



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS**

PAULO VICTOR DAVID CAVALCANTE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME ATIVO
ANTIMICROBIANO DE AMIDO DE ARARUTA/QUITOSANA INCORPORADO
COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus Vulgaris***

Recife
2018

PAULO VICTOR DAVID CAVALCANTE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME ATIVO
ANTIMICROBIANO DE AMIDO DE ARARUTA/QUITOSANA INCORPORADO
COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus Vulgaris***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de mestre em Ciência de Materiais.

Área de concentração: Materiais poliméricos.

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Vinhas

Co-orientadora: Profa. Dra. Yêda Medeiros Bastos de Almeida

Recife

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

C376d Cavalcante, Paulo Victor David
Desenvolvimento e caracterização de filme ativo antimicrobiano de amido de araruta/quitosana incorporado com óleo essencial de *Thymus Vulgaris* / Paulo Victor David Cavalcante. – 2018.
69 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Glória Maria Vinhas
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2018.
Inclui referências.

1. Materiais poliméricos. 2. Embalagem ativa. 3. Amido de araruta. 4. Quitosana. I. Vinhas, Glória Maria (orientadora). II. Título.

547.7 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2019-49

PAULO VICTOR DAVID CAVALCANTE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME ATIVO
ANTIMICROBIANO DE AMIDO DE ARARUTA/QUITOSANA INCORPORADO
COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus Vulgaris***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de mestre em Ciência de Materiais.

Data de aprovação: 09/08/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Glória Maria Vinhas (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Fernando Hallwass (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dr^a. Viviane Fonseca Caetano (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Aos meus pais, amigos e familiares, que de alguma forma contribuíram com meu crescimento pessoal e/ou profissional e que sempre estão presentes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Sulamita e Adilson (in memoriam) pela educação, apoio e pelo amor concedido.

A Fabiana Thayse, Michelle Félix, Ivo Diego e Sônia pela companhia, ideias trocadas e aprendizado compartilhado, que só tornaram o mestrado mais prazeroso e engrandecedor e que especialmente me fizeram sentir acolhido no LMPC.

A Gileade Assunção, pelo companheirismo e paciência durante essa jornada acadêmica.

Aos amigos Danielle Neves, Larissa Ramos, Linda Avelino, Arquimedes Moura, pela amizade e cuja presença em minha vida tornaram os últimos anos mais especiais;

Aos meus familiares que de alguma forma tenham contribuído para o meu crescimento pessoal.

Aos colegas do LMPC pela companhia, recepção e por permitirem me sentir parte do grupo.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Glória Vinhas, por desde o primeiro momento ter me acolhido como aluno e por ter aceitado contribuir com minha carreira acadêmica e formação científica.

A Prof^a Dr^a. Yêda, por ter aceitado ser minha co-orientadora e pelas contribuições dadas a minha formação e a este trabalho;

Aos professores Fernando Hallwass e Viviane Fonseca, por terem gentilmente aceitado fazer parte da banca examinadora desta dissertação.

Ao Grupo de Instrumentação e Análises Químicas (GIAQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Serra Talhada pelas análises de Espectroscopia de Infravermelho; ao ITEP pela análise por DRX, a Central Analítica pela CG-MS, e a Gisele e Ceça do Laboratório de Microbiologia do DEQ pelas contribuições e paciência durante a execução dos ensaios microbiológicos.

A Capes pela bolsa concedida durante o Mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais pela minha formação. E a todos que de alguma forma tenham contribuído para a realização deste trabalho.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”..

(CURRIE, [18--] apud O'LOUGHLIN, MONTGOMERY, DWYER, 1921)

RESUMO

A comunidade científica tem trabalhado para atender a demanda da indústria de alimentos e da sociedade, desenvolvendo novas tecnologias para estender o prazo de validade e preservar as características dos alimentos, como as embalagens ativas antimicrobianas. Estas embalagens incorporam um agente antimicrobiano na matriz polimérica, sendo possível a migração deste componente ativo para a superfície do alimento, formando uma barreira inibidora do crescimento microbiano, evitando a deterioração do produto e prolongando seu prazo de validade. Dada a devida atenção à exigência dos consumidores à substituição dos produtos sintéticos pelos naturais, essa demanda tem sido atendida com o uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos em embalagens ativas. O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) tem sido investigado devido à presença de uma variedade de compostos antimicrobianos em sua composição. Neste trabalho, desenvolveu-se um filme ativo biodegradável através da blenda de amido de araruta (*Maranta arundinacea*) e quitosana aditivada com óleo essencial de tomilho. O óleo essencial foi adicionado às blendas nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% (m/m). Para isto, foi avaliada a composição química e o potencial antimicrobiano do óleo, bem como as propriedades mecânicas, térmicas e antimicrobianas dos filmes ativos desenvolvidos. Através da Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-MS) e da Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) observou-se a presença dos compostos ativos como timol, carvacrol e cimeno, na composição do óleo. A atividade antimicrobiana foi investigada pelo teste de disco-difusão em ágar utilizando as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo que ambas se apresentaram sensíveis ao óleo essencial de tomilho. A incorporação do óleo essencial de tomilho nos filmes poliméricos foi investigada por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho associada à análise de componentes principais, onde se verificou a formação de agrupamentos entre as amostras dos filmes, indicando uma possível mudança estrutural com a adição do óleo essencial de tomilho. Na análise termogravimétrica (TGA), foi observado que os filmes aditivados com 2,5% e 5% de óleo essencial de tomilho obtiveram menor perda de massa na curva térmica inicial, agregando maior estabilidade térmica desses filmes. Pelo ensaio mecânico de tração, foi verificado que os filmes aditivados com 2,5% de óleo essencial de tomilho ficaram menos rígido e mais flexível em comparação aos demais. O ensaio de difratometria de raios-X (DRX) indicou a predominância de regiões amorfas nos filmes analisados. No ensaio de atividade antimicrobiana, o filme aditivado com 2,5% de óleo essencial de tomilho apresentou inibição significativa do crescimento bacteriano da *E. coli*. Sendo assim, os filmes desenvolvidos apresentam potencial para sua aplicação como embalagem ativa antimicrobiana para o acondicionamento e conservação de alimentos.

Palavras-chave: Embalagem ativa. Amido de araruta. Quitosana. Óleo essencial de tomilho.

