

Estudo e influência dos óleos essenciais de cravo, canela e laranja na preparação de filmes de poli (ácido láctico): desenvolvimento de embalagens ativas

Study and influence of clove, cinnamon, and orange essential oils in the preparation of poly (lactic acid) films: Active packaging development

Estudio e influencia de los aceites esenciales de clavo, canela y naranja en la preparación de películas de poli (ácido láctico): Desarrollo de envases activos

Recebido: 27/03/2021 | Revisado: 03/04/2021 | Aceito: 05/04/2021 | Publicado: 18/04/2021

Jéssica Camila da Costa Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2831-7136>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: jessicacclima@hotmail.com

Juliana de Castro Nunes Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6831-1639>
Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Brasil
E-mail: juli_decastro@hotmail.com

Michelle Félix de Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4798-1403>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: mifelixsilva@hotmail.com

Gelsoneide da Silva Góis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0702-705X>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: gelsoneidegois@gmail.com

Ivana Taciana de Almeida Simões

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9777-8833>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: ivanatacianaitas@hotmail.com

Maria Alcilene Alexandre Dantas da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4032-8735>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: alcidan@yahoo.com.br

Yêda Medeiros Bastos de Almeida

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1041-7144>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: yedamba@gmail.com

Glória Maria Vinhas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5073-609X>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: gmvinhas@yahoo.com.br

Resumo

O poli (ácido láctico) – PLA é um polímero biocompatível e biodegradável com algumas propriedades semelhantes aos polímeros convencionais, destacando-se em diversas aplicações, dentre elas, a indústria de embalagens. A substituição dos aditivos convencionais por componentes naturais como os óleos essenciais, vem tornando-se uma alternativa promissora para a produção das chamadas embalagens ativas, que promovem a segurança alimentar a partir da ação antimicrobiana. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi produzir filmes de PLA por *casting* aditivados com óleos essenciais (OE) de cravo, laranja e canela, para sua possível aplicação como embalagem ativa. Os óleos foram caracterizados por Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrômetro de Massa (GC-MS), Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e por disco-difusão em ágar. Os filmes foram caracterizados por Microscopia óptica (MO), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), FTIR, Análise Termogravimétrica (TG) e Análise antimicrobiana do filme. Com os resultados obtidos foi possível observar que o filme de PLA com os óleos essenciais apresentaram melhora no desempenho quanto a sua propriedade térmica e atividade antimicrobiana. Dentre os três filmes aditivados, o filme PLA/OE Cravo destacou-se por haver uma intensa ação bactericida sem degradação do filme, o que o torna um promissor aditivo adicionado ao PLA para aplicações em indústrias de embalagens.

Palavras-chave: PLA; Óleos essenciais; Filmes; Atividade antimicrobiana.

Abstract

Poly (lactic acid) - PLA is a biocompatible and biodegradable polymer with some properties similar to conventional polymers, standing out in several applications, among them, the packaging industry. The substitution of conventional additives for natural components such as essential oils, has become a promising alternative for the production of so-called active packaging, which promote food safety from the antimicrobial action. Therefore, the objective of this work was to produce PLA films by casting with essential oils (OE) of cloves, orange and cinnamon, for its possible application as an active packaging. The oils were characterized by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometer (GC-MS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and by agar disc diffusion. The films were characterized by Optical Microscopy (MO), Differential Scanning Calorimetry (DSC), FTIR, Thermogravimetric Analysis (TG) and Antimicrobial Analysis of the film. With the results obtained it was possible to observe that the PLA film with essential oils showed an improvement in performance regarding its thermal property and antimicrobial activity. Among the three additive films, the PLA / OE Cravo film stood out for having an intense bactericidal action without degradation of the film, which makes it a promising additive added to PLA for applications in packaging industries.

Keywords: PLA; Essential oil; Films; Antimicrobial activity.

Resumen

Poli (ácido láctico) - PLA es un polímero biocompatible y biodegradable con algunas propiedades similares a los polímeros convencionales, destacándose en varias aplicaciones, entre ellas, la industria del embalaje. La sustitución de aditivos convencionales por componentes naturales como los aceites esenciales, se ha convertido en una alternativa prometedora para la producción de los denominados envases activos, que promueven la seguridad alimentaria a partir de la acción antimicrobiana. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue producir películas de PLA mediante colada con aceites esenciales (OE) de clavo, naranja y canela, para su posible aplicación como envase activo. Los aceites se caracterizaron por cromatografía de gases acoplada con espectrómetro de masas (GC-MS), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difusión en disco de agar. Las películas se caracterizaron por Microscopía Óptica (MO), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), FTIR, Análisis Termogravimétrico (TG) y Análisis Antimicrobiano de la película. Con los resultados obtenidos se pudo observar que la película de PLA con aceites esenciales mostró una mejora en el desempeño en cuanto a su propiedad térmica y actividad antimicrobiana. Entre las tres películas aditivas, la película PLA / OE Cravo se destacó por tener una intensa acción bactericida sin degradación de la película, lo que la convierte en un aditivo promotor añadido al PLA para aplicaciones en la industria del embalaje.

Palabras clave: PLA; Aceites esenciales; Películas; Actividad antimicrobiana.

1. Introdução

O poli (ácido láctico) (PLA) é um poliéster alifático, termoplástico com estrutura química polar, apresenta diversas propriedades, como por exemplo, a biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de ser derivado de fontes renováveis como milho, cana de açúcar, trigo, entre outras. O PLA tem potencial para diversas aplicações, e estudos recentes mostram o crescente interesse no desenvolvimento de filmes baseados em PLA para embalagens. Isto se deve não apenas por causa da necessidade de substituição de muitos polímeros à base de petróleo, mas também pelas propriedades térmicas e mecânicas comparáveis ou superiores a outros polímeros, tanto provenientes de fontes fósseis como a de outros poliésteres alifáticos biodegradáveis (Lima et al., 2019; Shanshan et al., 2015; Zhao et al., 2014; Dil, Carreau & Favis, 2015).

As embalagens plásticas muitas vezes são formuladas por aditivos químicos para obtenção de filmes transparentes, estáveis, impermeáveis a vapor de água e gás, entre outras propriedades de interesse. No entanto, esses agentes químicos podem migrar das embalagens e contaminar os alimentos que serão consumidos. Uma alternativa promissora é a substituição desses aditivos por componentes naturais como os óleos essenciais (OE), que além de contribuírem para estender o prazo de validade de produtos alimentícios, por reduzir, inibir ou retardar o crescimento de patógenos no alimento, garantindo assim, a segurança alimentar aos consumidores, podem atuar como possíveis agentes plastificantes entre outras (Atarés & Chiralt, 2016; Wang, Rhim & Hong, 2016).

