

INSTITUTO FEDERAL
GOIANO
Câmpus Rio Verde

ENGENHARIA AMBIENTAL

FILMES DE QUITOSANA COM ÓLEO ESSENCIAL de *Citrus limonia*: PROPRIEDADES FÍSICAS, MORFOLÓGICAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

ISABELLA PELOSI BORGES DE DEUS

**Rio Verde, GO
2020**

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO
VERDE**

ENGENHARIA AMBIENTAL

**FILMES DE QUITOSANA COM ÓLEO ESSENCIAL de *Citrus limonia*:
PROPRIEDADES FÍSICAS, MORFOLÓGICAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

ISABELLA PELOSI BORGES DE DEUS

Trabalho de Curso apresentado ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Cássia Cristina Fernandes Alves

Coorientador: Dr. Josemar Gonçalves de Oliveira Filho

Rio Verde – GO

Dezembro, 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

DD486f Deus, Isabella Pelosi Borges de
FILMES DE QUITOSANA COM ÓLEO ESSENCIAL de Citrus
limonia: PROPRIEDADES FÍSICAS, MORFOLÓGICAS E
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA / Isabella Pelosi Borges de
Deus; orientadora Cassia Cristina Fernandes Alves;
co-orientador Josemar Gonçalves de Oliveira Filho. --
Rio Verde, 2020.
31 p.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2020.

1. embalagens ativas. 2. limão. 3. plástico. I.
Alves, Cassia Cristina Fernandes, orient. II. Filho,
Josemar Gonçalves de Oliveira, co-orient. III. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Isabella Pelosi Borges de Deus

Matrícula: 2015102200740369

Título do Trabalho: FILMES DE QUITOSANA COM ÓLEO ESSENCIAL de Citrus limonia: PROPRIEDADES FÍSICAS, MORFOLÓGICAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 20/12/2020

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 20/12/2020.

Local Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 42/2020 - GGRAD-RV/DE-RV/CMPRV/IFGOIANO

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

No dia 04 de dezembro de 2020, às 10:00 horas, reuniu-se a banca examinadora composta pelos docentes: Cassia Cristina Fernandes Alves (orientadora), Anna Carolina Fernandes Valadares (membro), Marconi Batista Teixeira (membro) e Josemar Gonçalves de Oliveira Filho (membro) para examinar o Trabalho de Curso intitulado "Filme de Quitosana com Óleo Essencial de Citrus limonia: Propriedades físicas e morfológicas e antibacteriana" da estudante Isabella Pelosi Borges de Deus, Matrícula nº 2015102200740369 do Curso de Engenharia Ambiental do IF Goiano – Campus Rio Verde. A palavra foi concedida a estudante para a apresentação oral do TC, houve arguição da candidata pelos membros da banca examinadora. Após tal etapa, a banca examinadora decidiu pela APROVAÇÃO da estudante. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Rio Verde, 04 de dezembro de 2020.

(Assinado Eletronicamente)

Cassia Cristina Fernandes Alves

Orientadora

(Assinado Eletronicamente)

Anna Carolina Fernandes Valadares

Membro

(Assinado Eletronicamente)

Marconi Batista Teixeira

Membro

(Assinado Eletronicamente)

Josemar Gonçalves de Oliveira Filho

Membro

DEDICATÓRIA

Dedicado às pessoas que me incentivaram a amar ciência, Zeca, Anna, Cássia e tia Paula

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida.

Aos meus avós, faço tudo por vocês.

Ao meu amado namorado pelo companheirismo e amor, eu te amo.

Aos meus pais pelo fomento e por abrir as portas do mundo, o céu não é o limite.

Ao meu irmão amado Pedro.

Aos meus tios e tias pelo carinho e acolhimento.

Às irmãs que escolhi para minha vida, Fabiana, Leodina, Luana, Gláucia e Larissa, vamos nos ver velhinhas! Amo vocês!

Aos meus amigos Talles e Diego, obrigada por dividirem comigo essa trajetória. Estou na torcida por vocês!

Às minhas paixões Vinícius e Nathan, amo vocês.

Ao meu anjo da guarda na Terra, Sabrina.

Às pessoas que compartilhei um lar, Ítala, Tálita, Eduardo, Dani e Jhéssika, dividimos mais que uma casa, carinho imensurável por vocês.

À minha sogra, sogro e cunhadas, obrigada por me adotarem na família e por todo suporte e carinho.

Aos queridos professores, Cássia, Marconi, Welliton, Hipólito, Davi, Renata, e todos que compartilharam com amor aulas memoráveis e tão importantes para minha formação.

À família Sustentar Jr., não seria o que sou hoje sem vocês. Amo cada um que compartilhou essa experiência inesquecível comigo.

Ao melhor gestor e líder que conheço, Rafael obrigada pela oportunidade de trabalhar e por confiar e acreditar na minha história, serei eternamente grata por isso.

Ao Zeca e a Anna. Vocês dois são um presente de Deus.. Eternamente grata pelo conhecimento, amadurecimento e motivação que me passaram. Amo muito vocês!

Por fim agradeço a mulher que me tornei. A experiência do ensino superior me distanciou da família e permitiu que eu vivesse momentos baixos e altos. Com tantas histórias, quedas, conquistas, sufocos, vibrações, estudo e trabalho posso dizer que estou pronta para os próximos passos. Sou um furacão feminino com amor e respeito pela história que carrego.

RESUMO

DEUS, Isabella Pelosi Borges. **Filmes de Quitosana com Óleo Essencial de *Citrus limonia*: Propriedades Físicas, Morfológicas e Atividade Antibacteriana**. 2020. 31p Monografia (Curso de Bacharelado de Engenharia Ambiental). Instituto Federa Goiano – Campus Rio verde, 50, 2020.

O desenvolvimento de embalagens ativas para preservação de alimentos está atraindo cada vez mais atenção devido aos sérios problemas ambientais causados por materiais sintéticos e convencionais. No presente estudo, as propriedades físicas, químicas, ópticas, microestruturais e antibacterianas de filmes de quitosana com óleo essencial de *Citrus limonia* (OEC) foram investigadas. A incorporação >0,75% do OEC aumentou a espessura dos filmes. A incorporação >0,25% do OEC reduziu o teor de umidade e a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de quitosana. A biodegradabilidade dos filmes de quitosana ao longo de dez dias variou entre 55,46-62,65% e não foi afetada pela adição do OEC. Todos os filmes apresentaram boa propriedade de barreira à luz UV, e a incorporação do OEC causou uma diminuição na taxa de transmissão de luz visível. A adição do OEC alterou significamente a cor dos filmes bioativos, ficando mais escuros e amarelados. Os filmes bioativos apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, mas não contra *Escherichia coli*. Os filmes apresentaram uma microestrutura heterogênea com gotículas de óleo retidas na malha polissacarídica contínua. Os resultados mostraram que filmes de quitosana com OEC são promissores como um material de embalagem ativa para preservação de alimentos.

Palavras-chave: embalagens ativas, limão, plástico.

