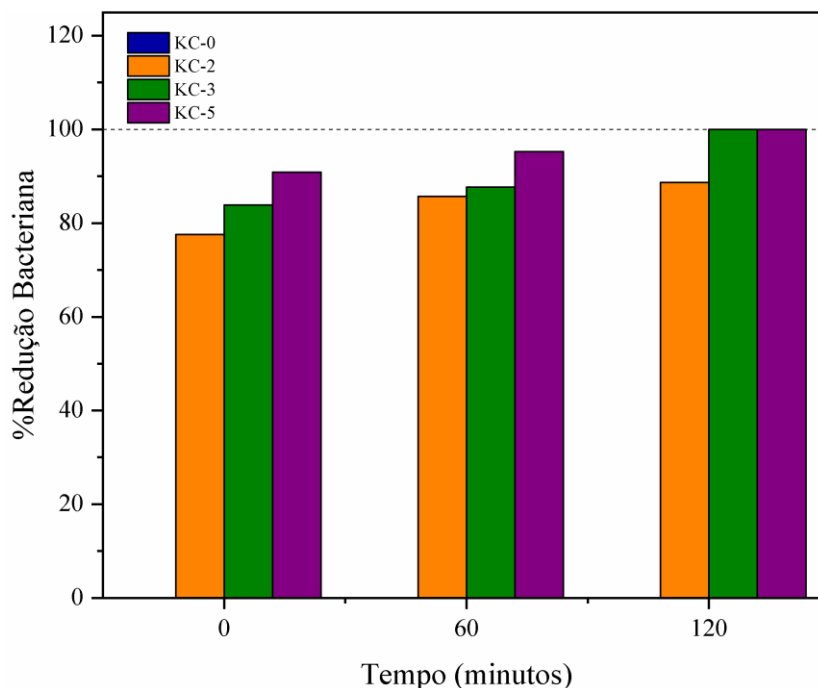


Figura 19- Teste de Redução Bacteriana de *Staphylococcus aureus* pelos filmes contendo nanoemulsão de óleo essencial (proporção 50/50).

A redução das bactérias *Escherichia coli* e *S. aureus* pelos filmes evidencia um padrão claro de efeito antimicrobiano cumulativo e dependente do tempo. Para ambos, no início do experimento, praticamente não houve redução bacteriana, o que é esperado, pois os filmes ainda não tiveram tempo suficiente para liberar os compostos bioativos responsáveis pela inibição, em especial o filme controle KC-0 que não apresentou nenhuma redução bacteriana, mantendo 0% em todos os tempos. Aos 60 minutos, observa-se um aumento na porcentagem de redução bacteriana para todas as formulações testadas, indicando que a liberação dos agentes antimicrobianos já iniciou sua ação, resultando em uma diminuição parcial da população. No entanto, para *E. coli* aos 120 minutos, a porcentagem de redução bacteriana é substancialmente maior em todas as condições, demonstrando que o efeito antimicrobiano se intensifica com o prolongamento do tempo de contato. Em particular, o tratamento KC-5 se destaca ao apresentar a maior porcentagem de redução bacteriana, o que pode refletir uma liberação mais eficiente e contínua do óleo essencial ou uma concentração de compostos bioativos mais elevada. Por outro lado, para *S. aureus* ao prolongar o tempo de contato para 120 minutos, as formulações com maior

proporção de óleo essencial, especialmente aquelas identificadas como KC-5 e KC-3, atingem os maiores índices de inibição. Isso sugere que, com o aumento do tempo de exposição, os tratamentos otimizados promovem a liberação contínua e eficaz dos agentes antimicrobianos, potencializando a redução da população de *S. aureus*. Contudo, particularmente no experimento de redução de *S. aureus* verifica-se que o próprio filme se encontra associado a uma diminuição de bactérias, o que pode estar relacionado com um efeito de adsorção do filme condicionando a eficácia da lixiviação das amostras.