De uma forma geral, os óleos essenciais apresentam diferentes propriedades biológicas, como atividade antioxidante, ação larvicida e ação antimicrobiana. Dessa forma, o uso de substâncias naturais como os óleos essenciais, que possuem forte propriedade bactericida contra patógenos alimentares, vem sendo amplamente explorado (Wannes et al., 2010; Aquino et al., 2010; Pires & Piccoli, 2012; Ferreira, Dantas & Catão, 2014; Yokomizo & Nakaoka-Sakita, 2014).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi elaborar filmes de Poli (ácido lático) (PLA) aditivados com óleos essenciais de cravo, laranja e canela, observando a influência dos óleos na matriz polimérica, para uma possível aplicação como embalagem ativa.

2. Metodologia

Trata-se de um estudo experimental realizado no Laboratório de Materiais Poliméricos e Caracterização (LMPC) e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Quanto aos materiais foi utilizados Poli (ácido lático) (PLA), Ingeo 3251D, fabricado pela Nature Works e fornecido pela Cargil S.A. Densidade relativa de 1,24; IF: 35 g.10 min⁻¹ (190°C/2,16Kg). Tg = 50-60°C e Tm = 155-170°C. Óleo essencial de Laranja doado pela Agroterenas e os óleos essenciais de cravo e canela obtidos da Phytoterápica. Clorofórmio P.A. da VETEC foi utilizado na preparação dos filmes de PLA por casting. Nenhum material sofreu procedimento adicional de purificação.

Preparação dos filmes por casting

Os filmes foram obtidos através do método de casting, que consiste na evaporação espontânea do solvente presente em uma solução polimérica, de acordo com o descrito por Petersson et al. (2007). Primeiramente, preparou-se uma solução de 7% de PLA em clorofórmio, de acordo com concentrações da Tabela 1, sob agitação constante e sem aquecimento por 50 min até a completa dissolução dos grânulos. Paralelamente, os óleos essenciais de laranja, cravo e canela foram solubilizados, separadamente, em clorofórmio, e posteriormente misturados à solução polimérica por 15 min para garantir homogeneidade das soluções finais. Por fim, essas soluções foram depositadas em placas de Petri (15 cm) de diâmetro e armazenadas em temperatura ambiente para evaporação do solvente por 48 horas. A espessura dos filmes ficou de $0,12 \pm 0,02$ mm.

Os filmes de PLA puro e PLA/OEs foram preparados utilizando as concentrações conforme descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos filmes elaborados utilizando PLA e óleos essenciais (OE).

Composição	PLA (%)	Óleo (%)
PLA puro	100	-
PLA/OE cravo	90	10
PLA/OE laranja	90	10
PLA/OE canela	90	10

Fonte: Autores (2021).

GC-MS dos óleos essenciais

Os constituintes químicos dos óleos essenciais de cravo, laranja e canela foram analisados em um cromatógrafo a gás modelo Thermo Scientific – TRACE 1330 acoplado a um detector de massas ISQ Single Quadrupole. Os compostos voláteis foram separados em uma coluna de sílica (30m x 250 µm) tendo por fase móvel o gás hélio com vazão constante de 1 mL.min⁻¹. A amostra foi diluída em clorofórmio (1mg.mL⁻¹) com volume de injeção manual de 1 µL do óleo. A programação das condições de temperatura iniciou-se a 40°C aumentando até 250 °C, permanecendo por 55 min quando estabilizada na temperatura de 250 °C; enquanto as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 230 e 250 °C, respectivamente.

Microscopia óptica (MO) dos filmes

Os filmes de PLA e PLA/OE, foram caracterizados por microscopia óptica (MO), as microfotografias foram obtidas em

microscópio óptico com luz polarizada, marca Leica modelo ICC 50, com captura de imagem digital em softwares Laica LAS EZ, e utilizando lente com aumento de 10x.

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros dos filmes de PLA e PLA/OE foram obtidas em espectrômetro de infravermelho da marca Bruker, modelo Tensor 27, equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR). Os espectros da superfície de cada filme foram coletados no modo transmitância, na região de 400 a 4000 cm^{-1} com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A influência da adição dos óleos essenciais nas transições térmicas e grau de cristalinidade do PLA foram avaliadas em equipamento modelo DSC 60 da marca SHIMADZU. Amostras com cerca de 5 a 10 mg foram aquecidas da temperatura de 25 °C até 230 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Em seguida, foi resfriada até 25 °C e reaquecida até 230 °C, utilizando a mesma taxa de variação de temperatura. Todas as análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹ e os dados obtidos a partir do 2º ciclo de aquecimento. O grau de cristalinidade (X_c) foi calculado pela seguinte Fórmula 1.

$$X_c = \frac{\Delta H_c}{\Delta H_m} \times 100 \% \quad (1)$$

Sendo ΔH_m o calor latente de fusão por unidade de massa do PLA 100% cristalino, utilizado 93 J.g⁻¹ (Piorkowska & Rutledge, 2013).

Análise termogravimétrica (TG)

Os filmes de PLA e PLA/OEs, foram avaliados pela análise termogravimétrica, utilizando o equipamento termobalança Perkin Elmer, modelo STA 6000. As amostras foram aquecidas a 10 °C.min⁻¹ da temperatura de 25 °C até 700 °C, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 20 mL.min⁻¹.

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo, laranja e canela foram avaliados através do método de difusão em disco. Foram utilizados 0,1ml de suspensão microbiana de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, provenientes do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pernambuco do departamento de Engenharia Química.