ABSTRACT

The scientific community has worked to meet the demands of the food industry and society, developing new technologies to extend the shelf life and preserve the characteristics of food, as the antimicrobial active packaging. These packages incorporate an antimicrobial agent into the polymer matrix, allowing the migration of this active component to the surface of the food, forming a barrier inhibiting microbial growth, preventing deterioration of the product and extending its shelf life. Due attention to the requirement of consumers to substitute synthetic products for natural products, this demand has been met as the use of essential oils as antimicrobial agents in active packaging. Thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) has been investigated because of the presence of a variety of antimicrobial compounds in its composition. In this work an active biodegradable film was developed through the blends of arrowroot starch (*Maranta arundinacea*) and chitosan additive with essential oil of thyme. The essential oil was added to the blends in the concentrations of 2.5%, 5% and 10% (m/m). For this end, the chemical composition and the antimicrobial potential of the oil as well as the mechanical, thermal and antimicrobial properties of the developed active films were evaluated. The presence of the active compounds thymol, carvacrol and cineol in the composition of the oil was observed through the Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) and Infrared Spectroscopy (FTIR). The antimicrobial activity was investigated through the disk-diffusion test in agar using the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, where both were sensitive to the essential oil of thyme. The incorporation of the essential oil of thyme into the polymeric films was investigated through the technique of infrared spectroscopy associated to the analysis of main components, where the formation of clusters between the samples of the films was verified, indicating a possible structural change with the addition of the oil essential thyme. In the thermogravimetric analysis (TGA), it was observed that the films added with 2.5% and 5% of thyme essential oil obtained lower mass loss in the initial thermal curve, adding higher thermal stability of these films. Through the mechanical tensile test, it was verified that the film added with 2.5% of essential oil of thyme was less rigid and more elastic in comparison to the others. The X-ray diffraction (XRD) test indicated the predominance of amorphous regions in the analyzed films. In the antimicrobial activity assay, the film added with 2.5% thyme essential oil showed significant inhibition of bacterial growth of *E. coli*. Thus, the developed films have potential for their application as active antimicrobial packaging for food packaging and preservation.

Keywords: Active packaging. Arrowroot starch. Chitosan. Essential oil of thyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Propriedades necessárias em uma embalagem ativa	16
Figura 2 –	Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>): planta (a) e ramos secos (b)	19
Figura 3 –	Principais componentes do tomilho: p-cimeno (a), carvacrol (b), timol (c) e γ -terpineno (d).....	20
Figura 4 –	Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b).....	23
Figura 5 –	Araruta	25
Figura 6 –	Estrutura química da quitina e quitosana	26
Figura 7 –	Modelo de ensaio de atividade antimicrobiana pelo método disco-difusão em ágar	30
Figura 8 –	Preparo do filme em banho maria sob agitação	31
Figura 9 –	Solução filmogênica em dessecador com bomba à vácuo	32
Figura 10 –	Equipamento de DSC, modelo 1 Star ^e System.....	35
Figura 11 –	Equipamento de ensaio de tração EMIC.....	36
Figura 12 –	Espectro de infravermelho do óleo essencial de tomilho.....	39
Figura 13 –	Teste de inibição microbiana do óleo essencial de tomilho para <i>Escherichia coli</i> (a, b) e <i>Staphylococcus aureus</i> (c, d).....	41
Figura 14 –	Espectro de infravermelho dos filmes de amido puro (AP) e da blenda amido/quitosana (AQP).....	43
Figura 15 –	Espectro de infravermelho dos filmes de amido/quitosana e dos filmes aditivados com óleo essencial de tomilho.	43
Figura 16 –	Análise das componentes principais dos filmes de amido/quitosana puro e aditivado com 2,5, 5 e 10% de óleo essencial de tomilho.....	45
Figura 17 –	Loadings da PCA referentes aos filmes de amido/quitosana.....	45
Figura 18 –	Difratograma de Raios-X do filme de amido puro (AP); filme de amido/quitosana puro (AQP) e filmes aditivados com óleo essencial de tomilho nas concentrações de 2,5% (AQ02), 5% (AQ05) e 10% (AQ10).....	46
Figura 19 –	Curvas de TGA (a) e DTG (b) dos filmes de amido de araruta/quitosana puro e aditivados com 2,5%, 5% e 10% (m/m) de óleo essencial de tomilho	48
Figura 20 –	Termograma dos filmes de amido/quitosana puro e aditivados com óleo essencial de tomilho.....	50
Figura 21 –	Atividade antimicrobiana do filme de amido/quitosana aditivado com 2,5% de óleo essencial de tomilho	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição dos filmes poliméricos	31
Tabela 2 –	Composição do óleo essencial de tomilho obtida por CG-MS	38
Tabela 3 –	Atribuição das bandas características no espectro de infravermelho do cimeno, timol e carvacrol.....	40
Tabela 4 –	Atribuição das bandas características no espectro de infravermelho da quitosana e do amido.....	42
Tabela 5 –	Grau de cristalinidade estimado para os filmes de amido e amido/quitosana.	47
Tabela 6 –	Valores de permeabilidade ao vapor de água do filme de amido/quitosana puro (AQP) e filmes aditivados com óleo essencial de tomilho nas concentrações de 2,5% (AQ02), 5% (AQ05) e 10% (AQ10).	47
Tabela 7 –	Parâmetros de TGA e DTG dos filmes.....	49
Tabela 8 –	Parâmetros térmicos (DSC) dos filmes	49
Tabela 9 –	Parâmetros mecânicos dos filmes de amido/quitosana aditivados com óleo essencial de tomilho.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AP	Amido puro
AQ02	Amido/quitosana + 2,5% óleo essencial de tomilho
AQ05	Amido/quitosana + 5% óleo essencial de tomilho
AQ10	Amido/quitosana + 10% óleo essencial de tomilho
AQP	Amido/quitosana puro
ASTM	American Society for Testing and Materials
DRX	Difratometria de raios-X
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada com Espectrometria de Massas
OET	Óleo essencial de tomilho
PCA	Análise de Componentes Principais
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
TGA	Análise Termogravimétrica
WVP	Barreira ao Vapor de Água
X_c	Grau de cristalização
ΔH_f	Entalpia de fusão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	EMBALAGENS ATIVAS	16
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS	18
2.2.1	Óleo essencial de tomilho	19
2.3	AMIDO	21
2.3.1	Gelatinização e retrogradação do amido	24
2.4	ARARUTA	25
2.5	QUITOSANA	26
2.6	BLENDAS POLIMÉRICAS	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	MATERIAIS	29
3.2	MÉTODOS	29
3.2.1	Caracterização do óleo essencial de tomilho	29
3.2.1.1	Cromatografia Gasosa Acoplada com Espectrometria de Massas (GC-MS)	29
3.2.1.2	Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho pelo método do disco-difusão em ágar	29
3.2.2	Preparação dos filmes poliméricos	30
3.2.3	Caracterização dos filmes poliméricos	32
4.2.3.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	32
4.2.3.2	Análise de Componentes Principais (PCA)	32
4.2.3.3	Difratometria de Raios-X (DRX)	33
4.2.3.4	Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)	33
4.2.3.5	Análise Termogravimétrica	34
4.2.3.6	Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	34
4.2.3.7	Ensaio de Tração	35
4.2.3.8	Análise da atividade antimicrobiana	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO	38
4.1.1	Cromatografia Gasosa Acoplada com Espectrometria de Massas (GC-MS)	38
4.1.2	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	39
4.1.3	Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho pelo método do disco-difusão em ágar	40
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS	42
4.2.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	42