Os filmes apresentaram um efeito inibitório mais acentuado contra *Staphylococcus aureus*, embora tenham demonstrado eficácia na redução bacteriana em ambas as espécies. O filme KC-5 apresentou a maior redução no crescimento microbiano, exibiu atividade antibacteriana excepcional, reduzindo significativamente a viabilidade de *E. coli* e *S. aureus*. Igualmente, KC-3 e KC-5 apresentaram eficácia antimicrobiana superior contra bactérias gram-positivas em comparação com a ação observada contra a bactéria gram-negativa, o que está de acordo com os resultados obtidos para o OE de *E. muticus*. Devido à ausência de uma membrana externa lipofóbica adicional, as bactérias Gram-positivas permitem uma penetração facilitada de compostos hidrofóbicos (Otoni et al., 2014). Portanto, o acréscimo na concentração de nanoemulsão no filme resultou em um incremento proporcional do efeito inibitório, corroborando a hipótese de que doses mais elevadas conduzem a níveis superiores de óleo essencial e, por conseguinte, a um desempenho antibacteriano aprimorado. Essa abordagem pode ser valiosa para o desenvolvimento de embalagens ativas que assegurem a integridade dos produtos e a saúde do consumidor.

Os sistemas de entrega baseados em nanoemulsões possibilitam uma liberação lenta e controlada, ampliando a atividade antimicrobiana devido à área de superfície aumentada e à afinidade aprimorada das nanogotas com as células bacterianas, além disso, os sistemas de liberação de revestimentos antimicrobianos baseados em nanoemulsões proporcionam uma liberação lenta e sustentada dos agentes ativos (Alshehri et al., 2024).

6 CONCLUSÕES

Este estudo evidenciou a capacidade do óleo essencial capim-limão-fino (*Elionurus muticus*) como conservante natural, abrangendo sua caracterização química até sua incorporação em sistemas de nanoemulsões e filmes ativos. Por meio da análise de GC-MS foi possível validar a composição química do óleo, ressaltando compostos como, geranial, neral e linalol que corroboram com o desempenho antimicrobiano do OE. As análises de atividade antioxidante (EC50 DPP= 23.9 mg/mL; EC50 redutor=3.9 mg/mL) e antimicrobiana (MIC/MBC de 0.078-0.313% (v/v) contra as bactéria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* fortaleceram seu perfil bioativo, embora com eficácia restrita contra *Pseudomonas aeruginosa*.

O desenvolvimento de nanoemulsões de 3% e 5% de óleo essencial produziu gotículas estáveis e uniformes (tamanho médio: 124-142 nm; potencial zeta: -41mV), sem evidências de agregação. A adição das nanoemulsões em filmes de k-carragenina resultou em materiais com espessuras variáveis de acordo com a adição nos filmes, sendo aqueles que demonstram maiores espessuras foram os que tiveram a maior concentração de nanoemulsões (71-1140 µm), interações hidrofóbicas e presenças de grupos carbonilo, O-H verificadas por FTIR-ATR. Além disso, apresentou uma considerável diminuição da permeabilidade ao vapor de água, que é fundamental para auxiliar a vida útil dos produtos. Os filmes apresentaram efeitos positivos de inibição contra as cepas bacterianas testadas, *E. coli* e *S.aureus* com redução significativa durante o tempo de 120 minutos e melhor desempenho no sistema com maior quantidade de óleo essencial *E. muticus*.

Por fim, o próprio óleo essencial *E. muticus* demonstrou eficácia antimicrobiana e quando adicionado a nanoemulsão e aos filmes, proporcionaram uma abordagem eficiente para unir barreira física e liberação prolongada de agentes antimicrobianos. Essa metodologia permite o avanço na criação de embalagens ativas destinadas ao setor de alimentos, aptas a estender a durabilidade de itens e sem utilizar conservantes artificiais.