Esta suspensão foi espalhada em placa contendo meio ágar nutriente, na ordem de $1,5 \times 10^8$, obtida por comparação de turvação com escala de McFarland (Bier, 1994). Os discos de papel de filtro estéreis foram embebidos nos óleos essenciais supracitados e posicionados na superfície do meio de cultivo. O crescimento microbiano foi realizado a 35 °C por 48 h. Após esse período os halos de inibição do crescimento foram medidos com auxílio de paquímetro em quatro pontos equidistantes. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

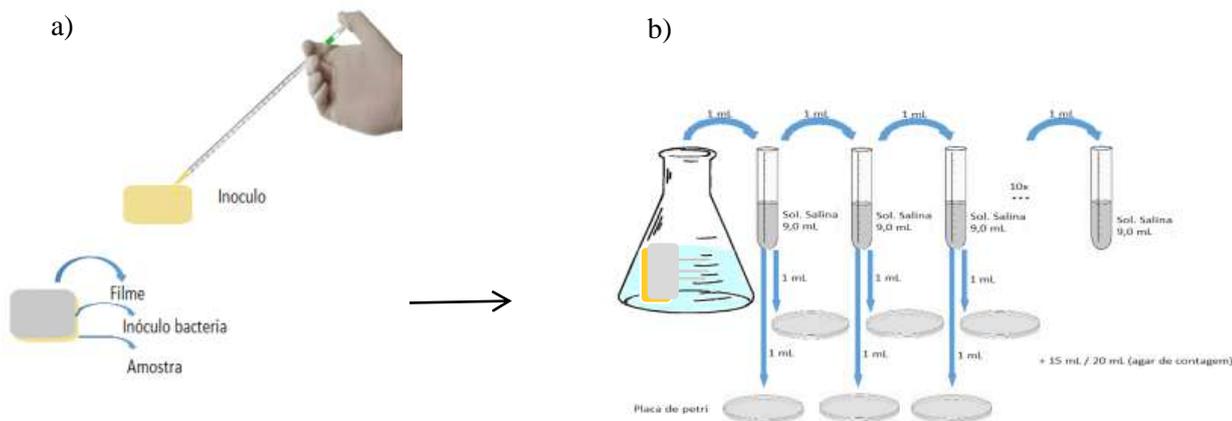
Análise antimicrobiana dos filmes PLA/OE

Os filmes PLA/OE foram analisados conforme a norma JIS Z 2801:2000 (2016) adaptada, que consiste na contagem das unidades formadoras de colônias que aparecem no corpo de prova onde foi cultivado o micro-organismo que apresentou melhor resultado no teste do halo de inibição. Estes corpos de prova, PLA e PLA/OE passaram por um processo de esterilização por radiação UV por 5 min. Os corpos de prova com dimensões 5 x 5 cm foram inoculados na superfície com 0,2 mL da suspensão

microbiana (*Escherichia coli*), sendo coberto com filme de polietileno (100% polietileno de baixa densidade) na mesma dimensão do filme testado. Cada filme foi analisado em triplicata em placa de Petri e incubado por 24 h (Figura 1).

Posteriormente, cada filme foi introduzido em Erlenmeyer contendo 30 mL de caldo nutriente a fim de arrastar os micro-organismos da superfície do filme. Desta suspensão microbiana foi realizada diluições sucessivas em solução salina. De cada diluição foi retirada 1,0 mL da suspensão e acondicionada em placa com posterior adição de 15 mL de ágar nutriente pelo método *pour plate*, e incubada por 40-48 h. Transcorrido o período de incubação, foram realizadas a contagem de colônias das bactérias viáveis.

Figura 1. Esquema da atividade antimicrobiana dos filmes de PLA/OE a) Inoculação da suspensão bacteriana em contato com o filme e b) quantificação do crescimento bacteriano por diluição e *pour plate*.



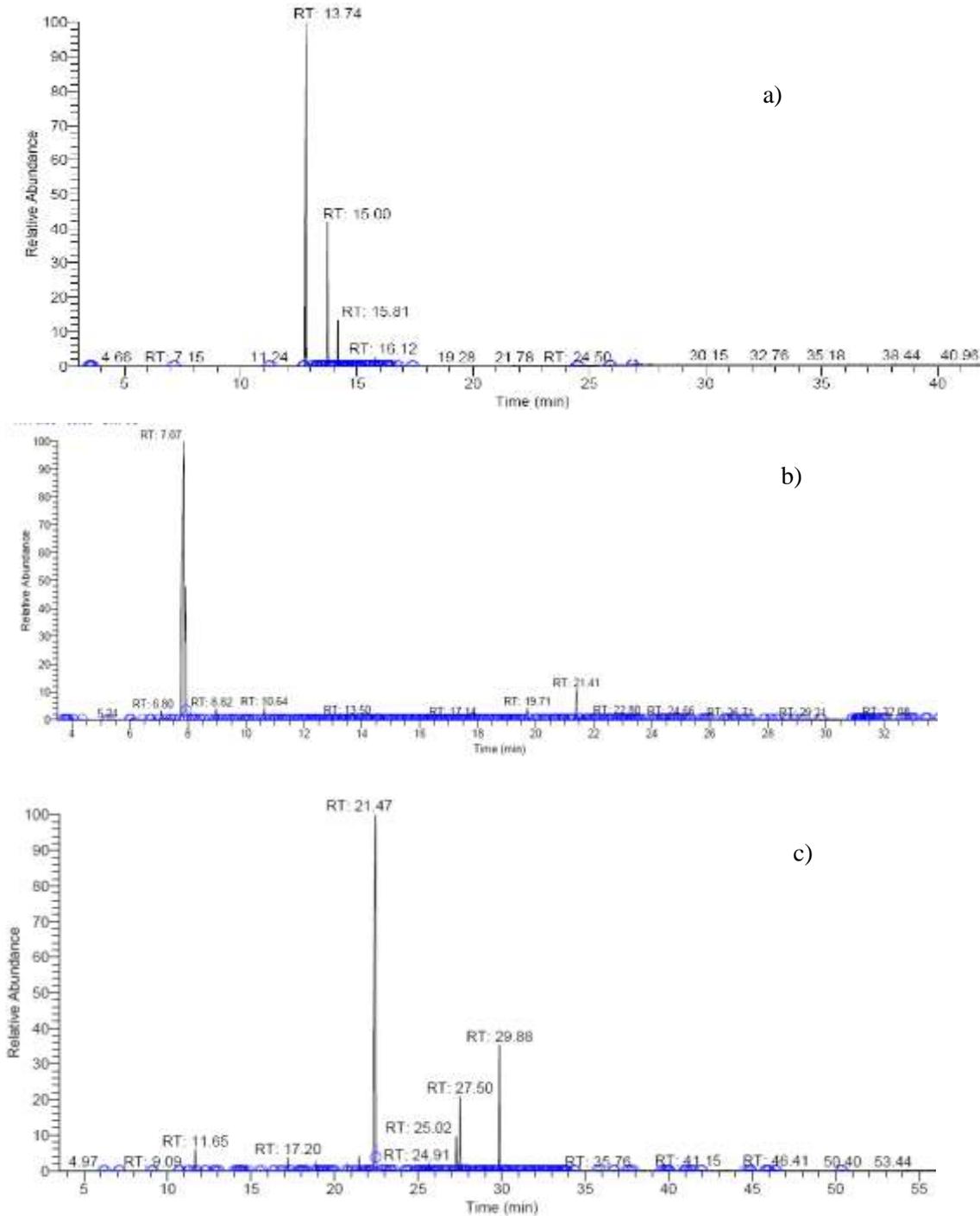
Fonte: Autores (2021).