4.2.2	Análise de Componentes Principais (PCA)	44
4.2.3	Difratometria de Raios-X (DRX)	45
4.2.4	Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)	47
4.2.5	Análise Termogravimétrica.....	48
4.2.6	Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	49
4.2.7	Ensaio de Tração	51
4.2.8	Análise da Atividade Antimicrobiana	52
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	55
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A cadeia de distribuição de alimentos tem passado por grandes avanços nos últimos anos, estimulando pesquisadores e indústrias a desenvolverem novos sistemas de embalagens. Prolongar a durabilidade do produto embalado, manter suas características organolépticas, sua qualidade nutricional e fornecer segurança microbiológica ao consumidor estão entre os desafios enfrentados (BATTISTI et al., 2017). Materiais naturais e seus derivados têm ganhado atenção significativa como matéria-prima alternativa e sustentável na substituição de derivados de petróleo para a produção de embalagens (SIRVIÖ et al., 2013).

Entre os sistemas que atendem a essas exigências, estão as embalagens ativas, cuja ideia principal é a adição de compostos ativos que possam proporcionar novas funções à embalagem, como por exemplo, impedir alterações químicas, físicas e biológicas durante o armazenamento e servir como barreira ao oxigênio, umidade e luz (KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018). Entre as embalagens que atendem a essa demanda estão as embalagens ativas antimicrobianas.

As embalagens antimicrobianas são aditivadas com substâncias que apresentam atividade antimicrobiana para micro-organismos responsáveis pela contaminação ou deterioração de alimentos e agem liberando estes compostos ativos na superfície dos alimentos embalados ou no ambiente circundante, preservando a qualidade do produto por mais tempo que as embalagens convencionais (BATTISTI et al., 2017; KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018). Diversos pesquisadores têm estudado acerca do desenvolvimento dessas embalagens, seja na obtenção de novos filmes poliméricos ou na utilização de aditivos naturais ou sintéticos, que atendam aos critérios necessários para enquadrá-la nos padrões de qualidade exigidos para os alimentos (ARAÚJO, 2014; MURIEL-GALET et al., 2015; JAVIDI; HOSSEINI; REZAEI, 2016; KHALEQUE et al., 2016; SIROCCHI et al., 2017; VAN HAUTE et al., 2017).

Embora os agentes ativos antimicrobianos possam ser de origem sintética ou natural, os sintéticos não são indicados pelos riscos de danos à saúde do consumidor. Desta forma, os óleos essenciais extraídos de plantas e especiarias têm se tornado aditivos naturais interessantes para a indústria de alimentos (VIUDA-MARTOS et al., 2010; ATARÉS; CHIRALT, 2016). Entre eles está o óleo essencial de tomilho, que

apresenta elevada atividade antimicrobiana (HOSSEINZADEH et al., 2015; EL-OBEID et al., 2018; VIACAVA et al., 2018).

Além do aditivo natural, a escolha do polímero deve ser considerada para o desenvolvimento de uma embalagem ativa. Visto que não prejudicam o meio ambiente com o acúmulo de resíduos provenientes de seu descarte, as embalagens desenvolvidas com materiais biodegradáveis têm se tornado atrativas comercialmente devido à maior atenção dada pela sociedade, que cada vez mais tem procurado manter hábitos de consumo consciente e sustentável. Desta forma, os polímeros biodegradáveis têm sido cada vez mais estudados para a produção de embalagens ativas (JAVIDI; HOSSEINI; REZAEI, 2016; SOUZA; SANTOS; VINHAS, 2016; BILBAO-SAINZ et al., 2017; LI et al., 2018).

Dentre a gama de polímeros biodegradáveis estudados pela comunidade científica, pode-se mencionar o amido, que possui vasta disponibilidade e baixo custo (SARTORI; MENEGALLI, 2016). O amido pode ser extraído de rizomas, como o amido de araruta, bem como de tubérculos, raízes e bulbos (ALVES; KLOSOSKI; MONTANHINI, 2015). Por outro lado, a aplicação de amido em filmes é limitada devido as suas propriedades mecânicas pobres e seu caráter hidrofílico (DAI et al., 2015). É possível encontrar na literatura trabalhos que utilizam outros polímeros naturais, como a quitosana, sendo adicionados ao amido para promover melhorias nas referidas propriedades (REN et al., 2017; KACZMAREK; SIONKOWSKA; SKOPINSKA-WISNIEWSKA, 2018; SURIYATEM; AURAS; RACHTANAPUN, 2018)

Diante desse contexto, o objetivo principal desse trabalho foi desenvolver um filme de amido de araruta/quitosana aditivado com óleo essencial de tomilho, que atenda aos requisitos de uma embalagem ativa antimicrobiana para o combate de espécies de micro-organismos comuns em alimentos. Foi avaliada ainda a influência do óleo essencial de tomilho nas propriedades mecânicas, térmicas e de permeabilidade dos filmes produzidos.