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

Δa	Ganho de Peso de água
Δt	Tempo Definido
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
μL	Microlitros
A	rea
cm	Centímetro;
g	Gramas;
m	Metros
ml	Mililitro;
mm	Milímetro
OE	leo essencial
OEC	leo essencial de <i>Citrus limonia</i>
Pa	Pascoal
UR	Umidade Relativa
v	Volume;
PVA	Permeabilidade ao Vapor de gua
TTVA	Taxa de Transmissão ao Vapor de gua

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Embalagens plásticas	12
2.2	Filmes biodegradáveis	13
2.3	Quitosana	13
2.4	Óleos essenciais como antimicrobianos naturais	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Materiais	15
3.2	Extração do Óleo Essencial (OE)	15
3.3	Preparação dos Filmes	15
3.4	Caracterizações do Filme Bioativo	17
3.5	Atividade Antibacteriana dos Filmes Bioativos	18
3.6	Análises Estatísticas	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5	CONCLUSÕES	24
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1 INTRODUÇÃO

Polímeros de origem petroquímica são comumente usados em embalagens de alimento devido seu baixo custo e fácil manuseio. Entretanto, esses materiais causam problemas ambientais já que resíduos plásticos possuem excepcional longo tempo de degradação na natureza. Materiais bioplásticos – são definidos como plásticos biodegradáveis contendo ou não base biológica – surgem como alternativa para substituir plásticos convencionais, uma vez que minimizam os problemas ambientais associados ao uso de plásticos derivados das petroquímicas. Esses materiais podem fazer parte da solução no combate às mudanças climáticas (SAGNELLI et al., 2017; JIMÉNEZ-ROSADO et al., 2019). Como uma alternativa apropriada para polímeros de base petroquímica, biopolímeros naturais têm atraído cada vez mais atenção no desenvolvimento de embalagens de alimentos biodegradáveis e ativas (MAHCENE et al., 2020; de OLIVEIRA FILHO et al. 2019).

Filmes biodegradáveis são produzidos usando macromoléculas como polissacarídeos, proteínas, lipídios ou uma combinação desses componentes (SANI et al., 2019). Dentre essas macromoléculas, a quitosana é um polissacarídeo natural formado a partir de uma repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-desoxi-D-glicose (ou D-glucosamina), apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose (exceto por substituir os grupos hidroxila na posição 2 por grupos acetamino) (DI FILIPPO ET AL., 2020). Como um polissacarídeo, a quitosana foi caracterizada como um material de filme devido à sua boa formação física e propriedades antimicrobianas e antioxidantes (ABDELGHANY et al., 2019; ULLAH et al., 2019).

Embalagens biodegradáveis e ativas são um tipo de embalagens inovadoras que podem proteger e estender o prazo de vida dos alimentos por algumas delas conseguirem carrear atividades antioxidantes e antimicrobianas, além de outros ingredientes ativos (LUÍS et al., 2019)(MIR et al., 2018). Nesse sentido, a incorporação de óleos essenciais (OEs), para aprimorar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos filmes, tem sido explorada por ser natural, segura, alternativas biodegradáveis, e por apresentar maior atividade antimicrobiana e antioxidante (MAHCENE et al., 2020; YEDDES et al., 2020; AMALRAJ et al. 2020).

OEs são misturas complexas de substâncias orgânicas voláteis, consistindo de compostos oxigenados e hidrocarbonetos, como sesquiterpenos e monoterpenos, produzidos por plantas aromáticas como metabolitos secundários (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015; TARIQ et al., 2019). Esses compostos são responsáveis pela atividade antimicrobiana dos OEs, e eles possuem mecanismos associados à sua natureza lipofílica, que interage com as

membranas microbianas levando ao vazamento de compostos celulares e causando perdas de energia das células microbianas (BURT, 2004; NERIO, 2010).

A espécie *Citrus limonia* Osbeck, original da Índia, é conhecida como “limão china”, “limão rosa” ou “limão galego”. Esta espécie é cultivada em pomares e pode ser usada como fonte para obter OE com potencial bioativo (PIRES e PICOOLI, 2012)(ESTEVA M et al., 2016). PIRES e PICCOLI (2012) demonstraram que *C. Limonia* apresentou atividade antifúngica contra *Candida utilis* e atividade antibacteriana contra *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*. Posteriormente, ESTEVAM et al. (2016) relataram que *Citrus limonia* OEs apresentou atividade antibacteriana contra *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285).

Embora pareça ser um agente ativo atraente, não há relatos na literatura sobre a incorporação de OE de *C. limonia* como agente ativo em filmes biopoliméricos. Neste contexto, o objetivo foi desenvolver e caracterizar filmes biodegradáveis de quitosana incorporados com o óleo essencial extraído das folhas de *C. limonia*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Embalagens plásticas

Nos últimos anos a produção anual global de plásticos duplicou. Só em 2013 foram produzidos 299 milhões de toneladas do material em todo o mundo e foram usados para produtos de consumo, revestimentos e outras diversas aplicações. No Brasil, a produção de embalagens plásticas flexíveis em 2016 foi de 1,834 milhões de toneladas com tendência crescente de produção, já que em países em desenvolvimento os hábitos alimentares da população e a urbanização levam a uma dependência por alimentos processados (DILKESHOFFMAN et al., 2018).

Estima-se que em torno de 40% dos produtos plásticos têm utilidade inferior a um mês, grande parte tornam-se resíduos e tem potencial de causar sérios problemas ambientais (ACHILIAS et al, 2007). Apesar dos significativos avanços mundiais em manejo, tratamento e reciclagem, a maior parcela de resíduos plásticos ainda tem destinação final o lixão ou a queima, emitindo poluentes na atmosfera tais como: monóxido de carbono e dióxido de carbono (HAHLADAKIS et al, 2018).

Uma fração significativa dos plásticos derivados do petróleo torna-se lixo no ambiente e ecossistemas marinhos e terrestres, tal fato causa graves impactos ambientais (DEPLEDGE

et al, 2013; BROUWER et al, 2017). Mesmo que seja desconhecida a quantidade precisa de plásticos que entram nesses ambientes, há uma estimativa próxima de 4,8 a 12,7 milhões de toneladas por ano, baseada em dados mundiais sobre resíduos sólidos e densidade populacional, e a estimativa pode crescer até 2025 (cálculos envolvendo várias incertezas e suposições) (JAMBECK et al, 2015; GREGORY, 2009).

2.2. Filmes biodegradáveis e ativos

As contaminações associadas à embalagem de alimentos e as preocupações crescentes atuais relacionadas ao impacto ambiental negativo dos materiais de embalagem derivados do petróleo geraram um interesse significativo da indústria em materiais de fontes naturais e biodegradáveis (MEDINA-JARAMILLO et al., 2017).

Os filmes biodegradáveis são camadas finas de materiais biológicos, que uma vez formados podem ser colocados sobre ou entre os componentes de alimentos. Os materiais mais comuns para a formulação de filmes biodegradáveis são polissacarídeos, proteínas e lipídios, e a combinação destes permite produzir misturas com características melhoradas (FABRA et al., 2009).

A demanda atual dos consumidores por produtos alimentícios com maior vida de prateleira torna necessário o desenvolvimento de materiais de embalagem que também sejam funcionais, como embalagens com compostos ativos que podem melhorar a qualidade dos produtos, contribuindo ainda mais para o valor nutricional do alimento. Neste sentido, vários pesquisadores investigaram o uso de antioxidantes (SHOJAEE- ALIABADI et al., 2013; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010), ou agentes antimicrobianos em matrizes poliméricas (PIRES et al., 2008; SIVAROOBAN et al., 2008; SANTIAGO-SILVA et al., 2009), obtendo a chamada "embalagem ativa".

Embalagens ativas são atualmente uma das tecnologias mais dinâmicas usadas para preservar a qualidade dos alimentos através da liberação de agentes ativos por uma embalagem. A liberação de agentes ativos pode ser controlada por um longo período de tempo para manter ou aumentar a qualidade e vida de prateleira de produtos, sem a necessidade de adição direta de quaisquer substâncias ao alimento (AHMED et al., 2017).