3. Resultados e Discussão

3.1 GC-MS

Nos cromatogramas expostos na Figura 2 pode-se observar os principais constituintes presentes nos óleos essenciais. Para o óleo de Cravo (Figura 2a) foi encontrado o eugenol como constituinte predominante e em concentração em torno de 73 % além destes, foram verificados o acetato de eugenila (17,92%) e cariofeleno (4,89%). O eugenol componente majoritário desse óleo também foi relatado por YuJie Fu *et al.* (2007); Narayanan *et al.*, (2013); Sebaaly *et al.*, (2015). Já os principais constituintes do óleo essencial de laranja (Figura 2b) identificados e quantificados foram o p-Mentha-1(7),3-dieno (1,98%), D-Limoneno (79,97 %), Linalol (1,11%), Decanal (0,93%), ácido n-Hexadecanóico (1,84%) e ácido cis-13-Octadecenóico (3,95%), estes compostos são classificados como terpenos, álcool, aldeído e ácidos carboxílicos. Como constatado D-Limoneno é o principal constituinte do óleo essencial de laranja estando de acordo com encontrado por Nazan Celikel e Gökhan Kavas (2008), Arrieta *et al.*, (2013); Andrade *et al.*, (2018). Os componentes majoritários encontrados no óleo de canela (Figura 2c) foram cinamaldeído (67,05%), trans-cinamaldeído (13,01%) e Cinamil ester (6,12%). O cinamaldeído também é relatado por Qin, Yang e Xue (2015); Chen *et al.*, (2016) como sendo o componente majoritário da canela. Todos os óleos essenciais citados anteriormente são investigados em estudos diversos por apresentarem componentes principais antibacterianos naturais (Sebaaly *et al.*, 2015; Qin, Yang & Xue, 2015; Arrieta *et al.*, 2014).

Figura 2. Cromatogramas obtidos por GC-MS para os OE de Cravo (a), Laranja (b) e Canela (c).



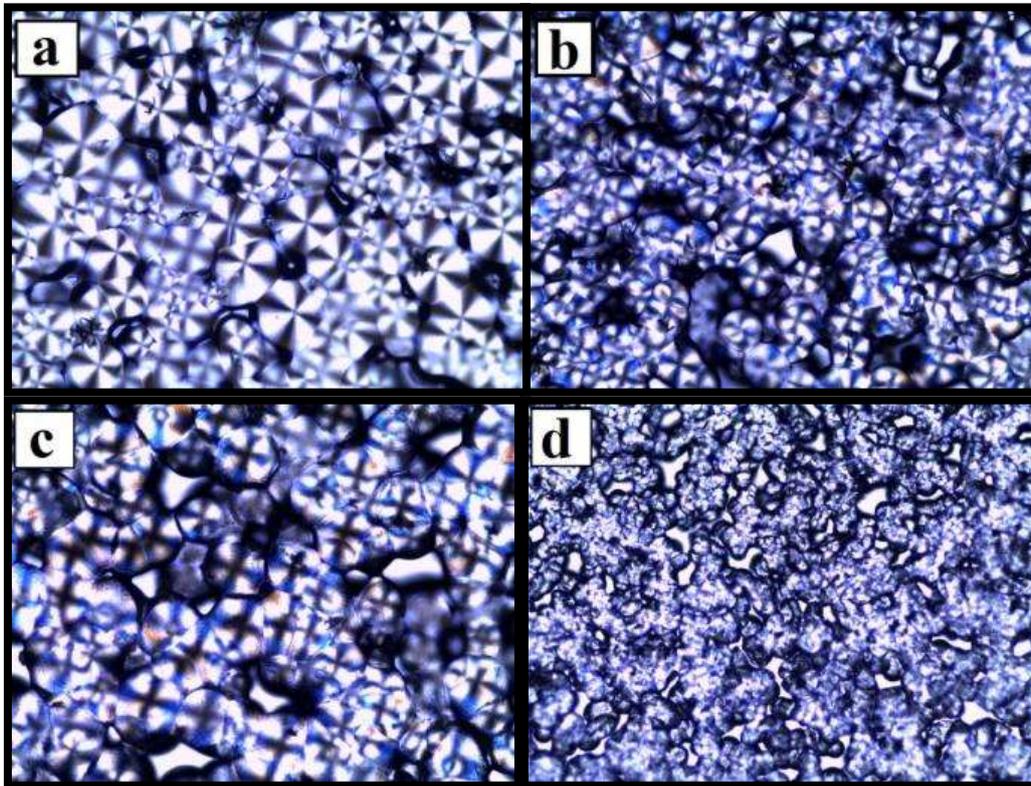
Fonte: Autores (2021).

3.2 Microscopias Óptica (MO) dos filmes

As morfologias dos filmes de PLA puro e com óleos essenciais estão apresentadas na Figura 3. Para comparar, foram obtidas as imagens por microscopia óptica (MO) observando as morfologias cristalinas do PLA e PLA com os óleos essenciais. A Figura 3a, filme de PLA puro, apresenta estruturas esferulitas em forma de cruz (Cruz de Malta) típica do PLA semicristalino (Chen & Wu, 2014; Auras et al., 2010). Com a adição dos OE de cravo e laranja ocorreu à diminuição dos esferulitos como observados nas Figura 3b e 3c. Já o PLA/OE canela, Figura 3d, a adição do OE de canela alterou completamente a morfologia do PLA, indicando

que esse óleo agiu mais fortemente com a cadeia polimérica.

Figura 3. Microscopia óptica com aumento de 10x dos filmes de (a) PLA puro; (b) PLA/OE cravo; (c) PLA/OE laranja e (d) PLA/OE canela.



Fonte: Autores (2021).