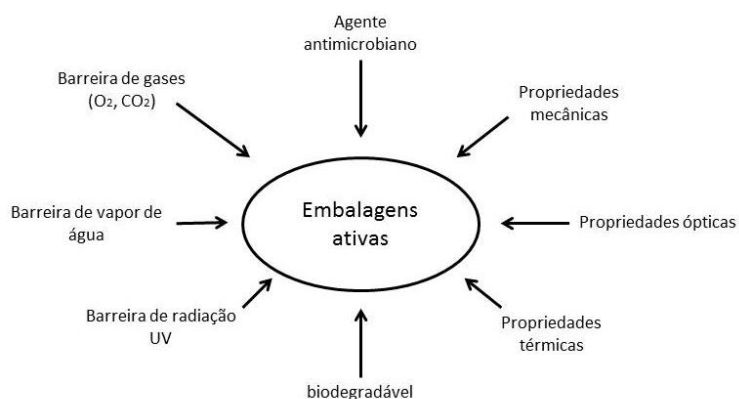
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EMBALAGENS ATIVAS

A comunidade científica, atendendo à demanda da indústria de alimentos e da sociedade, tem trabalhado há anos no desenvolvimento de novas embalagens que permitam estender o prazo de validade dos alimentos (DOMÍNGUEZ et al., 2018). As embalagens ativas são materiais utilizados para fins de acondicionamento e proteção de alimentos, que incorporam em suas formulações componentes que liberam ou absorvem substâncias no interior ou na superfície de alimentos. Podem ser divididas em dois grupos principais: *não migratório*, quando atua sem migração de componentes; e *embalagem de liberação ativa*, quando permite a migração controlada de compostos voláteis ou não voláteis no ambiente circundante na qual está o alimento ou na superfície do mesmo (KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018).

A embalagem ativa pode ser destinada a aplicações diversas, como impedir a perda ou a absorção de umidade (VEJDAN et al., 2016), funcionar como barreira de oxigênio (DILKES-HOFFMAN et al., 2018), radiação ultravioleta (VILELA et al., 2017), dióxido de carbono, compostos voláteis e contaminantes (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016), além de fornecer agentes aromatizantes, antioxidantes e antimicrobianos (RHIM; PARK; HA, 2013; AGRIOPOULOU, 2016). Um esquema, apresentado na Figura 1, mostra as aplicações de diferentes tipos de embalagens ativas e propriedades que a matriz polimérica deve atender para obter resultado satisfatório da embalagem.

Figura 1 – Propriedades necessárias em uma embalagem ativa



Fonte: Adaptado de Rhim; Park; Ha (2013).

Também é indispensável que a embalagem seja resistente para suportar possíveis danos provenientes de forças mecânicas (SUNG et al., 2013), bem como ter boas propriedades térmicas (LUZI et al., 2018) e ópticas (CRIZEL et al., 2018).

A função das embalagens ativas, além de proporcionar uma barreira a interferentes externos, age também na preservação e qualidade do alimento embalado, prolonga seu prazo de validade, mantendo suas características (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014). Para isso, tem-se dado maior atenção ao desenvolvimento de embalagens ativas com atividade antimicrobiana, que são embalagens aditivadas com substâncias capazes de inibir o crescimento de certas espécies microbianas. Na literatura, há diversos relatos sobre a capacidade dessas embalagens funcionarem na inibição de crescimentos microbianos e consequentemente manter o alimento mais seguro para o consumo (VAN LONG; JOLY; DANTIGNY, 2016; KREPKER et al., 2017; CHENWEI et al., 2018).

Riaz et al. (2018) desenvolveram filmes ativos à base de quitosana para embalagem de alimentos, incorporados com polifenóis de casca de maçã. Os testes de caracterização mostraram que a atividade antimicrobiana dos filmes aumentou em relação a uma amostra controle somente de quitosana, sendo a atividade mais efetiva contra bactérias Gram-positivas.

Cruz-Gálvez et al. (2018) investigaram o efeito antimicrobiano de filmes à base de amido de batata contendo extratos acetônicos e metanólicos de *Hibiscus sabdariffa* para embalagem de salsichas. A análise demonstrou que os filmes apresentaram atividade significativa contra a bactéria *L. monocytogenes* e a adição dos extratos ainda melhoraram as propriedades mecânicas e diminuíram a permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

A comunidade científica vem desenvolvendo vários métodos para obter embalagens ativas com atividade antimicrobiana eficiente, como incorporação de compostos antimicrobianos na estrutura dos polímeros, aplicação de revestimentos poliméricos com compostos antimicrobianos adsorvidos e aplicação de polímeros com atividade antimicrobiana, como a quitosana, agindo sozinho ou junto a compostos antimicrobianos (KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018). Os avanços nessa área se devem primariamente a busca por métodos eficazes de segurança alimentar, que se tornou uma prioridade global, devido aos riscos microbiológicos causados por

alimentos contaminados ou que naturalmente contém uma população aceitável de micro-organismos, cuja proliferação pode ocasionar alterações imperceptíveis que podem prejudicar a saúde do consumidor (REALINI; MARCOS, 2014).

Um exemplo de composto antimicrobiano que vem sendo bastante promissor no uso em embalagens ativas antimicrobianas são produtos naturais como os óleos essenciais. Na literatura é possível encontrar estudos relacionados à incorporação de óleos essenciais como agentes antimicrobianos em filmes para embalagem ativa, como o desenvolvido por Martucci et al. (2015), em que é adicionado óleo essencial de orégano e lavanda como aditivos antimicrobianos em filmes baseados em gelatina.

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são líquidos lipofílicos que contém diversos componentes naturais biologicamente ativos, extraídos de diferentes partes de plantas como as raízes, flores, sementes, cascas, folhas, frutos ou da planta inteira (KHORSHIDIAN et al., 2018). A composição química dos óleos essenciais variam de acordo com o desenvolvimento da planta, o método de extração, a localização geográfica e características do clima e do solo (GENDE et al., 2010).

Os óleos essenciais têm propriedades reconhecidas, funcionando como agentes antimicrobianos (KHORSHIDIAN et al., 2018) e antioxidantes (BONILLA et al., 2018). Essas propriedades são atribuídas ao seu alto teor de compostos terpênicos como o cimeno, carvacrol, timol e eugenol (MARTUCCI et al., 2015).

O perfil hidrofóbico dos óleos essenciais permite interagir com os lipídeos da membrana celular microbiana, tornando as estruturas menos organizadas e desta forma, mais permeáveis, permitindo a saída de íons, moléculas vitais e outros conteúdos celulares, causando a morte celular (KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018). Normalmente, os óleos essenciais apresentam inibições maiores contra bactérias Gram-positivas do que nas Gram-negativas, que possuem uma barreira lipopolissacarídica na sua membrana externa (TECHATHUVANAN et al., 2014).