7 TRABALHOS FUTUROS

Nos próximos passos desta pesquisa, pretende-se avançar para a aplicação prática dos filmes contendo nanoemulsões de óleo essencial no setor alimentício, por forma a validar, em condições reais, o potencial desses revestimentos antimicrobianos na preservação e segurança dos alimentos. Para isso, os projetos futuros se concentrarão em duas frentes principais: a aplicação dos filmes diretamente em produtos alimentares e a caracterização detalhada desses filmes quando integrados à matriz dos alimentos.

Na vertente da aplicação, o objetivo é testar os revestimentos em diferentes tipos de alimentos, como carnes, queijos, frutas e outros. Esses estudos permitirão avaliar como o filme se comporta em contato com o substrato alimentar, considerando aspectos como a aderência do revestimento à superfície dos alimentos, sua estabilidade durante o armazenamento e o impacto sobre as características sensoriais. Essa abordagem prática será essencial para entender a viabilidade comercial dos sistemas de embalagem ativa e sua capacidade de prolongar a vida útil dos produtos.

Paralelamente, pretende-se aprofundar a caracterização dos filmes aplicados aos alimentos. Essa investigação abrangerá a análise de propriedades físico-químicas fundamentais, como a microestrutura, a resistência mecânica e a eficiência na barreira contra o oxigênio. Além disso, é relevante realizar estudos com o intuito de monitorar o perfil de liberação dos agentes antimicrobianos presentes na nanoemulsão e a migração desses compostos para a matriz alimentar, avaliando o desempenho do sistema sob diferentes condições de armazenamento.

REFERÊNCIAS

- Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 47, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.032>
- Acevedo-Fani, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2017). Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.027>
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation.
- Castro, L. O., & Ramos, R. L. D. (2003). Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (capim-cidrô), *Cymbopogon martinii* (Rox.) J. F. Watson (palma-rosa), *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela), *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack. (capim-limão), *Vetiveria zizanioides* Nash (vetiver). *Fepagro*, 11, 1–31.
- Cenobio-Galindo, A. de J., Campos-Montiel, R. G., Jimenez-Alvarado, R., Almaraz-Buendía, I., Medina-Perez, G., & No, F. F. Sánchez-L. (2019). Development and incorporation of nanoemulsions in food. *International Journal of Food Studies*, 8(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.7455/ijfs/8.2.2019.a10>
- Che Marzuki, N. H., Wahab, R. A., & Abdul Hamid, M. (2019). An overview of nanoemulsion: Concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 779–797. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1620124>
- Cian, R. E., Salgado, P. R., Drago, S. R., González, R. J., & Mauri, A. N. (2014). Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared

- from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers. *Food Chemistry*, 146, 6–14.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.133>
- Cosenza, V. A., Navarro, D. A., Fissore, E. N., Rojas, A. M., & Stortz, C. A. (2014). Caracterização química e reológica das carragenanas de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. *Carbohydrate Polymers*, 102, 780–789.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.090>
- da Silva, W. M. F., Kringel, D. H., de Souza, E. J. D., da Rosa Zavareze, E., & Dias, A. R. G. (2022). Basil Essential Oil: Methods of Extraction, Chemical Composition, Biological Activities, and Food Applications. *Food and Bioprocess Technology*, 15(1), 1–27. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02690-3>
- De Carli, C., Aylanc, V., Mouffok, K. M., Santamaria-Echart, A., Barreiro, F., Tomás, A., Pereira, C., Rodrigues, P., Vilas-Boas, M., & Falcão, S. I. (2022). Production of chitosan-based biodegradable active films using bio-waste enriched with polyphenol propolis extract envisaging food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 213, 486–497.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.155>
- Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A.-C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., Cates, M. E., & Bibette, J. (2011). How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. *Langmuir*, 27(5), 1683–1692. <https://doi.org/10.1021/la104221q>
- Deschamps, C., Amaral, W., Bizzo, H. R., et al. (2013). Teor e composição do óleo essencial de *Elyonurus muticus* Sprengel (Poaceae) nos Campos Gerais da Floresta Atlântica do estado do Paraná. In VII SBOE Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais (pp. 1–2).
- Dhall, R. K. (2013). Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 435–450.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568>