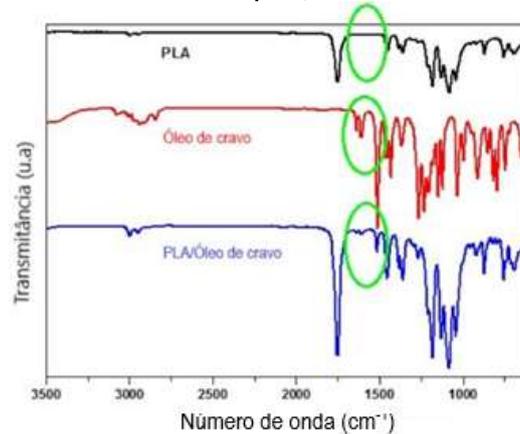
3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com o intuito de se obter informações sobre possíveis interações químicas entre os grupos do PLA e dos óleos essenciais na matriz do polímero, foi empregada à espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para o PLA puro, os óleos essenciais de cravo, laranja e canela e os seus respectivos filmes de PLA/OE.

Na Figura 4 têm-se os espectros de FTIR do PLA puro, do OE cravo e PLA/OE cravo. A partir do espectro do PLA puro, observa-se bandas em: 871 cm^{-1} referente aos grupos C-C; 1079 , 1182 e 1267 cm^{-1} atribuídas ao estiramento da ligação C-O do C-O-C; 1360 cm^{-1} , 1382 cm^{-1} , 1453 cm^{-1} , atribuídas a flexão e deformação da ligação C-H; 1750 cm^{-1} atribuída ao estiramento da carbonila (C=O) do grupo éster do PLA, a 2950 e 2998 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H do grupo CH_3 . A identificação destas bandas também foi encontrada por outros autores na literatura (Auras et al., 2010; Djellali et al., 2013).

No espectro do óleo de cravo observa-se uma banda predominante em 1510 cm^{-1} que corresponde ao elemento eugenol presente em maior quantidade, o que foi corroborado com a análise de cromatografia. Já no espectro de PLA/OE de cravo observam-se as principais bandas de absorção do PLA e também a banda de 1510 cm^{-1} no filme (Janorkar, Metters & Hirt, 2004; Saral & Hirt, 2009). Logo, a presença da banda (1500 cm^{-1}) no espectro de FTIR da Figura 4, caracteriza a presença do eugenol no filme, o que comprova a incorporação do óleo de cravo no filme com o PLA.

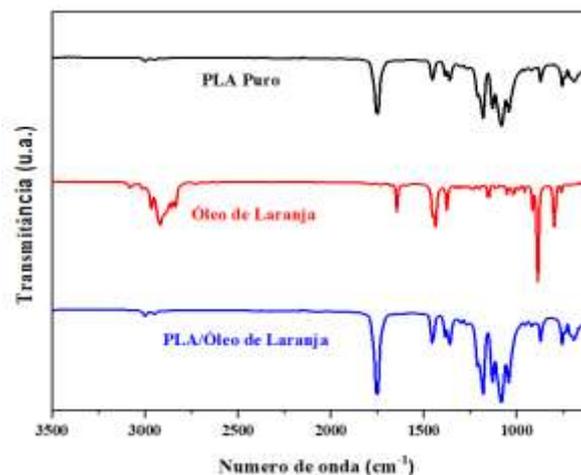
Figura 4. Espectros de FTIR do PLA puro, Óleo de cravo e PLA/óleo de cravo.



Fonte: Autores (2021).

Na Figura 5, observa-se no espectro do óleo de laranja a presença de banda em 1644 cm⁻¹, que corresponde ao seu componente majoritário, o D-Limoneno que é biodegradável e atóxico, além dessas, observa-se as bandas em 3074 e 3011 cm⁻¹ que corresponde as vibrações de estiramento da = CH, 2964 e 2921 cm⁻¹ vibrações de estiramento da CH, 1643 e 1676 cm⁻¹ relacionada com o estiramento das vibrações C=C resultante do anel e do grupo vinílico, respectivamente (Andrade et al.,2018). Já na mistura de PLA/OE Laranja pode-se identificar os grupos funcionais do PLA e uma intensificação na banda em 1750 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da carbonila (C=O) do grupo éster do PLA e não foi possível identificar bandas características do óleo essencial na mistura devido a sobreposição das bandas do PLA com as do OE de laranja.

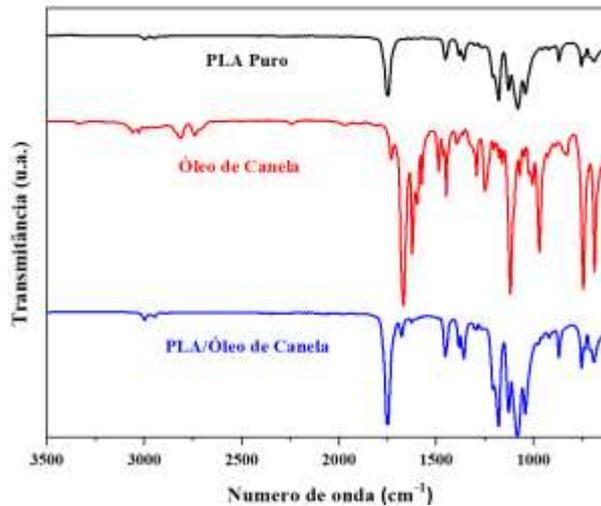
Figura 5. Espectros de FTIR do PLA puro, Óleo de Laranja e PLA/óleo de Laranja.



Fonte: Autores (2021).

Na Figura 6 pode-se observar o espectro de FTIR do óleo essencial de canela, cujo cinamaldeído se faz como componente majoritário e identificado pelos picos característicos dos seguintes grupos: o grupo carbonila e C=C do anel aromático que absorvem tipicamente em 1715 cm⁻¹ e 1573 cm⁻¹ respectivamente; CH₂ provenientes do anel aromático com absorção em 1294 cm⁻¹, juntamente com a presença de duas bandas de absorção na região de 2680 cm⁻¹ a 2820 cm⁻¹ como resultado do estiramento da ligação C-H e duas bandas de absorção fortes resultantes de deformação angular C-H fora do plano do anel aromático observadas na região de baixa frequência, em torno de 700 cm⁻¹ (Hilbig et al., 2016; Wen et al.,2016).

Figura 6. Espectros de FTIR do PLA puro, Óleo de Canela e PLA/óleo de Canela.