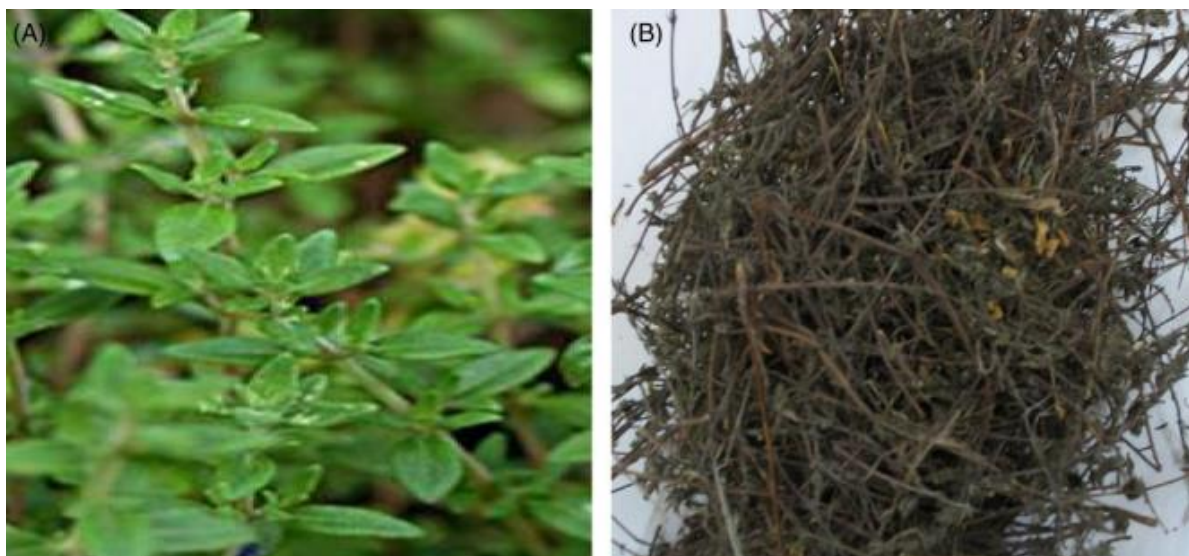
Em busca de agentes antimicrobianos cada vez mais efetivos, surge a atenção aos estudos com o óleo essencial de tomilho. Este óleo essencial é composto principalmente por timol e carvacrol, compostos fenólicos com alta atividade antimicrobiana e antioxidante (MARTUCCI et al., 2015).

2.2.1 Óleo essencial de tomilho

O tomilho (*Thymus vulgaris*), pertencente à família Lamiaceae, é cultivado em várias partes do mundo, principalmente em locais de clima mediterrâneo (FERREIRA et al., 2016). Sua planta cresce de 15 a 30 cm formando arbustos perenes com caules que tornam-se mais secos quanto maior for sua idade (HOSSEINZADEH et al., 2015). O tomilho (Figura 2) é cultivado para fins comerciais com o objetivo de usar suas folhas para tempero e para a extração de óleo essencial, extratos e oleorresinas, geralmente por destilação a vapor (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2012; HOSSEINZADEH et al., 2015).

Ensaio de caracterização química mostraram a presença de diferentes compostos nesta planta, como flavonoides, taninos, saponinas (QUEIROZ et al., 2012; WALENTOWSKA; FLACZYK, 2013) e altas concentrações de compostos fenólicos, incluindo o timol, carvacrol, cimeno, linalol e pineno (KOMAKI et al., 2015).

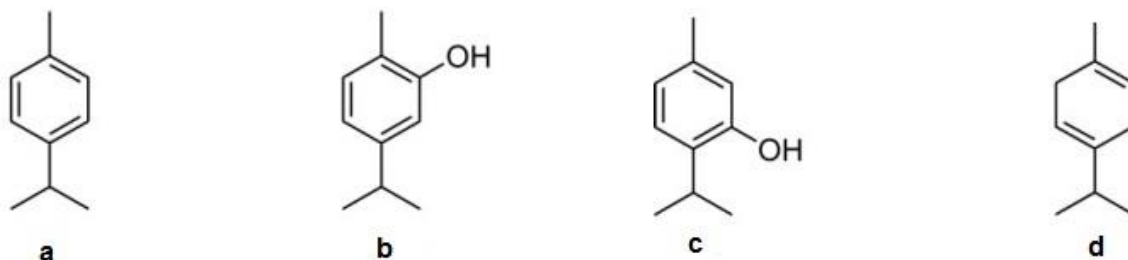
Figura 2 – Tomilho (*Thymus vulgaris*): planta (a) e ramos secos (b)



Fonte: Kuete (2017)

O tomilho seco possui entre 1 a 2,5% de óleo essencial, que tem sido usado em ampla escala como tempero culinário e para fins farmacológicos e como agente antimicrobiano e antioxidante (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2012; HOSSEINZADEH et al., 2015). O tomilho é rico em compostos conhecidos por sua atividade antimicrobiana, como o timol, carvacrol, terpineno e cimeno (NABAVI et al., 2015). As estruturas químicas desses compostos são apresentadas na Figura 3.

Figura 3 – Principais componentes do tomilho: p-cimeno (a), carvacrol (b), timol (c) e γ -terpineno (d)



Fonte: Adaptado de Navabi et al. (2015)

O timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um composto sólido branco e cristalino em sua forma pura, encontrado como componente do óleo essencial e extrato de tomilho, sendo responsável por seu odor característico (WATTANASATCHA; RENGPIPAT; WANICHWECHARUNGRUANG, 2012). O timol é um derivado monoterpênico do cimeno e isômero do carvacrol. Relatos na literatura apontam suas propriedades como antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório (GALLUCCI et al., 2006; NABAVI et al., 2015).

O *p*-cimeno é um hidrocarboneto aromático alquil-substituído cuja estrutura é formada por um anel benzênico substituído com um grupo metil e um grupo isopropil. A depender da origem e condições de cultivo do tomilho, pode ser obtido na forma de seus isômeros *o*-cimeno e *m*-cimeno (ROMANENKO; TKACHEV, 2006). Conhecido como um dos mais importantes agentes antibacterianos presentes na composição do tomilho, o cimeno é precursor do carvacrol (NABAVI et al., 2015).