2.3. Quitosana

A quitosana é amplamente encontrada na natureza e é um polissacarídeo não tóxico e biodegradável obtida na desacetilação da quitina extraída de crustáceos e insetos (HUANG et

al., 2020). WANG et al (2020) relatam em seu trabalho a atividade antimicrobiana da quitosana contra fungos e bactérias tais como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Suas propriedades classificam a quitosana com potencial material formador de filme, entretanto não é satisfatório produzir embalagens puras do material devido sua fragilidade e baixa elasticidade. Neste contexto é interessante a adição de um plastificante ou outro polímero que torne o filme menos rígido e quebradiço (JAKUBOWSKA et al., 2020). Compostos bioativos funcionais como óleo essencial e celulose podem ser incorporados pela quitosana na formação de filmes (LIU et al., 2020).

2.4. Óleos essenciais como antimicrobianos naturais

Os óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis produzidos pelas plantas como metabólitos secundários a partir de estímulos endógenos ou exógenos, localizados em estruturas especializadas nos vegetais, como células secretoras, células epidérmicas e em tricomas glandulares, podendo ser extraídos de diferentes órgãos da planta como raízes, caules, madeira, cascas, galhos, brotos, folhas, flores, frutos e sementes. (BHAVANIRAMYA et al., 2019; NAJAFIAN, 2014; TARIQ et al., 2019). Estes compostos apresentam uma vasta gama de classes químicas, como aldeídos, cetonas, álcoois, amins, amidas, fenóis e principalmente terpenos. Os terpenos são um dos principais componentes químicos dos OEs, e são constituídos de uma estrutura baseada em 5 carbonos conhecidos como isoprenos. Dando origem aos monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20) e Triterpenos (C30), sendo os compostos mais abundantes nos óleos essenciais (BARBOSA et al., 2017).

Os OEs são os compostos mais importantes entre a ampla gama de substâncias naturais com propriedades antifúngicas extraídas das plantas. Eles compõem uma combinação de metabólitos secundários voláteis que são bioativos, mostram atividade direta contra fitopatógenos e também podem melhorar os mecanismos de defesa da planta contra esses microrganismos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013).

Esses compostos são ricos em terpenoides voláteis e compostos fenólicos, e têm o potencial de inibir um amplo espectro de microrganismos. Geralmente, os componentes ativos inibem os microrganismos através do distúrbio em suas membranas citoplasmáticas, interrompendo a força motora do próton, fluxo de elétrons, transporte ativo e inibindo a síntese proteica (BURT, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

As cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* O157: H7 foram obtidas do Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Brasília, Campus Planaltina. Quitosana (viscosidade 20-300 cP, grau de desacetilação 95-98% e massa média molecular de 90-310 kDa) e glicerol foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Todos os outros solventes e produtos químicos usados eram de qualidade analítica.

3.2 Extração Óleo Essencial (OE)

Folhas frescas de *C. limonia* foram coletadas na região de Rio Verde - GO em agosto de 2015 e uma amostra foi depositada no Herbário Jataiense Professor Germano Guarin Neto sob o registro nº HJ 7522. As folhas frescas foram trituradas em moinho e submetidas a extrações pelo método hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger por 2 horas a partir da fervura (ESTEVAM ET AL. 2016). O OE extraído foi condicionado em frasco âmbar de vidro e mantido refrigerado a 4 ± 2 °C, até ser incorporado às soluções filmogênicas.

A caracterização química do OE de *C. limonia* (Tabela 1) foi realizada previamente e publicada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Química dos Produtos Naturais (ESTEVAM et al., 2016). Usando cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS, QP-5000, Shimadzu, Columbia, MD, EUA), 18 constituintes químicos foram identificados para *C. limonia* OE (total de 91,9%), incluindo limoneno (1) (46,3%), nerol (2) (10,0%) e 1,8-cineol (3) (13,4%) (Tabela 1).

3.3 Preparações dos Filmes

Filmes à base de quitosana foram produzidos de acordo com o método descrito por OJAGH et al. (2010) com algumas modificações. O filme foi preparado dissolvendo a quitosana em uma solução aquosa (1% v/v) de ácido acético glacial a uma concentração de 2% (g/v) enquanto se agitava em um agitador magnético de chapa quente. A solução foi misturada em baixa temperatura (40 °C), o que normalmente requer 6 horas de agitação. A solução de quitosana resultante foi filtrada através de um papel de filtro Whatman No. 3 para remover partículas não dissolvidas. Após a filtração, a solução retornou ao agitador magnético de chapa quente e foi adicionado glicerol como um plastificante a uma proporção de 0,75 ml/g quitosana. O plastificante foi misturado na solução por 30 minutos. Em seguida, Tween

80 foi adicionado como um emulsificante na proporção de 0,2% (v/v) de OE para auxiliar na dissolução do óleo essencial nas soluções formadoras de filme. Após 1 hora de agitação, OE foi adicionado à solução de quitosana para atingir as concentrações finais de 0,4%, 0,8%, 1,5% e 2% (v/v) óleo essencial por filme em equipamento de emulsificação (TE-139, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 900 rpm por 2 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a solução formadora de filme foi desgaseificada a vácuo por 5 min. As soluções formadoras de filme (160 mL) foram vertidas em placas de vidro de 27 × 27 cm² e em seguida, secas por 30 horas em condições ambientes (25 °C). Os filmes secos foram retirados das placas e armazenados em um dessecador em 25 °C e 51% de umidade relativa até as análises. Solução saturada de nitrato de magnésio foi usada para atender a umidade relativa necessária.

Tabela 1. Composição química do OE *Citrus limonia* GC-MS (Estevam et al., 2016)

Compostos	RI literatura	Calculado	Área (%)
Mirceno	990	977	0.8
Limoneno	1029	1028	40.0
Nerol	1361	1367	6.8
1,8-Cineol	1031	1030	13.4
(trans)-Óxido de Limoneno	1142	1137	3.0
Óxido de Cariofileno	1583	1586	6.9
Geraniol	1267	1274	3.4
Neral	1238	1243	3.9
Linalool	1096	1100	2.9
(cis)-Óxido de Linalool	1072	1073	1.2
P-Cimena	1024	1024	0.7
Sabinene	1070	1067	0.3
Isopulegol	1159	1156	1.7
Pinocarvona	1164	1163	0.7
α-Terpineol	1118	1192	2.3
(trans)-Carveol	1216	1220	1.7
(4E)-Decen-1-ol	1262	1260	1.0
Citronelal	1273	1276	1.2
Total (%)	-	-	91.9

3.4 Caracterizações do Filme Bioativo

A espessura do filme foi medida com um micrômetro manual (precisão de 0,01 mm) em dez repetições e em posições aleatórias. A umidade do filme foi medida usando amostras de 2 cm² de massa conhecida e seco a 105 °C por 24 horas.

O teste de degradação do filme (biodegradabilidade) foi realizado de acordo com a metodologia descrito por STOLL et al. (2017) com modificações. Um solo orgânico natural contido em caixas de plástico foi usado como ambiente de degradação. As amostras de filme foram cortadas em retângulos (2 cm × 3 cm), secas a 60 °C até peso constante (w₀), colocadas em uma malha de plástico e enterradas a uma profundidade de 5 cm abaixo da superfície do solo. A cada dois dias, o solo era molhado para manter a umidade próxima de 40%. A taxa de degradação dos filmes foi determinada após 10 dias como perda de peso (w₁₀) calculada ((w₁₀ - w₀) / m₀) × 100 e expressa em porcentagem (%).