- Díaz-Montes, E., & Castro-Muñoz, R. (2021). Trends in Chitosan as a Primary Biopolymer for Functional Films and Coatings Manufacture for Food and Natural Products. *Polymers*, 13(5), Artículo 5. <https://doi.org/10.3390/polym13050767>
- Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>
- Dou, L., Li, B., Zhang, K., Chu, X., & Hou, H. (2018). Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1377–1383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.121>
- El-Fawal, G. (2014). Preparation, characterization and antibacterial activity of biodegradable films prepared from carrageenan. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2234–2239. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1255-9>
- Erginkaya, Z., Kalkan, S., & Ünal, E. (2014). Use of Antimicrobial Edible Films and Coatings as Packaging Materials for Food Safety. Em A. Malik, Z. Erginkaya, S. Ahmad, & H. Erten (Orgs.), *Food Processing: Strategies for Quality Assessment* (p. 261–295). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1378-7_10
- Espitia, P. J. P., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. de J., Soares, N. de F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.005>
- Espitia, P. J. P., Fuenmayor, C. A., & Otoni, C. G. (2019). Nanoemulsions: Synthesis, Characterization, and Application in Bio-Based Active Food Packaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 264–285. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12405>
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>

- Füller, T. N., Bertrand, C., Antonello, B., Wesp, C., de Barros, I. B. I., & Barbosa Neto, J. F. (2017). Chemical diversity of wild populations of *Elionurus muticus* (Spreng.) and the allelopathic effect of its essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 29(6), 499–506. <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.1313786>
- Füller, T. N., Tessele, C., Barros, I. B. I., & Barbosa Neto, J. F. (2010). Phenotypical, phytochemical and molecular characterization of “capim-carona” [*Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze] populations. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 12, 261–268. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000300003>
- Gadhawe, A. D. (2014). Nanoemulsions: Formation, Stability and Applications. *Advanced Technologies*, 2(3).
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>
- Goodarzi, F., & Zendehboudi, S. (2019). A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97(1), 281–309. <https://doi.org/10.1002/cjce.23336>
- Gupta, A., Burak Eral, H., Alan Hatton, T., & S. Doyle, P. (2016). Nanoemulsions: Formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826–2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>
- Halliwell, B. (2000). The antioxidant paradox. *The Lancet*, 355(9210), 1179–1180. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02075-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02075-4)
- Hambleton, A., Perpiñan-Saiz, N., Fabra, M. J., Voilley, A., & Debeaufort, F. (2012). The Schroeder paradox or how the state of water affects the moisture transfer through edible films. *Food Chemistry*, 132(4), 1671–1678. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.009>

- Hanan, E., Dar, A. H., Shams, R., & Goksen, G. (2024). New insights into essential oil nano emulsions loaded natural biopolymers recent development, formulation, characterization and packaging applications: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 280, 135751. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135751>
- Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1095–1107. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>
- Hess, S. C., Peres, M. T. L. P., Batista, A. L., Rodrigues, J. P., Tiviroli, S. C., Oliveira, L. G. L., Santos, C. W. C., Fedel, L. E. S., Crispim, S. M. A., Smania Junior, A., Smania, E. F. A., Flach, A., & Pantaroto, S. (2007). Evaluation of seasonal changes in chemical composition and antibacterial activity of *Elyonurus muticus* (sprengel) O. Kuntze (Gramineae). *Química Nova*, 30, 370–373. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200025>
- Inouye, S., Yamaguchi, H., & Takizawa, T. (2001). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 7(4), 251–254. <https://doi.org/10.1007/s101560170022>
- Jin, W., Xu, W., Liang, H., Li, Y., Liu, S., & Li, B. (2016). 1 - Nanoemulsions for food: Properties, production, characterization, and applications. Em A. M. Grumezescu (Org.), *Emulsions* (p. 1–36). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804306-6.00001-5>
- Jouanneau, D., Guibet, M., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Smietana, M., & Helbert, W. (2010). New insights into the structure of hybrid κ - μ -carrageenan and its alkaline conversion. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 452–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.012>