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um fenol monoterpênico encontrado em algumas espécies de plantas como o tomilho, orégano e a bergamota silvestre (SINGH; CHITTENDEN, 2010). Este composto tem sido usado como aditivo alimentar e para prevenção da contaminação e crescimento microbiano devido a sua ação protetora contra bactérias e fungos (ALTINTAS et al., 2013). Quando a membrana citoplasmática da bactéria interage com o carvacrol, ela perde elétron para o grupo hidroxila livre do carvacrol, causando a destruição da camada lipídica da membrana e consequente morte celular devido ao vazamento do conteúdo intracelular da bactéria (DE SOUSA et al., 2012).

Os terpinenos são hidrocarbonetos isoméricos que se diferenciam pela localização das suas ligações duplas de carbono-carbono. O γ -terpineno é encontrado em plantas e é um dos principais componentes do óleo essencial de

tomilho, com potentes atividades antioxidantes e antibacterianas (HAZZIT et al., 2009; NABAVI et al., 2015).

Devido aos seus componentes ativos, o óleo essencial de tomilho vem sendo utilizado no desenvolvimento de novas embalagens ativas antimicrobianas. Sapper et al. (2018) desenvolveram filmes de amido e gelatina incorporados com óleo essencial de tomilho como agente antifúngico. O biofilme formado foi efetivo contra fungos *Botryotinia fuckeliana*, que causam a “podridão cinzenta” em vegetais.

Emiroglu et al. (2010) investigaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de tomilho em filmes comestíveis a base de proteína de soja para conservação de rissóis frescos de carne moída. O filme apresentou efetiva atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e redução na contagem de *Pseudomonas spp.* e coliformes na carne embalada e conservada sob refrigeração a 4°C.

Hosseini, Razavi e Mousavi (2009) verificaram a propriedade antimicrobiana de filmes baseados em quitosana incorporados ao óleo essencial de tomilho, óleo essencial de alho e óleo essencial de canela. Embora os três óleos testados apresentem potencial antimicrobiano quando incorporados ao filme, o óleo essencial de tomilho destacou-se por apresentar maior eficácia contra bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis* bem como agiu como inibidor parcial do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, frequentemente responsáveis pela contaminação de alimentos estocados em baixas temperaturas.

O óleo essencial de tomilho tem se mostrado promissor como agente antimicrobiano em embalagens ativas para conservação de alimentos. Incorporado a filmes feitos de polissacarídeos, como os obtidos a partir de amido (LUCHESE; SPADA; TESSARO, 2017), ou de blendas biopoliméricas, é possível produzir embalagens ativas que atendam às necessidades da indústria e da sociedade obtendo um material biodegradável e que atua no armazenamento e como conservante de alimentos.

2.3 AMIDO

O amido é o principal carboidrato de reserva dos vegetais e o segundo polímero de maior abundância na terra, perdendo apenas da celulose (ELIASSON, 2004). A Legislação Brasileira considera o amido como o “produto amiláceo extraído das partes

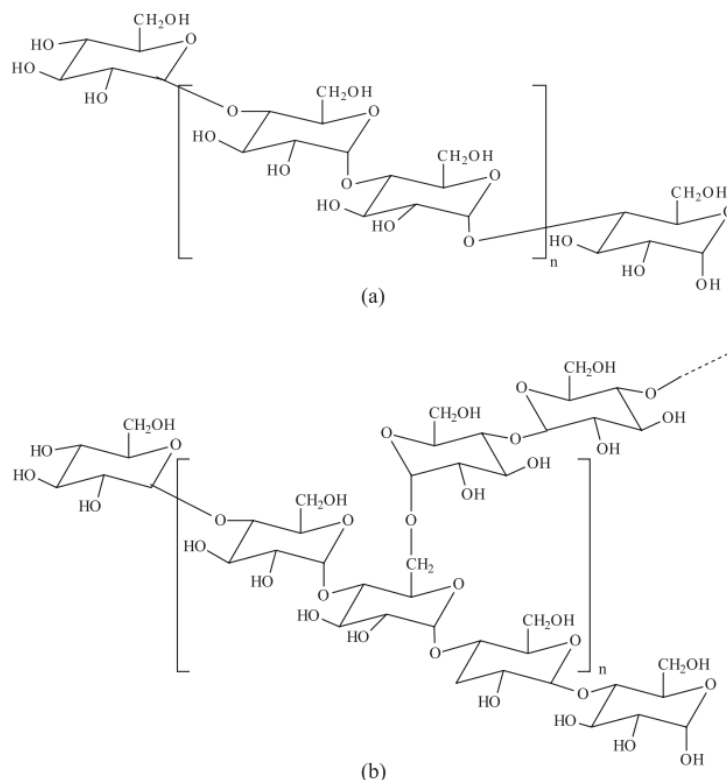
aéreas comestíveis dos vegetais” e a fécula como “produto amiláceo extraído das partes subterrâneas comestíveis dos vegetais” (ANVISA, 1978). Embora, em termos de propriedades gerais, os mesmos sejam chamados apenas de amido, e em geral, podem ser encontrados em tubérculos, raízes, rizomas e bulbos (ALVES; KLOSOSKI; MONTANHINI, 2015).

O amido é um polissacarídeo de origem natural e biodegradável, de larga disponibilidade e fácil obtenção, com propriedades químicas semelhantes independentemente da sua origem. Armazenados nos vegetais na forma de grânulos, possui caráter parcialmente cristalino ou semicristalino, com graus de cristalinidade entre 20 e 45%, determinados pela sua organização molecular (WHISTLER; BEMILLER; PASCHAL, 1984).

O amido é formado por dois polímeros (Figura 4) - a amilose, de cadeia linear formada por unidades de D-glicose ligadas por ligações α -(1 \rightarrow 4) com grau de polimerização 200 a 3000, e a amilopectina, de cadeia ramificada, com unidades de D-glicose ligadas por ligações α -(1 \rightarrow 4) e ramificações por α -(1 \rightarrow 6) – cuja variação nas proporções destes componentes nas estruturas formam grânulos de amido com propriedades diferentes (ELLIS et al., 1998; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Os grânulos de amido são birrefringentes e apresentam forma de cruz de malta quando observados sob luz polarizada. A amilose e a amilopectina estão presentes no grânulo de forma relativamente ordenada, sendo as áreas mais ordenadas formadas em sua maioria por cadeias curtas de amilopectina, originando a região cristalina e as áreas menos ordenadas formadas de amilose, constituindo uma região amorfa (CAVALLINI; FRANCO, 2010).