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) do filme foi medida conforme descrito por CASARIEGO, SOUZA E CERQUEIRA (2009). Os filmes foram selados em células de permeação contendo 3 g de sulfato de cálcio para simular a condição de armazenamento de 0% UR. As células foram inicialmente pesadas e colocadas em um dessecador contendo solução saturada de sulfato de potássio (97% UR a 25 °C). As células foram pesadas num intervalo de 2 horas durante 10 horas. A taxa de transmissão de vapor de água (TTVA) (g / m²h) foi determinada a partir da inclinação da análise de regressão do ganho de peso de água (Δa) transferido através de uma área de filme (A) por um tempo definido (Δt) (equação (1)). A TTVA dos filmes foi usada para calcular o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (PVA) utilizando a equação (2).

$$TTVA = \frac{\Delta a}{A \Delta t} \quad (1)$$

$$PVA = \frac{TTVA \times x}{\Delta p} \quad (2)$$

onde PVA é o coeficiente de permeabilidade (g mm/m² h Pa), x é a espessura do filme (mm), A é o filme área exposta (19,625 × 10⁻⁶ m²), e Δp é o gradiente parcial de pressão de vapor de água entre o interior (p₁) e exterior (p₂) da superfície do filme na câmara (Δp = 307,93 Pa a 25 °C).

A solubilidade em água dos filmes foi determinada conforme descrito por KAVOOSI et al. (2014) com modificações. A massa seca inicial foi determinada com amostras de filme de 2 cm² cortadas e secas a 100 ± 5 °C por 24 h. As amostras foram embebidas em 50 ml de

água destilada e após 24 horas a 23 ± 2 °C, foram secas novamente a 100 ± 5 °C por 24 horas para obtenção da massa seca final. A solubilidade em água do filme foi calculada usando a equação (3).

$$\text{Solubidade (\%)} = \frac{\text{massa seca inicial} - \text{massa seca final}}{\text{massa seca inicial}} \times 100 \quad (3)$$

A análise de cor dos filmes foi determinada usando um espectrofotômetro Color Quest II (Hunter lab, Reston, VA, EUA) usando o sistema CIEL *a*b*, e os valores de cromaticidade e tonalidade foram calculado com base nos parâmetros, a* e b*.

As propriedades de barreira à luz visível do filme foram medidas em 250-800 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Spectrometer Lambda 750, PerkinElmer, Shelton, CT, EUA).

As análises microestrutural do filme com aumento de 1000× foram realizadas utilizando um aparelho eletrônico microscópio de varredura (voltagem de aceleração 2,5 kV, JSM 6610, JEOL, São Paulo, Brasil) equipado com EDS (NSS Spectral Imaging, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) utilizando amostras secas e desengordurada.

3.5 Atividade Antibacteriana dos Filmes Bioativos

A atividade antimicrobiana foi avaliada in vitro contra duas bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). Resumidamente, 200 µL de cultura bacteriana (ajustada para 10^4 células/ml) foram cultivadas em placas com meio ágar triptona e 200 µL de suspensão de esporos (ajustado para 10^5 esporos/ml) em placas com ágar de contagem de plantas (PCA). Os filmes (10 mm de diâmetro) foram então colocados na superfície do ágar e incubados a 37°C por 24 horas. O diâmetro da zona de inibição foi medido com um paquímetro.

3.6 Análises Estatísticas

O experimento foi conduzido em triplicada. Os resultados correspondem à média \pm desvio padrão da média. Os dados foram analisados por análise de variância unilateral (ANOVA), enquanto o teste de Tukey ($p < 0,05$) foi usado para testar diferenças entre as médias utilizando o software Assistat versão 7.7 (Professor Francisco de A. S. e Silva, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, os filmes desenvolvidos foram caracterizados e os resultados comparados com aqueles obtidos para o filme sem OE (filme de quitosana) e com resultados relatados na literatura de como a incorporação de agentes ativos pode influenciar suas propriedades. Todos os filmes eram homogêneos, flexíveis, sem áreas quebradiças e sem bolhas (figura 1)

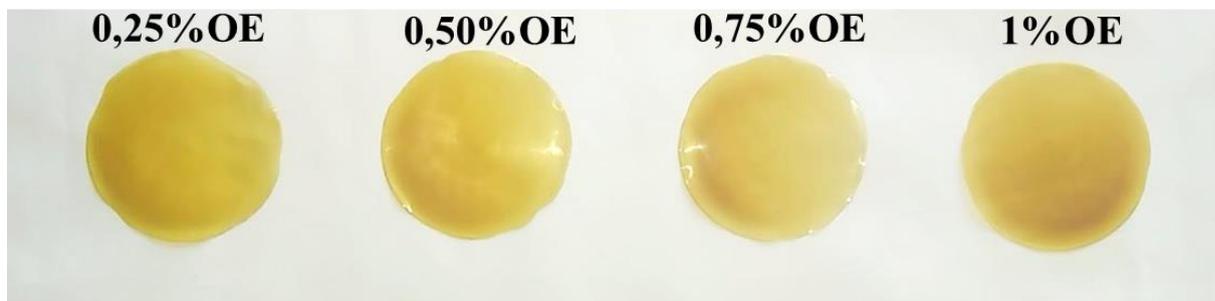


Figura 1 – Filmes ativos de quitosana com óleo essencial de *C. limonia*.

A Tabela 2 mostra as propriedades físicas dos filmes de quitosana incorporados com *C. limonia* OE (OEC). Como esperado, a incorporação do OEC aumentou significativamente ($p = 0,034$) a espessura dos filmes de quitosana a partir da concentração de 0,75%, o que pode ser atribuído ao acréscimo do número de moléculas com o aumento da inclusão de óleo essencial, causando maior volume livre do filme. Este comportamento foi ressaltado por ROSMARINUS et al. (2020) quando OEs foram incorporados em filmes de alginato de sódio, bem como quando o OE do cravo foi incorporado em filmes de pectina (NISAR et al., 2018).

Tabela 2. Propriedades físicas dos filmes de quitosa com óleo essencial de *Citrus limonia*

Filme	Espessura (mm)	Umidade (g/100 g)	Solubilidade (%)	PVA (g/m ² dia)	Biodegradabilidade (10 dias, %)
Controle	0.17 ± 0.04 ^b	24.80 ± 0.34 ^a	46.65 ± 2.49 ^a	341.64 ± 9.35 ^a	62.65 ± 1.03 ^a
0.25OE	0.18 ± 0.03 ^b	23.00 ± 0.65 ^{b,c}	38.78 ± 0.55 ^b	320.07 ± 6.52 ^b	55.46 ± 0.90 ^a
0.50OE	0.19 ± 0.06 ^b	23.12 ± 0.48 ^{b,c}	34.19 ± 0.35 ^{b,c}	307.52 ± 16.09 ^b	55.95 ± 3.60 ^a
0.75OE	0.23 ± 0.03 ^{a,b}	23.81 ± 0.40 ^{a,b}	33.16 ± 1.43 ^{b,c}	279.92 ± 5.73 ^c	55.66 ± 0.86 ^a
1.00OE	0.28 ± 0.05 ^a	21.88 ± 0.30 ^c	30.74 ± 1.68 ^c	277.2 ± 8.73 ^c	58.42 ± 4.22 ^a

^{a,b,c} Diferentes letras na mesma coluna indica diferença significativa no teste Tukey ($p \leq 0.05$)

O teor de umidade, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) e a solubilidade do filme de quitosana reduziram significativamente ($p < 0,001$) com um aumento de OE. A

diminuição do teor de umidade, solubilidade e PVA também foram relatadas para filmes de amido de mandioca com OE de cravo (de FIGUEIREDO SOUSA, 2019) e em filmes de quitosana com OE de *Eucalyptus globulus* (HAÍSA et al., 2016). JAHED et al. (2017) observaram uma significativa diminuição no PVA quando eles incorporaram OE de *Carum copticum* em filmes de quitosana. Este comportamento é atribuído à hidrofobicidade do OE em filmes, o que causa baixa afinidade com moléculas de água (MA et al., 2015). Quando o OE é adicionado em filmes de quitosana, as ligações covalentes são formadas entre os grupos funcionais de quitosana e cadeias de OE com uma diminuição na disponibilidade de grupos hidroxila e amino, limitando as interações polissacarídeo-água para ligações de hidrogênio (OJAGH et al., 2010).