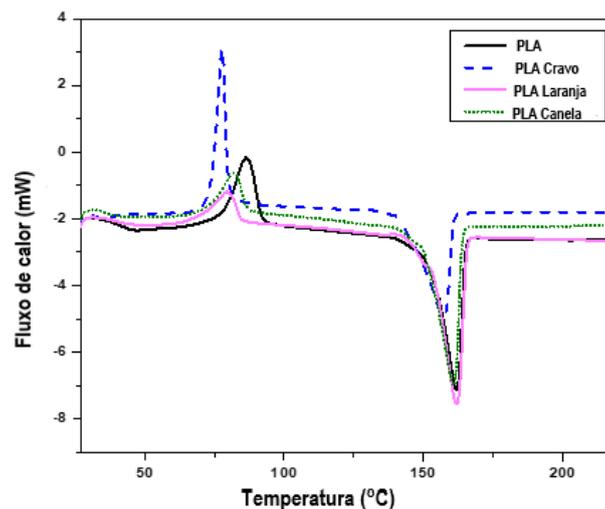


Fonte: Autores (2021).

3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na Figura 7 está apresentado os termogramas de DSC do PLA puro e das misturas PLA/OE, seus respectivos valores estão descritos na Tabela 2. Para o PLA observa-se que a temperatura de transição vítrea (T_g) deste polímero está em torno de 46 °C, a qual é atribuída à entalpia de relaxação ($\Delta H_{rel.}$) e um evento exotérmico com máximo em cerca de 86 °C, atribuído a cristalização a frio (T_{cc}) do PLA. Também é observado para o PLA puro um evento endotérmico caracterizado por um pico com máximo em 160,69 °C, referente à temperatura de fusão cristalina (T_m) de diferentes estruturas cristalinas do PLA, fases β e α , respectivamente (Lima et al., 2019; ShanShan et al., 2015; Jiang, Zhang & Wu, 2012; Pereira & Morales, 2014).

Figura 7. Curvas de DSC de PLA puro; PLA/OE cravo; PLA/laranja e PLA/canela.



Fonte: Autores (2021).

Com os dados dispostos na Tabela 2, pode-se observar que com a adição dos óleos essenciais houve uma diminuição da temperatura de transição vítrea (T_g) para todos os filmes aditivados com óleos essenciais. Esse comportamento pode ser atribuído a um aumento da mobilidade de cadeia (flexibilidade) do polímero e como consequência diminuição de T_g . Também foi observada uma diminuição da (T_{cc}) com a adição dos OE. Com relação a T_m , apenas com a adição do óleo essencial de cravo houve uma

pequena diminuição de seu valor. Por fim, constatou-se que o óleo de cravo favoreceu o aumento da cristalização do PLA e em contrapartida os demais óleos utilizados, canela e laranja, diminuíram a cristalização.

Tabela 2. Propriedades térmicas dos filmes de PLA puro; PLA/ EO cravo; PLA/OE laranja e PLA/OE canela.

AMOSTRAS	Tg (°C)	Tcc (°C)	Xc (%)	Tm (°C)
PLA	46	86,42	24,95	160,69
PLA/OE CRAVO	34	77,69	30,62	155,95
PLA/OE LARANJA	40	79,48	14,18	161,00
PLA/OE CANELA	39	81,97	17,16	160,02

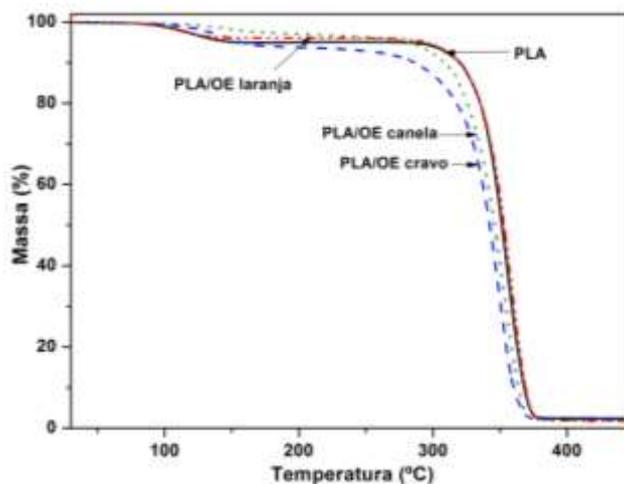
Fonte: Autores (2021).

Correlacionando os resultados encontrados na Microscopia ótica com a diminuição do grau de cristalinidade obtidos por DCS, nota-se que o grau de cristalinidade diminuiu para os filmes aditivados com Laranja e Canela. Por MO, é verificado uma redução no tamanho dos esferulito, principalmente para o filme com óleo de canela. Isso indica, uma maior interação entre o óleo e a cadeia polimérica, tornando o filme mais amorfo e reduzindo os tamanhos dos esferulitos.

3.5 Análises Termogravimétricas (TG)

Pode-se observar na Figura 8 a degradação dos filmes de PLA, PLA/OE cravo, PLA/OE laranja e PLA/OE canela. Os filmes contendo os óleos essenciais apresentaram comportamento similar ao filme de PLA puro. Percebe-se uma ligeira degradação da massa na faixa de 100 a 150 °C, evidenciada pela perda de massa dos óleos essenciais (Liu et al., 2016; Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015), com exceção no filme de PLA/OE canela, que mostrou um comportamento diferente nessa faixa de temperatura, praticamente não ocorrendo esse evento. A segunda degradação térmica ocorreu para o PLA puro e PLA/OE laranja em torno de 311 °C, dentro da faixa de degradação do PLA encontrado na literatura (Qin & Xue, 2015; Arrieta et al., 2014). Já para PLA/OE cravo e PLA/OE canela essa degradação térmica ocorreu aproximadamente em 293 e 301 °C respectivamente, correspondendo principalmente, à degradação térmica do polímero PLA. No entanto, os termogramas TG indicaram que para todos os filmes, a adição dos óleos essenciais, praticamente, não afetou o perfil de degradação térmica, somente ocorrendo uma pequena diminuição nesse perfil para os filmes PLA/OE cravo (3%) e PLA/OE canela (6%), mas ficando dentro da faixa de degradação do PLA. Podemos inferir também que todos os filmes estão estáveis termicamente entre 180 a 230 °C aproximadamente, como verificado na Figura 8, corroborando com Qin, Yang e Xue, 2015 e Yahyaoui *et al.*, (2016).