- Kang, H.-J., Kim, S.-J., You, Y.-S., Lacroix, M., & Han, J. (2013). Inhibitory effect of soy protein coating formulations on walnut (*Juglans regia* L.) kernels against lipid oxidation. *LWT - Food Science and Technology*, *51*(1), 393–396. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.019>
- Kelidari, M., Abdi-Moghadam, Z., Esfandiari Sabzevar, T., Khajenouri, M., & Shakeri, A. (2025). Preparation and therapeutic implications of essential oil-based nanoemulsions: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *255*, 114939. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2025.114939>
- Kong, I., Degraeve, P., & Pui, L. P. (2022). Polysaccharide-Based Edible Films Incorporated with Essential Oil Nanoemulsions: Physico-Chemical, Mechanical Properties and Its Application in Food Preservation—A Review. *Foods*, *11*(4), Artigo 4. <https://doi.org/10.3390/foods11040555>
- Kowalska, H., Marzec, A., Domian, E., Kowalska, J., Ciurzyńska, A., & Galus, S. (2021). Edible coatings as osmotic dehydration pretreatment in nutrient-enhanced fruit or vegetable snacks development: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(6), 5641–5674. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12837>
- Li, H., Wang, Y., Liu, F., Yang, Y., Wu, Z., Cai, H., Zhang, Q., Wang, Y., & Li, P. (2015). Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mechanisms involved. *Scientia Horticulturae*, *186*, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.014>
- Li, W., Chen, H., He, Z., Han, C., Liu, S., & Li, Y. (2015). Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(1, Part 1), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.012>
- Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F., & Huang, Q. (2012). Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint Oil Nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(30), 7548–7555. <https://doi.org/10.1021/jf301129k>
- Liu, J., Li, K., Chen, Y., Ding, H., Wu, H., Gao, Y., Huang, S., Wu, H., Kong, D., Yang,

Z., & Hu, Y. (2022). Active and smart biomass film containing cinnamon oil and curcumin for meat preservation and freshness indicator. *Food Hydrocolloids*, 133, 107979. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107979>

- Maali, A., & Mosavian, M. T. H. (2013). Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000–2010). *Journal of Dispersion Science and Technology*, *34*(1), 92–105. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.648498>
- McClements, D. J., Das, A. K., Dhar, P., Nanda, P. K., & Chatterjee, N. (2021a). Nanoemulsion-Based Technologies for Delivering Natural Plant-Based Antimicrobials in Foods. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.643208>
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011a). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *51*(4), 285–330. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>
- Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Garrigós, M. del C., & Jiménez, A. (2016). Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, *133*(2). <https://doi.org/10.1002/app.42631>
- Moeini, A., Pedram, P., Fattahi, E., Cerruti, P., & Santagata, G. (2022). Edible Polymers and Secondary Bioactive Compounds for Food Packaging Applications: Antimicrobial, Mechanical, and Gas Barrier Properties. *Polymers*, *14*(12), Artigo 12. <https://doi.org/10.3390/polym14122395>
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017). Chapter 13—Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. Em A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Orgs.), *Soft Chemistry and Food Fermentation* (p. 379–419). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8>
- Mohamed, S. A. A., El-Sakhawy, M., & El-Sakhawy, M. A.-M. (2020). Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review. *Carbohydrate Polymers*, *238*, 116178. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178>
- Mushtaq, A., Mohd Wani, S., Malik, A. R., Gull, A., Ramniwas, S., Ahmad Nayik, G., Ercisli, S., Alina Marc, R., Ullah, R., & Bari, A. (2023a). Recent insights into

- Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. *Food Chemistry: X*, 18, 100684. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100684>
- Mushtaq, A., Mohd Wani, S., Malik, A. R., Gull, A., Ramniwas, S., Ahmad Nayik, G., Ercisli, S., Alina Marc, R., Ullah, R., & Bari, A. (2023b). Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. *Food Chemistry: X*, 18, 100684. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100684>
- Nair, M. S., Tomar, M., Punia, S., Kukula-Koch, W., & Kumar, M. (2020). Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 304–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.083>
- Nanaki, S., Karavas, E., Kalantzi, L., & Bikiaris, D. (2010). Miscibility study of carrageenan blends and evaluation of their effectiveness as sustained release carriers. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 1157–1167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.067>
- Nile, A., Djebedjian, B., & El-Naggar, M. (2020). Numerical and Experimental Study of Water Hammer in Viscoelastic Pipes with and without Extended Partial Blockage. *Mansoura Engineering Journal*, 43(3), 1–13. <https://doi.org/10.21608/bfemu.2020.95732>
- Norcino, L. B., Mendes, J. F., Natarelli, C. V. L., Manrich, A., Oliveira, J. E., & Mattoso, L. H. C. (2020). Pectin films loaded with copaiba oil nanoemulsions for potential use as bio-based active packaging. *Food Hydrocolloids*, 106, 105862. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105862>
- Ostertag, F., Weiss, J., & McClements, D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 388(1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.089>
- Otoni, C. G., Pontes, S. F. O., Medeiros, E. A. A., & Soares, N. D. F. F. (2014). Edible films from methylcellulose and nanoemulsions of clove bud (*Syzygium aromaticum*)

- and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils as shelf life extenders for sliced bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(22), 5214–5219. Scopus. <https://doi.org/10.1021/jf501055f>
- Panahirad, S., Dadpour, M., Peighambaroust, S. H., Soltanzadeh, M., Gullón, B., Alirezalu, K., & Lorenzo, J. M. (2021). Applications of carboxymethyl cellulose- and pectin-based active edible coatings in preservation of fruits and vegetables: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 663–673. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.025>
- Patrignani, F., Siroli, L., Braschi, G., & Lanciotti, R. (2020). Combined use of natural antimicrobial based nanoemulsions and ultra high pressure homogenization to increase safety and shelf-life of apple juice. *Food Control*, 111, 107051. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107051>
- Paula, G. A., Benevides, N. M. B., Cunha, A. P., de Oliveira, A. V., Pinto, A. M. B., Morais, J. P. S., & Azeredo, H. M. C. (2015). Development and characterization of edible films from mixtures of κ -carrageenan, ι -carrageenan, and alginate. *Food Hydrocolloids*, 47, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.004>
- Perumal, A. B., Huang, L., Nambiar, R. B., He, Y., Li, X., & Sellamuthu, P. S. (2022). Application of essential oils in packaging films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *Food Chemistry*, 375, 131810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131810>
- Plotto, A., Narciso, J. A., Rattanapanone, N., & Baldwin, E. A. (2010). Surface treatments and coatings to maintain fresh-cut mango quality in storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(13), 2333–2341. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4095>
- Poojary, M. M., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Dias, D. A., & Shpigelman, A. (2017). Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.007>