A incorporação do OEC não afetou significativamente a biodegradabilidade (variou de 58,42% a 62,65%) dos filmes ao longo de 10 dias (Tabela 2). Resultados semelhantes foram descritos por SOUSA et al. (2019), que também não observaram efeito da adição de EO na biodegradabilidade de filmes de amido de mandioca com OE de cravo por mais de 10 dias. O presente trabalho sugere susceptibilidade à rápida ação de microrganismos no processo de biodegradação.

As propriedades ópticas são importantes na produção de embalagens de alimentos porque podem afetar a primeira expectativa dos humanos como consumidores (Song et al., 2018). A Tabela 3 mostra os parâmetros de cor do filme de quitosana com OEC. Na medição da cor, o valor L* corresponde ao brilho (0 — preto e 100 — branco) e os parâmetros a* e b* correspondem às coordenadas de cromaticidade verde (-)/vermelho (+) e azul (-)/amarelo (+), respectivamente (Adilah et al., 2018). Enquanto o parâmetro a* não foi afetado (cor verde com valores de -2,41 para -2,46), o parâmetro L* diminuiu (84,95 para 82,28) e o parâmetro b* aumentou (24,65 para 30,74) para filmes de quitosana com adição do OEC.

Tabela 3. Parâmetros de cor dos filmes de quitosana com óleo essencial de *Citrus limonia*

Filme	L*	a*	b*	C*	h°
Controle	84.95 ± 0.54 ^b	-2.46 ± 0.43 ^a	24.65 ± 2.49 ^a	24.77 ± 1.38 ^a	84.30 ± 1.31 ^a
0.25EO	84.68 ± 0.03 ^b	-2.45 ± 0.72 ^a	28.78 ± 0.55 ^b	28.88 ± 0.44 ^b	85.13 ± 0.73 ^a
0.50EO	83.44 ± 0.06 ^b	-2.43 ± 0.41 ^a	31.19 ± 0.35 ^{b,c}	31.28 ± 0.92 ^{b,c}	85.55 ± 0.71 ^a
0.75EO	83.23 ± 0.03 ^{a,b}	-2.43 ± 0.41 ^a	33.16 ± 1.43 ^{b,c}	33.25 ± 1.14 ^c	85.81 ± 1.40 ^a
1.00EO	82.28 ± 0.05 ^a	-2.41 ± 0.22 ^a	36.74 ± 0.68 ^d	36.82 ± 0.34 ^d	86.25 ± 0.92 ^a

^{a,b,c} Diferentes letras na mesma coluna indica diferença significativa no teste Tukey ($p \leq 0.05$). L*: brilho, a*: positivo significa verde, negativo significa vermelho, b*: positivo significa amarelo, negativo significa azul, C*: croma, h°: ângulo da tonalidade.

Os valores do ângulo da tonalidade neste trabalho variaram de 84,30° a 86,25° (entre vermelho 0° e amarelo 90°), indicando que os filmes tinham uma cor amarela. Os valores de cromaticidade aumentaram significativamente ($p < 0,001$) com a concentração do OEC de 24,77 a 36,82, indicando que a cor do filme ficou mais intensa. HAFSA et al. (2016) adicionou OE de *Eucalyptus globulus* em filmes de quitosana e relatou que os filmes tornaram-se mais escuro, vermelho e amarelado. SONG et al. (2018) também observou um ligeiro amarelecimento na coloração de filmes de amido de milho e trigo quando eles adicionaram OE de limão.

As propriedades de barreira à luz dos filmes de alimentos são um fator importante na determinação da embalagem capaz de proteger os alimentos da deterioração e perda de nutrientes e sabor quando expostos a luz visível e ultravioleta (DE MORAES CRIZEL et al., 2018). A Figura 1 mostra as propriedades de barreira à luz dos filmes de quitosana com OEC. Os filmes de quitosana incorporados com OEC mostraram boas propriedades de barreira à luz UV na região entre 200 e 350 nm com uma taxa de transmissão de luz UV abaixo de 0%. Na região visível (entre 370 e 750 nm), os filmes com OE mostraram-se mais eficazes como barreira à transmissão de luz. Esses resultados corroboram aqueles relatados por TONGNUANCHAN et al. (2012), que também observou uma diminuição na transmissão de luz e consequente aumento da opacidade, com a adição de OEs nos filmes. Este efeito pode ser associada a uma dispersão de luz pelas gotículas de óleo essencial incorporadas ao matriz polimérica de quitosana (HOSSEINI et al., 2015).

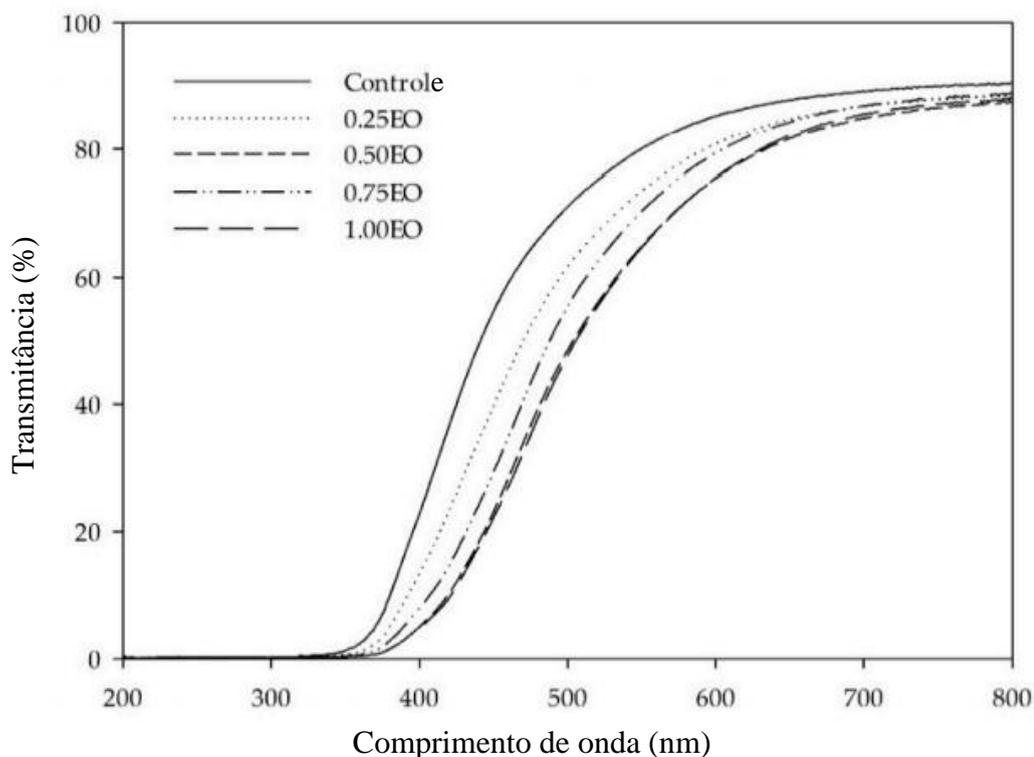


Figura 2 - Transmissão de luz de filmes de quitosana com óleo essencial de *Citrus limonia*.