Figura 8. Curvas de TGA dos filmes de PLA puro; PLA/OE cravo; PLA/ OE laranja e PLA/ OE canela.



Fonte: Autores (2021).

3.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

A ação antimicrobiana dos óleos estudados foi demonstrada através da susceptibilidade de bactérias Gram positivas e Gram negativas, conforme evidenciado na Tabela 3. Pode ser observado um halo significativo no teste com o óleo de cravo para a *Escherichia coli* (23,3 mm), o que vem corroborar com estudos realizados por Mau, *et al.*, (2001) onde os extratos de cravo-da-índia reduziram o número de *Escherichia coli* e outras bactérias durante a armazenagem de sucos, leites e chás.

Dentre os três óleos estudados, o óleo de laranja, não apresentou inibição diante do *Staphylococcus aureus*. De uma forma geral, os óleos de canela e de cravo foram os óleos que apresentaram os maiores potenciais inibidores sobre as três linhagens bacterianas utilizadas, conforme é possível verificar na Tabela 3. Segundo Prabuseenivasan *et al.*, (2006), estes óleos são capazes de inibir o crescimento tanto de bactérias Gram positivas como Gram negativas.

Tabela 3. Perfil bacteriostático dos óleos analisados através do halo de inibição em mL.

Amostras Analisadas	Halo de Inibição (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positiva)	<i>Escherichia coli</i> (Gram negativa)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (Gram negativa)
Óleo de Cravo	21,4	43,3	18,5
Óleo de Laranja	0	12,1	17,9
Óleo de Canela	18,5	24,2	36,6

Fonte: Autores (2021).

De acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (2015), os diâmetros dos halos encontrados no teste de disco-difusão podem ser classificados, quanto à sua atividade, como sendo resistentes, para diâmetro igual ou menor à 14 mm, intermediários, quando o diâmetro encontra-se entre 15 e 19 mm, e sensíveis, quando os diâmetros são maiores do que 20 mm.

Logo, pode-se considerar que as bactérias *S. aureus* e *E. coli* são sensíveis e a *E. aerogenes* intermediária em relação ao óleo de cravo. Para o óleo de laranja a *E. coli* é considerada resistente, enquanto a *E. aerogenes* é intermediária. Por fim, a *S. aureus* apresentou comportamento intermediário enquanto a *E. coli* e *E. aerogenes* mostrou-se resistente quanto ao óleo de canela.

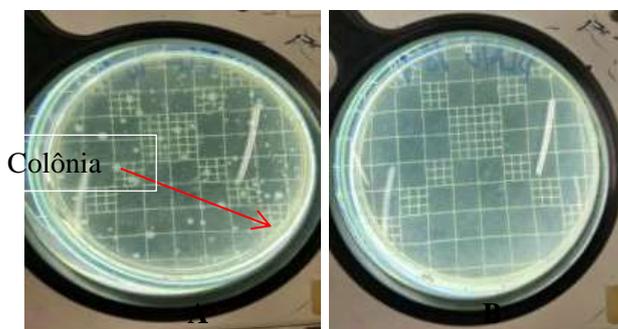
Pode-se notar que óleo de laranja apresentou os menores halos de inibição para todos os micro-organismos. Esse resultado é consequência da baixa concentração do componente ativo principal, limoneno, que age, reduzindo a capacidade de crescimento dos micro-organismos. O limoneno, é o componente principal em grande variedade de frutas cítricas, caracterizado por ser um monoterpene cíclico de elevada atividade antimicrobiana (Andrade et al., 2018).

3.7 Determinação da atividade antimicrobiana nos filmes elaborados

A atividade antimicrobiana do filme foi realizada para a amostra que apresentou os melhores resultados em relação as caracterizações realizadas e atividade antimicrobiana. Sendo assim, o PLA/OE cravo frente a *Escherichia coli* foi testado.

Logo, como resultado de contagem padrão em placa, o filme de PLA puro apresentou crescimento bacteriano em forma de colônias, um total de 21×10^5 UFC. Já o filme de PLA/OE cravo não houve nenhum crescimento bacteriano, mostrando que o OE de cravo no filme funcionou como aditivo bactericida como pode ser visto na Figura 9. Isto ocorreu provavelmente, pois o óleo essencial do cravo-da-índia é constituído principalmente por eugenol, substância que, além de efeito anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico, é eficaz no combate e diminuição de bactérias (Silvestri et al., 2010). O mecanismo primário de ação do eugenol, como bactericida, é a promoção da ruptura da membrana citoplasmática, aumentando a sua permeabilidade não específica. Esta hiperpermeabilidade promove o extravasamento de íons e a perda excessiva de outros componentes celulares, incluindo as proteínas intracelulares, resultando, finalmente, em morte celular (Devi et al., 2010).

Figura 9. Imagem das placas com crescimento de colônias de *E. coli* PLA/puro (A); Placa de sem crescimento bacteriano PLA/colônias cravo-da-índia (B).



Fonte: Autores (2021).

4. Conclusão

A composição de cada óleo essencial utilizado nesse trabalho apresentou um componente majoritário e foram essas substâncias que participaram diretamente nas alterações das propriedades químicas e físicas do PLA. Foi observado que a maioria das bandas vibracionais características dos OE foram encontradas nos filmes de PLA/OE. A depender do tipo de óleo na composição dos filmes de PLA, a morfologia das regiões das estruturas esferulitas foi modificada. Houve uma diminuição da temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de cristalização a frio (T_{cc}) do PLA com a adição dos óleos. Apenas a mistura de PLA/OE cravo influenciou na temperatura de fusão cristalina (T_m) do PLA. O filme PLA/OE cravo apresentou uma ótima atividade antimicrobiana, inibindo totalmente o crescimento da bactéria *E. coli* que estava em contato direto com o filme. Assim, o óleo essencial de cravo torna um promissor aditivo do PLA para aplicações em indústrias de embalagens.