Figura 4 – Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b)



Fonte: Corradini et al. (2005)

Suas diferentes ordenações estruturais definem a cristalinidade, sendo a orientação radial do eixo principal das cadeias lineares de amilopectina responsáveis pela formação de zonas cristalinas nos grânulos (VILLAR et al., 2017). As regiões cristalinas dos grânulos proporcionam diferentes padrões de cristalinidade de acordo com a intensidade e posição de alguns picos de difração de raios X (DRX), variando de acordo com as diferentes fontes botânicas do amido (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). São definidos três padrões diferentes de DRX mensurados em ângulo 2θ de acordo com a cristalinidade dos grânulos (WANG; SHARP; COPELAND, 2011). São estes: padrão A, característicos de amido de cereais, com picos aproximadamente em 15° , 17° , 18° , 20° e 23° ; padrão B, comuns na maioria dos amidos provenientes de tubérculos e raízes, com picos aproximadamente em 5° , 15° , 17° , 20° , 22° e 24° e padrão C, um padrão intermediário entre A e B, característico de amido de leguminosas, frutas e caules, que pode ainda ser dividido em C_a e C_b , de acordo com a proximidade dos picos de DRX aos padrões A e B (KIM; REN; SHIN, 2013).

O amido tem sido estudado massivamente para o desenvolvimento de biofilmes por ser um material abundante, biodegradável e barato, além de ser comestível e desta forma, adequado para ser utilizado como embalagem ou revestimento comestível para alimentos (MORENO et al., 2018). Para a obtenção destas embalagens, uma solução filmogênica é preparada para a modificação do amido através do processo de gelatinização (REDDY et al., 2014).

2.3.1 Gelatinização e retrogradação do amido

A transição de fase dos grânulos de amido do estado ordenado para o estado desordenado sob aquecimento do amido na presença de água é chamada de gelatinização (ŠUBARIĆ et al., 2011). Neste processo ocorre o inchamento dos grânulos e a interrupção da sua organização cristalina, seguida da liberação da amilose presente no interior dos grânulos do amido, formando uma fase gel e consequente aumento da viscosidade (COPELAND et al., 2009). A penetração de água associada ao afastamento das cadeias de amido aumenta a aleatoriedade e diminui a cristalinidade dos grânulos (SARKA; DVORACEK, 2017). A temperatura de gelatinização do amido varia conforme sua origem botânica, embora a maioria se encontre na faixa entre 60 e 80°C (COPELAND et al., 2009).

O esfriamento do gel de amido resulta na formação de uma estrutura parcialmente cristalina, de difícil digestão por enzimas e não solúvel, com estrutura diferente da inicial; a este processo se dá o nome de retrogradação (QUIROGA, 2015). No processo de gelatinização e retrogradação de soluções filmogênicas, o uso de água como solvente forma biofilmes frágeis, sendo indicada a utilização de plastificantes.

Os plastificantes aumentam a flexibilidade dos filmes pela redução das interações moleculares adjacentes, sendo importante para a sua aplicação, verificar a proporção a ser utilizada e a sua compatibilidade com o polímero (ROCHA et al., 2014). Os componentes mais apropriados para utilização em filmes de amido, para que proporcionem o aperfeiçoamento nas propriedades mecânicas destes materiais, são os formados por polióis, a exemplo do glicerol e sorbitol (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

O glicerol é um plastificante hidrofílico extensamente utilizado na produção de biofilmes devido a sua interação com as cadeias do amido, aumentando a mobilidade molecular, a afinidade com a água e a flexibilidade dos filmes biodegradáveis (REIS et al., 2013). Sua utilização na concentração de 30% (m/m) é adequada para a otimização de filmes de amido em relação às propriedades mecânicas, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (ROCHA et al., 2014).

2.4 ARARUTA

Os rizomas de araruta (Figura 5), de nome científico *Maranta arundinacea*, são fontes de amido não convencional, pertencente à família Marantaceae e encontrada na floresta tropical, sendo cultivada especialmente nas Índias Ocidentais, Austrália, Sudeste Asiático e África do Leste e do Sul (CHARLES et al., 2016), bem como na América Latina (WU; LIAO, 2017), o que inclui o Brasil, onde predominam três cultivos diferentes (NOGUEIRA; FAKHOURI; OLIVEIRA, 2018). O amido da araruta é extraído dos rizomas após serem triturados e peneirados; em seguida, a massa fibrosa é lavada para separar a fibra do amido que, após decantar, será seco e peneirado (NEVES; COELHO; ALMEIDA, 2005).

Figura 5 – Araruta



Fonte: Ministério da Saúde (2015)

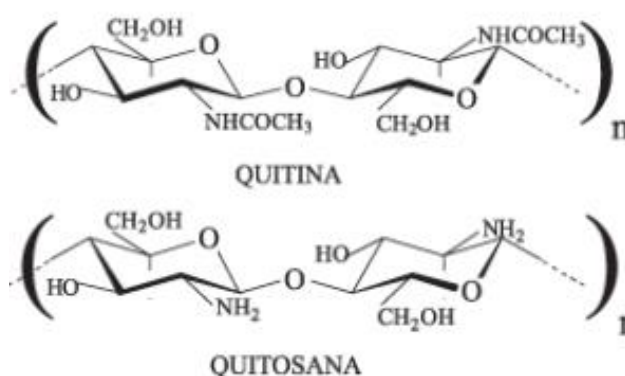
O amido extraído da araruta tem excelente digestibilidade (JYOTHI; SAJEEV; SREEKUMAR, 2011; VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016), boa capacidade de gelatinização a temperatura elevada, na faixa de 61 a 85,8°C (HOOVER, 2001), propriedades físico-químicas características, como o seu alto teor de amilose, que pode variar de 16% a 27% e apresenta padrão de difração de raios X do tipo B ou C (PEPE et al., 2016; GUTIÉRREZ et al., 2018; NOGUEIRA; FAKHOURI; OLIVEIRA, 2018).