A qualidade dos alimentos, como óleos e gorduras, depende de sua estabilidade oxidativa (STOLL et al, 2017). Portanto, é essencial para desenvolver embalagens que contribuam para sua manutenção para retardar a deterioração causada pela oxidação lipídica, por sua vez, causada pela luz ultravioleta (SÁNCHEZ-GONZÁLES et al., 2009).

O filme de quitosana é uniforme com superfície plana e sem rachaduras (Figura 2). Quando o OEC foi adicionado no filme de quitosana, principalmente em concentrações mais elevadas, a microestrutura era heterogênea, com gotículas de óleo retidas intimamente na rede contínua de polissacarídeos. Comportamento semelhante foi descrito em filmes de quitosana com OE de *Eucalyptus globulus* (HAFSA et al., 2016), filmes compostos de gelatina de peixe e quitosana com OE de orégano (HOSSEINI et al., 2015), e filmes de amido de milho incorporados com OE de *Zataria multiflora* Boiss e *Mentha pulegium* (GHASEMLOU et al., 2013). Este comportamento provavelmente ocorreu devido às forças de deformação que atuaram durante a agregação da cadeia polimérica por evaporação do solvente (SÁNCHEZ-GONZÁLES et al., 2009).

A Figura 3 mostra a atividade antibacteriana dos filmes de quitosana com OEC contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os filmes de quitosana sem OEC apresentaram atividade não antibacteriana. Apesar de relatada a atividade antimicrobiana da quitosana,

quando ela é usado para formar filmes eles não podem ser difundidos através do meio de ágar e, portanto, não demonstram propriedades antimicrobianas (OJAGH et al., 2010; HAFSA et al., 2016; OUATTARA et al., 2000; ZIVANOVIC et al., 2005; WANG et al., 2011).

Entretanto, os filmes de quitosana com OEC apresentaram inibição significativa ($p = 0,0247$) contra *S. aureus*, para concentração de 0,25% (Figura 3). As zonas de inibição observadas foram 15,1 e 29,1 mm nos filmes de quitosana 0,25OE e 1,0OE, respectivamente, com diferenças significativas entre eles ($p = 0,0247$). Nenhum dos filmes estudados mostrou efeito inibitório contra *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa. A atividade antibacteriana contra *S. aureus*, bactéria Gram-positiva, pode ter ocorrido porque essas bactérias têm um envelope celular estruturalmente e funcionalmente menos complexo do que o envelope de bactérias Gram-negativas, como é o caso de *E. coli*. Bactérias Gram-negativas têm moléculas de lipopolissacarídeos em suas membranas que atuam como barreira, reduzindo a formação de compostos hidrofóbicos (OTONI et al., 2014).

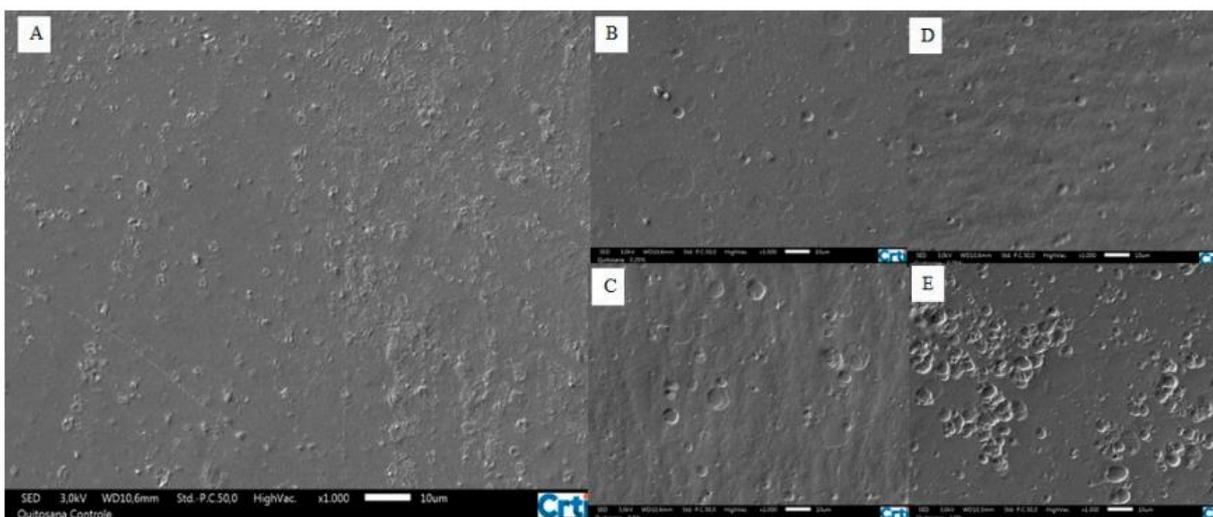


Figura 3 - Micrografia (ampliação de 1000 \times) de filmes de quitosana (A), com 0,25% (B), 0,50% (C), 0,75% (D) e 1,0% (E) de óleo essencial de *Citrus limonia*.

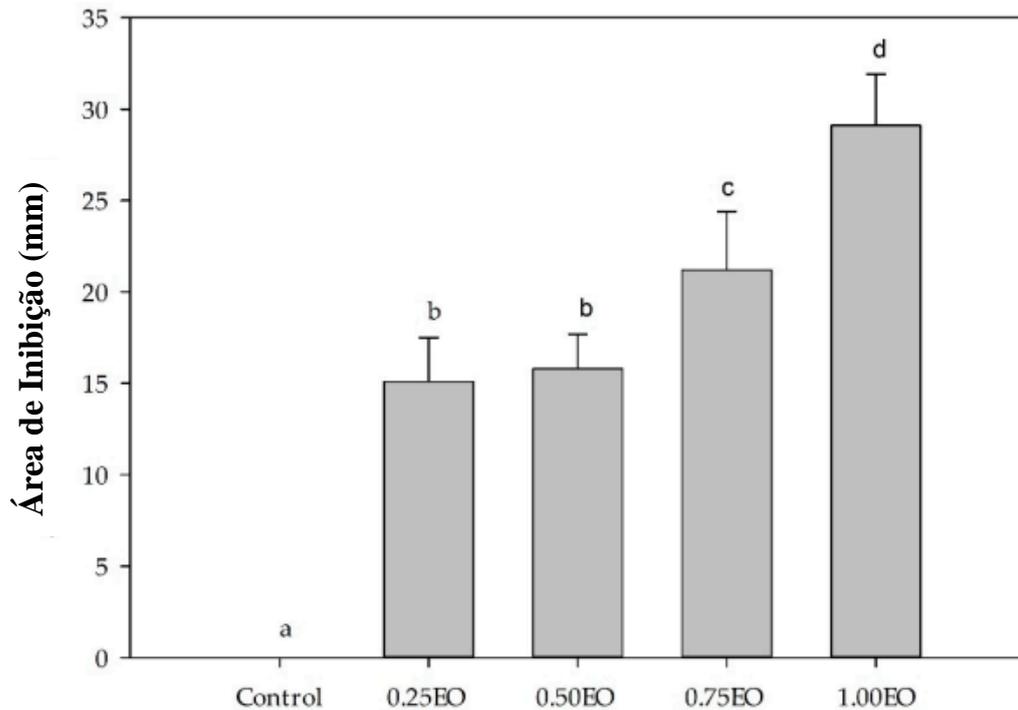


Figura 4 - Atividade antimicrobiana (mm) dos filmes de quitosana com óleo essencial de *Citrus limonia* contra *Staphylococcus aureus*. ^{a,b,c} Diferentes letras na mesma coluna indica diferença significativa no teste Tukey ($p \leq 0.05$).