- Prakash, A., Baskaran, R., Paramasivam, N., & Vadivel, V. (2018). Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. *Food Research International*, *111*, 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.066>
- Preeti, Sambhakar, S., Malik, R., Bhatia, S., Al Harrasi, A., Rani, C., Saharan, R., Kumar, S., Geeta, & Sehrawat, R. (2023). Nanoemulsion: An Emerging Novel Technology for Improving the Bioavailability of Drugs. *Scientifica*, *2023*(1), 6640103. <https://doi.org/10.1155/2023/6640103>
- Qadir, A., Faiyazuddin, M. D., Talib Hussain, M. D., Alshammari, T. M., & Shakeel, F. (2016). Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *Journal of Molecular Liquids*, *214*, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.050>
- Rhein-Knudsen, N., Ale, M. T., & Meyer, A. S. (2015). Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies. *Marine Drugs*, *13*(6), Artigo 6. <https://doi.org/10.3390/md13063340>
- Rinaldop,+571_final (1). ([s.d.]).
- Sani, M. A., Azizi-Lalabadi, M., Tavassoli, M., Mohammadi, K., & McClements, D. J. (2021). Recent Advances in the Development of Smart and Active Biodegradable Packaging Materials. *Nanomaterials*, *11*(5), Artigo 5. <https://doi.org/10.3390/nano11051331>
- Schreiner, T. B., Santamaria-Echart, A., Colucci, G., Plasencia, P., Santos Costa, P., Dias, M. M., Pinho, S. P., & Filomena Barreiro, M. (2023). Saponin-based natural nanoemulsions as alpha-tocopherol delivery systems for dermal applications. *Journal of Molecular Liquids*, *391*, 123371. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123371>
- Sharma, R., Nath, P. C., Das, P., Rustagi, S., Sharma, M., Sridhar, N., Hazarika, T. K., Rana, P., Nayak, P. K., & Sridhar, K. (2024). Essential oil-nanoemulsion based edible coating: Innovative sustainable preservation method for fresh/fresh-cut fruits and vegetables. *Food Chemistry*, *460*, 140545

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140545>

Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 343, 128403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128403>

Shinoda, K., & Saito, H. (1968). The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 70–74. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90273-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90273-7)

Solans, C., Morales, D., & Homs, M. (2016). Spontaneous emulsification. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 22, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.03.002>

Suhag, R., Kumar, N., Petkoska, A. T., & Upadhyay, A. (2020). Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. *Food Research International*, 136, 109582. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109582>

Tang, S. Y., Shridharan, P., & Sivakumar, M. (2013). Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions – Comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 485–497. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.04.005>

Thakur, D., Rana, P., Singh, S. K., Bakshi, M., Kumar, S., & Singh, S. (2024). Nanoemulsion edible coating for shelf-life improvement and quality control in perishable products. *Plant Nano Biology*, 10, 100114. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2024.100114>

Toazza, C. E. B. (2020). Otimização, cinética de extração e caracterização química do óleo essencial da espécie nativa capim-carona (*Elyonurus muticus*), e espécies cultivadas *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus* (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

- Toazza, C. E. B., Marques, C., Amaral, W. D., & Masson, M. L. (2021). Comparative study of *Elyonurus muticus* and *Cymbopogon* essential oils: Potential as food preservative and surface coating of strawberries. *Journal of Essential Oil Research*, 33(4), 359–368. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1895336>
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Pisani, A., Gatto, F., & Bardi, G. (2019). Natural Polysaccharide Nanomaterials: An Overview of Their Immunological Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), Artigo 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20205092>
- Tripathi, A. D., Sharma, R., Agarwal, A., & Haleem, D. R. (2021). Nanoemulsions based edible coatings with potential food applications. *International Journal of Biobased Plastics*, 3(1), 112–125. <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1875615>
- Varela, P., & Fiszman, S. M. (2011). Hydrocolloids in fried foods. A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1801–1812. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.016>
- Wani, A. R., Yadav, K., Khursheed, A., & Rather, M. A. (2021a). An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104620. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104620>
- Wani, A. R., Yadav, K., Khursheed, A., & Rather, M. A. (2021b). An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104620. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104620>
- Wongphan, P., & Harnkarnsujarit, N. (2020). Characterization of starch, agar and maltodextrin blends for controlled dissolution of edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.056>
- You, S., Zhang, X., Wang, Y., Jin, Y., Wei, M., & Wang, X. (2022). Development of highly

stable color indicator films based on κ -carrageenan, silver nanoparticle and red grape skin anthocyanin for marine fish freshness assessment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 216, 655–669.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.206>