Sugere-se como pesquisas futuras testes com o biofilme PLA/OE em produtos alimentícios observando entre outros fatores a interferência sensorial do óleo nas matrizes poliméricas, o desenvolvimento destes estudos poderá subsidiar a inserção deste filme em indústrias de embalagens.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Materiais Poliméricos e Caracterização (LMPC) e ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Referências

- Andrade, M. F., *et al.* (2018). Active Packaging Using Orange Oil Incorporated into PBAT Biodegradable Films. *Materials Science Forum*, Vol. 930, p 283-289.
- Aquino, L. C. L., *et al.* (2010). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas. *Revista Alimentação e Nutrição*, 21(4), 529-535.
- Arrieta, M. P., *et al.* (2013). Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. *Polymer Testing*, 32(4), 760-768.
- Arrieta, M. P., *et al.* (2014). Ternary PLA-PHB-Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. *European Polymer Journal*, 50(1), 255-270.
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. Review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 51-62.
- Auras, R. A., *et al.* (2010) Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications. *John Wiley & Sons*, ISBN 978-0-470-29366-9.
- Bier, O. (1994). *Microbiologia e imunologia*. (30a ed.) Melhoramentos. p. 12341.
- Celikel, N., & Kavas, G. (2008). Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms. *Czech J. Food Sci.*, 26(3), 174-181.
- Chen, Y., & Wu, T. (2014). Crystallization Kinetics of Poly (1,4-butylene adipate) with Stereocomplexed Poly (lactic acid) Serving as a Nucleation Agent. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53, 16689-16695.
- Chen, H., *et al.* (2016). Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 61, 662-671.
- Devi, K. P., *et al.* (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 107-115.
- Dil, E. J., Carreau, P. J., & Favis, B. D. (2015). Morphology, miscibility and continuity development in poly (lactic acid)/ poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends. *Polymer*, 68, 202-212.
- Djellali, S., *et al.* (2013). Structural, morphological and mechanical characteristics of polyethylene, poly (lactic acid) and poly(ethylene-co-glycidyl methacrylate) blends. *Iranian Polymer Journal*, 22(4), 245-257.
- Ferreira, S. B., Dantas, I. C., & Catão, R. M. R. (2014). Evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil of sucupira (*Pterodon emarginatus*). *Rev. bras. plantas med*, 16(2), 225-230.
- Fu, Y., *et al.* (2007). Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination. *Phytotherapy Research*, 21, 989-994.
- Hilbig, J., *et al.* (2016). Physical and antimicrobial properties of cinnamon bark oil co-nanoemulsified by lauric arginate and Tween 80. *International Journal of Food Microbiology*, 233, 52 - 59.
- Janorkar, A. V., Metters, A. T., & Hirt, D. E. (2004). Modification of poly (lactic acid) films: enhanced wettability from surface-confined photografting and increased degradation rate due to an artifact of the photografting process. *Macromolecules*, 37(24), 9151-9159.
- Japanese Industrial Standard. JIS Z 2801: 2000 (2000). Antimicrobial products-Test for antimicrobial activity and efficacy. <https://microchemlab.com/test/jis-z-2801-test-antimicrobial-activity-plastics>
- Jiang, J., Zhang, K., & Wu, G. (2012). Rubber-toughened PLA blends with low thermal expansion. *Journal of Applied Polymer Science*, 128(6), 3993-4000.
- Lima, J. C. C., *et al.* (2019) PLA/SEBS Bioblends: Influence of SEBS Content and of Thermal Treatment on the Impact Strength and Morphology. *Macromolecular Symposia*, 383, 1-6.
- Liu, D., *et al.* (2016). Characterization of Active Packaging Films Made from Poly (Lactic Acid)/ Poly (Trimethylene Carbonate). *Molecules*, 21(695), 1-14.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., *et al.* (2015). Characterization and evaluation of PLA films containing an extract of *Allium* spp. to be used in the packaging of ready-to-eat salads under controlled atmospheres. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1354-1361.
- Mau, J., Chen, C., & Hsieh, P. (2001). Antimicrobial effects of extracts from Chinese chive, cinnamon and corn fructus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 183-188.
- Narayanan, A., *et al.* (2013). Synergized antimicrobial activity of eugenol incorporated polyhydroxybutyrate films against food spoilage microorganisms in conjunction with pediocin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(6), 1379-1388.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI). (2015). M02-A12 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests." *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

- Pereira, R. B., & Morales, A. R. (2014). Estudo do Comportamento Térmico e Mecânico do PLA Modificado com Aditivo Nucleante e Modificador de Impacto. *Polímeros*, 24, 198–202.
- Petersson, L., I., Kvien, K., & Oksman. (2007). Structure and Thermal Properties of Poly(lactic Acid)/cellulose Whiskers Nanocomposite Materials. *Composites Science and Technology*, 67, 2535–44.
- Piorkowska, E., & Rutledge, G. C. (2013). Handbook of Polymer Crystallization.
- Pires, T. C., & Piccoli, R.H. (2012). Inhibitory effect of essential oils from the genus Citrus on the microorganism's growth. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 71(2), 378-385.
- Prabuseenivasan, *et al.* (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med.* 6(39), 1-8.
- Qin, Y., Yang, J., & Xue, J. (2015). Characterization of antimicrobial poly(lactic acid)/poly(trimethylene carbonate) films with cinnamaldehyde. *Journal of Materials Science*, 50(3), 1150–1158.
- Rasal, R. M., & Hirt, D. E. (2009). Micropatterning of covalently attached biotin on poly (lactic acid) film surfaces. *Macromolecular bioscience*, 9(10), 989-996.
- Sebaaly, C., *et al.* (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chemistry*, 178, 52–62.
- Shanshan, L., *et al.* (2015). Effect of annealing on the thermal properties of poly (lactic acid)/ starch blends. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 297–303.
- Silvestri, J. D. F., *et al.* (2010). Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Revista Ceres*, 57(5), 589-594.
- Wang, L-F., Rhim, J-W., & Hong, S-I. (2016). Preparation of poly (lactide)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blend films using a solvent casting method and their food packaging application. *Food Science and Technology*, 68, 454-461.
- Wannes, W. A., *et al.* (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1362-1370.
- Wen, P., *et al.* (2016). Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/b-cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. *Food Chemistry*, 196, 996-1004.
- Yahyaoui, M., *et al.* (2016). Development of novel antimicrobial films based on poly (lactic acid) and essential oils. *Reactive and Functional Polymers*, 109, 1–8.
- Yokomizo, N. K. S., & Nakaoka-Sakita, M. (2014). Antimicrobial activity and essential oils yield of *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. *Rev. bras. plantas med*, 16(3), 513-520.
- Zhao, Y. Q., *et al.* (2014). Morphology, mechanical, and rheological properties of poly (lactic acid)/ethylene acrylic acid copolymer blends processing via vane extruder. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(8), 1-8.