A atividade antibacteriana dos filmes com OEC pode ter ocorrido devido ao alto teor de limoneno (46,3%) relatado neste óleo essencial (Tabela 1). O potencial antibacteriano do limoneno foi citado em vários estudos (LU et al., 2016)(DE ARAÚJO et al., 2020)(ESPINA et al., 2013). Os óleos essenciais contêm limoneno como componente principal. Este composto demonstrou melhor atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas, como *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* (SETTANNI et al., 2012). Além disso, ARAÚJO et al. (2020) avaliaram a atividade antibacteriana in vitro do limoneno contra *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*, e observaram que era mais eficaz contra *S. aureus*, como no presente estudo para o filme de quitosana com OEC.

5 CONCLUSÕES

Um filme alimentar e/ou material de revestimento composto de quitosana e OE de *Citrus limonia* foi desenvolvido, suas características foram avaliadas e sua atividade antibacteriana foi estudada. Os resultados deste estudo mostraram que filmes a base de quitosana contendo OE de *C. limonia* poderiam ser usados como filmes ativos devido às suas propriedades de barreira à água, luz UV-Vis e atividade antibacteriana. A incorporação do OE

de *C. limonia* nos filmes diminuiu o teor de umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água e melhoraram as propriedades ópticas e antibacterianas, importantes em aplicações de embalagens de alimentos. Filmes comestíveis feitos com quitosana e OE de *C. limonia* promovem novas maneiras de melhorar a segurança microbiana e a vida útil dos alimentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGHANY, A.M.; MEIKHAIL, M.S.; EL-BANA, A.A. Microbial activity and swelling behavior of chitosan/polyvinyl alcohol/sodium alginate semi-natural terpolymer interface containing amoxicillin for wound dressing applications. **Biointerface Res. Appl. Chem.**, v.9, p. 4368–4373, 2019;

ACCO M.; FERREIRA, F.S.; HENRIQUE, E.C.; TONDO, E.C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal muocsa of food handles. **Food Microbiology**, v. 20, p. 489-493, 2003;

ACHILIAS, D.S.; ROUPAKIAS, C.; MEGALOKONOMOS, P.; LAPPAS, A.A.; ANTONAKOU, E.V. Chemical recycling of plastic wastes made from polyethylene (LDPE and HDPE) and polypropylene (PP), **J. Hazard. Mater.** v.149, p. 536–542, 2007;

ADILAH, Z.A.M.; JAMILAH, B.; HANANI, Z.A.N. Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. **Food Hydrocoll.**, v. 74, p. 207–218, 2018;

AMALRAJ, A.; HAPONIUK, J.T.; THOMAS, S.; GOPI, S. Preparation, characterization and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol/gum arabic/chitosan composite films incorporated with black pepper essential oil and ginger essential oil. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 151, p. 366–375, 2020;

BROUWER, R.; HADZHIYSKA, D.; IOAKEIMIDIS, C.; OUDERDORP, H.; The social costs of marine litter along European coasts, **Ocean Coast. Manage.** v.138, p. 38-49, 2017;

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 223–253, 2004;

CASARIEGO, A.; SOUZA, B.W.S.; CERQUEIRA, M.A.; TEIXEIRA, J.A.; CRUZ, L.; DÍAZ, R.; VICENTE, A.A. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and

clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocoll.**, n. 23, p. 1895–1902, 2009;

DE ARAÚJO, A.C.J.; FREITAS, P.R.; DOS SANTOS BARBOSA, C.R.; MUNIZ, D.F.; ROCHA, J.E.; DA SILVA, A.C.A.; DE MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, C.D.; RIBEIRO-FILHO, J.; DA SILVA, L.E.; Confortin, C.; et al. GC–MS–FID characterization and antibacterial activity of the Mikania cordifolia essential oil and limonene against MDR strains. **Food Chem. Toxicol.**, v. 136, 2020;

DE FIGUEIREDO SOUSA, H.A.; OLIVEIRA FILHO, J.G.; EGEA, M.B.; DA SILVA, E.R.; MACAGNAN, D.; PIRES, M.; PEIXOTO, J. Active film incorporated with clove essential oil on storage of banana varieties. **Nutr. Food Sci.**, v.49, p. 911–924, 2019;

DE MORAES CRIZEL, T.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; ALVES, V.D.; BANDARRA, N.; MOLDÃO-MARTINS, M.; FLÔRES, S.H. Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. **Food Hydrocoll.**, v.74, p. 139–150, 2018;

DE OLIVEIRA FILHO, J.G.; RODRIGUES, J.M.; VALADARES, A.C.F.; DE ALMEIDA, A.B.; DE LIMA, T.M.; TAKEUCHI, K.P.; ALVES, C.C.F.; DE FALCÃO SOUSA, H.A.; DA SILVA, E.R.; DYSZY, F.H.; et al. Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates. **Food Hydrocoll**, v.92, p.267–275 2019;

DEPLEDGE, M.H.; GALGANI, F.; PANTI, C.; CALIANI, I.; CASSINI, S.; FOSSI, M.C. Plastic litter in the sea, **Mar. Environ. Res.** v.92, p. 279–281, 2013;

DI FILIPPO, M.F.; PANZAVOLTA, S.; ALBERTINI, B.; BONVICINI, F.; GENTILOMI, G.A.; ORLACCHIO, R.; PASSERINI, N.; BIGI, A.; DOLCI, L.S. Functional properties of chitosan films modified by snail mucus extract. **Int. J. Biol. Macromol**, v.143, p.126–135., 2020;

DILKES-HOFFMAN, L.; LANE, J.L.; GRANT, T.; PRATT, S.; LANT, P.A.; LAYCOCK, B. Environmental impact of biodegradable food packaging when considering food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 325-334, 2018;

ESPINA, L.; GELAW, T.K.; DE LAMO-CASTELLVÍ, S.; PAGÁN, R.; GARCÍA-GONZALO, D. Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes. **PloS ONE**, v. 8, p. 1–10, 2013;

ESTEVAM, E.B.B.; MIRANDA, M.L.D.; ALVES, J.M.; EGEEA, M.B.; PEREIRA, P.S.; MARTINS, C.H.G.; ESPERANDIM, V.R.; MAGALHÃES, L.G.; BOLELA, A.C.; CAZAL, C.M.; ET AL. Chemical composition and biological activities of the essential oils from the fresh leaves of *Citrus limonia osbeck* and *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). **Rev. Virtual Quim.**, v. 8, p. 1842–1854, 2016;

FETSCH, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 1-6, 2014;

GHASEMLOU, M.; ALIHEIDARI, N.; FAHMI, R.; SHOJAEI-ALIABADI, S.; KESHAVARZ, B.; CRAN, M.J.; KHAKSAR, R. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. **Carbohydr. Polym.**, v. 98, p. 1117–1126, 2013;

GIOSAFATTO, C.V.L.; AL-ASMAR, A.; D'ANGELO, A.; ROVIELLO, V.; ESPOSITO, M.; MARINIELLO, L. Preparation and characterization of bioplastics from grass pea flour cast in the presence of microbial transglutaminase. **Coatings**, v.8, p.435, 2018;

GREGORY, M.R. Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions, **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.**, v. 364, p. 2013–2025, 2009;

HAFSA, J.; ALI SMACH, M.; BEN KHEDHER, M.R.; CHARFEDDINE, B.; LIMEM, K.; MAJDOUB, H.; ROUATBI, S. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. **LWT Food Sci. Technol.**, v.68, p. 356–364, 2016;

HAHLADAKIS, J.N.; VELIS, C.A.; WEBER, R.; LACOVIDOUA, E.; PURNELL, P. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. **Journal of Hazardous Materials**, v.344, p.179–199, 2018;

HOSSEINI, S.F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. **Ind. Crops Prod.**, v. 67, p. 403–413, 2015;

HUANG, X. *et al.*, Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans*, the pathogen of potato late blight. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018;

JAHED, E.; KHALEDABAD, M.A.; ALMASI, H.; HASANZADEH, R. Physicochemical properties of *Carum copticum* essential oil loaded chitosan films containing organic nanoreinforcements. **Carbohydr. Polym.**, v. 164, p. 325–338., 2017;

JAKUBOWKA E.; GIERSZEWSKA M.; NOWACZYK J.; OLEMNIK-KRUSZKOWSKA, E. Physicochemical and storage properties of chitosan-based films plasticized with deep eutectic solvents, **Food Hydrocolloids**, v. 108, 2020;

JAMBECK, J. R. *et al.*, “Plastic waste inputs from land into the ocean”. **Science**, v. 347, p. 768-770, 2015;

JIMÉNEZ-ROSADO, M.; ZARATE-RAMÍREZ, L.S.; ROMERO, A.; BENGOCHEA, C.; PARTAL, P.; GUERRERO, A. Bioplastics based on wheat gluten processed by extrusion. **J. Clean. Prod.** V.239, 2019;

KAVOOSI, G.; RAHMATOLLAHI, A.; MOHAMMAD MAHDI DADFAR, S.; MOHAMMADI PURFARD, A. Effects of essential oil on the water binding capacity, physico-mechanical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin films. **LWT Food Sci. Technol.**, v.57, p. 556–561, 2014;

LIU X. *et al.*, Development and properties of new kojic acid and chitosan composite biodegradable films for active packaging materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 483-490, 2020;

LU Y., *et al.* Directly profiling intact *Staphylococcus aureus* in water and foods via enzymatic cleavage aptasensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 1132, p. 28-35, 2020;

LU, H.; XU, C.; ZHANG, X.; LIANG, Y.; LIU, X. Antibacterial effect of limonene on food-borne pathogens. **J. Agric. Life Sci.**, v. 42, p. 306–312, 2016;

LUÍS, Â.; PEREIRA, L.; DOMINGUES, F.; RAMOS, A. Development of a carboxymethyl xylan film containing licorice essential oil with antioxidant properties to inhibit the growth of foodborne pathogens. **LWT Food Sci. Technol.**, v.111, p.218–225, 2019;

MA, Q.; ZHANG, Y.; CRITZER, F.; DAVIDSON, P.M.; ZIVANOVIC, S.; ZHONG, Q. Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil. **Food Hydrocoll.**, v. 52, p. 533–542, 2015;

MAHCENE, Z.; KHELIL, A.; HASNI, S.; AKMAN, P.K.; BOZKURT, F.; BIRECH, K.; GOUDJIL, M.B.; TORNUK, F. Development and characterization of sodium alginate based active edible films incorporated with essential oils of some medicinal plants. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.145, p. 124–132, 2020;

MIR, S.A.; DAR, B.N.; WANI, A.A.; SHAH, M.A. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 80, p. 141–154, 2018;

NERIO, L.S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresour. Technol.**, v.101, p. 372–378, 2010;

NISAR, T.; WANG, Z.C.; YANG, X.; TIAN, Y.; IQBAL, M.; GUO, Y. Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.106, p. 670–680, 2018;

OJAGH, S.M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S.H.; HOSSEINI, S.M.H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chem.**, v. 122, p. 161–166, 2010;

OTONI, C.G.; DA MOURA, M.R.; AOUADA, F.A.; CAMILLOTO, G.P.; CRUZ, R.S.; LOREVICE, M.V.; DE FF SOARES, N.; MATTOSO, L.H.C. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocoll.**, v. 41, p. 188–194, 2014;

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; PIETTE, G.; BÉGIN, A.; HOLLEY, R.A. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. **J. Food Sci.**, v. 65, p. 768–773, 2000;

PIRES, T.C.; PICCOLI, R.H. Inhibitory effect of essential oils from the genus *Citrus* on the microorganisms growth. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.71, p. 378–385, 2012;

PRIYADARSHI, R.; RHIM, J.-W. Chitosan-based biodegradable functional films for food

packaging applications. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, v. 62, 2020;

SAGNELLI, D. *et al.* Cross-linked amylose bio-plastic: A transgenic-based compostable plastic alternative. **Int. J. Mol. Sci.** v.18, p.2075., 2017;

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocoll.**, v. 43, p. 547–556, 2015;

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; VARGAS, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. **Food Hydrocoll.**, v. 23, p. 2102–2109, 2009;

SANI, I.K.; PIRSA, S.; TAGHIZADEH, S. Preparation of chitosan/zinc oxide/Melissa officinalis essential oil nano-composite film and evaluation of physical, mechanical and antimicrobial properties by response surface method. **Polym. Test.** v.79, 2019;

SETTANNI, L.; PALAZZOLO, E.; GUARRASI, V.; ALEO, A.; MAMMINA, C.; MOSCHETTI, G.; GERMANÀ, M.A. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. **Food Control**, v. 26, p. 326–330, 2012;

SONG, X.; ZUO, G.; CHEN, F. Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 107, p. 1302–1309, 2018;

STOLL, L.; DA SILVA, A.M.; SILVA IAHNKE, A.O.E.; COSTA, T.M.H.; FLÔRES, S.H.; DE OLIVEIRA RIOS, A. Active biodegradable film with encapsulated anthocyanins: Effect on the quality attributes of extra-virgin olive oil during storage. **J. Food Process. Preserv.**, v. 41, p. 1–8, 2017;

TARIQ, S.; WANI, S.; RASOOL, W.; SHAFI, K.; BHAT, M.A.; PRABHAKAR, A.; SHALLA, A.H.; RATHER, M.A. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microb. Pathog.**, v. 134, 2019;

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties and antioxidant

activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. **Food Chem.**, v. 134, p. 1571–1579, 2012;

ULLAH, F.; JAVED, F.; KHAN, A.N.; KUDUS, M.H.A.; JAMILA, N.; MINHAZ, A.; AKIL, H.M. Synthesis and surface modification of chitosan built nanohydrogel with antiviral and antimicrobial agent for controlled drug delivery. **Biointerface Res. Appl. Chem.**, v. 9, p. 4439–4445, 2019;

WANG W., XUE C., MAO, X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4532 – 4546, 2020;

WANG, L.; LIU, F.; JIANG, Y.; CHAI, Z.; LI, P.; CHENG, Y.; JING, H.; LENG, X. Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 12411–12419, 2011;

YEDDES, W.; DJEBALI, K.; AIDI WANNES, W.; HORCHANI-NAIFER, K.; HAMMAMI, M.; YOUNES, I.; SAIDANI TOUNSI, M. Gelatin-chitosan-pectin films incorporated with rosemary essential oil: Optimized formulation using mixture design and response surface methodology. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.154, p.92–103, 2020;

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A.E. Antimicrobial Activity of Chitosan films enriched with essential oils. **J. Food Sci.**, v. 70, p. 45–51, 2005.