Na literatura, são encontrados poucos trabalhos sobre o desenvolvimento de embalagens utilizando o amido de araruta como matriz polimérica. A maioria dos relatos são recentes e apresentam resultados promissores. Nogueira, Fakhouri e Oliveira (2018) extraíram o amido de araruta e o utilizaram como matriz para o desenvolvimento de revestimentos comestíveis. Os filmes obtidos foram homogêneos, transparentes e inodoros, apresentando maior solubilidade com o aumento das concentrações de amido e glicerol, este último usado como plastificante. A araruta, portanto, é uma fonte promissora de amido para aplicação em filmes biodegradáveis para aplicação em embalagens de alimentos.

2.5 QUITOSANA

A quitosana é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, composta de unidades de $\beta(1-4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e $\beta(1-4)$ -2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose e obtida através da desacetilação da quitina. Em escala industrial, a maior parcela de isolamento da quitosana é proveniente da quitina presente no exoesqueleto de crustáceos, a exemplo do camarão (ALMEIDA et al., 2015). A estrutura química da quitina e da quitosana está representada na Figura 6.

Figura 6 – Estrutura química da quitina e quitosana



Fonte: Battisti; Campana-Filho (2008)

Enquanto a quitina é insolúvel em solução aquosa de ácido acético 1% (v/v), a quitosana apresenta-se solúvel depois de prolongada agitação e aquecimento (JANEGITZ et al., 2007; LOPES et al., 2017). Na verdade, a solubilidade da quitosana é um parâmetro difícil de ser quantificado, pois está relacionada a diversos fatores

como o grau de desacetilação, pH, natureza do ácido usado para solubilização e ainda depende das condições de extração e secagem (AZEVEDO et al., 2007).

A quitosana tem se destacado entre os polímeros de origem natural, sendo usada em larga escala na produção de filmes e embalagens ativas, inclusive a nível industrial, devido as suas propriedades como biodegradabilidade, biofuncionalidade, biocompatibilidade, não-toxicidade, boa capacidade de formação de filme, elevada resistência mecânica, capacidade de barreira e atividade antimicrobiana (CRIZEL et al., 2018; HOMEZ-JARA et al., 2018).

A atividade antimicrobiana da quitosana deve-se a um mecanismo de ação relacionado com a mudança na permeabilidade celular promovida pela quitosana e nas características da superfície da parede celular bacteriana (YOUNES et al., 2014; ARANCIBIA et al., 2015). Os grupos amino da quitosana, carregados positivamente, interagem com as membranas celulares microbianas carregadas negativamente, resultando no vazamento de componentes proteínicos e intracelulares dos micro-organismos (RÂPĂ et al., 2016).

A quitosana tem sido utilizada na produção de filmes para embalagens ativas, devido as suas propriedades físico-químicas e antimicrobianas, principalmente no desenvolvimento de embalagens para preservar a qualidade de frutas, carnes e queijos (MEI et al., 2013; DEHNAD et al., 2014; GARDESH et al., 2016; KAYA et al., 2016).

Homez-Jara et al. (2018) desenvolveram filmes comestíveis de quitosana e avaliaram suas propriedades nas diferentes concentrações do polímero e em diferentes temperaturas de secagem. Os autores constataram que o uso de baixas temperaturas de secagem contribuiu para obter melhores propriedades ópticas, mecânicas e de barreira e obtiveram filmes homogêneos comestíveis em concentrações diferentes de quitosana, mostrando que o polímero é uma matriz promissora para produzir filmes com as características desejáveis em uma embalagem para alimentos.

2.6 BLENDA POLIMÉRICAS

As blendas poliméricas são conhecidas por ser um eficiente método para modificar as propriedades de polímeros e formar novos produtos, sem a necessidade de envolver reações químicas (MENDES et al., 2017). O desenvolvimento de blendas, que consiste na mistura de dois ou mais polímeros, também é viável economicamente, visto que sintetizar novos polímeros com características específicas resulta num processo de elevado custo (QUENTAL et al., 2010).

A mistura de polímeros pode formar soluções filmogênicas com propriedades físico-químicas alteradas, resultando em filmes com características diferentes do que os produzidos por um só polímero (AHMED; IKRAM, 2016). Essas modificações ocorrem devido a compatibilidade ou incompatibilidade entre os polímeros e dependem de sua estrutura química, grau de acidez, massa molecular, capacidade de hidratação, entre outras propriedades (MALAFAYA; SILVA; REIS, 2007).

Uma blenda é miscível quando forma uma mistura homogênea, de fase única, com características que dependem da composição dos polímeros e de fatores externos, como por exemplo a temperatura e pressão. É importante enfatizar que a maioria das blendas são imiscíveis, ou seja, formam misturas heterogêneas, neste caso, a utilização de compatibilizantes é necessária (QUENTAL et al., 2010). Estas substâncias atuam reduzindo a tensão interfacial entre os polímeros que se deseja formar a blenda, auxiliando na dispersão de uma fase na outra (ITO et al., 2004).

Em biofilmes baseados em amido, a adição de um outro polímero é uma estratégia sugerida para melhorar suas propriedades (TALÓN et al., 2017). Bonilla et al. (2013) mostraram que a substituição parcial do amido de trigo por quitosana em filmes biopoliméricos tiveram suas propriedades mecânicas melhoradas ao mesmo tempo que os filmes adquiriram o efeito antimicrobiano.

Entretanto, nas bases de dados pesquisadas não foram encontrados na literatura trabalhos publicados sobre o desenvolvimento e caracterização de filmes de amido de araruta/quitosana incorporados ao óleo essencial de tomilho. Desta forma, a pesquisa relatada nesta dissertação possui caráter inédito ao avaliar o efeito da incorporação do óleo essencial de tomilho nas propriedades físicas, térmicas, de permeabilidade e antimicrobiana dos filmes de amido de araruta/quitosana, propostos para uso como embalagens ativas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

O amido de araruta foi obtido do fornecedor Araruta da Bahia. Nos resultados, o amido de araruta será denominado apenas como “amido”. Foi utilizado glicerol da marca Química Moderna e Quitosana de médio peso molecular com 85% de desacetilação da marca Sigma Aldrich. Utilizou-se ainda solução de ácido acético 1% v/v, óleo essencial de tomilho branco da marca Lazlo e água destilada. Todas as matérias-primas foram utilizadas como vendidas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Caracterização do óleo essencial de tomilho

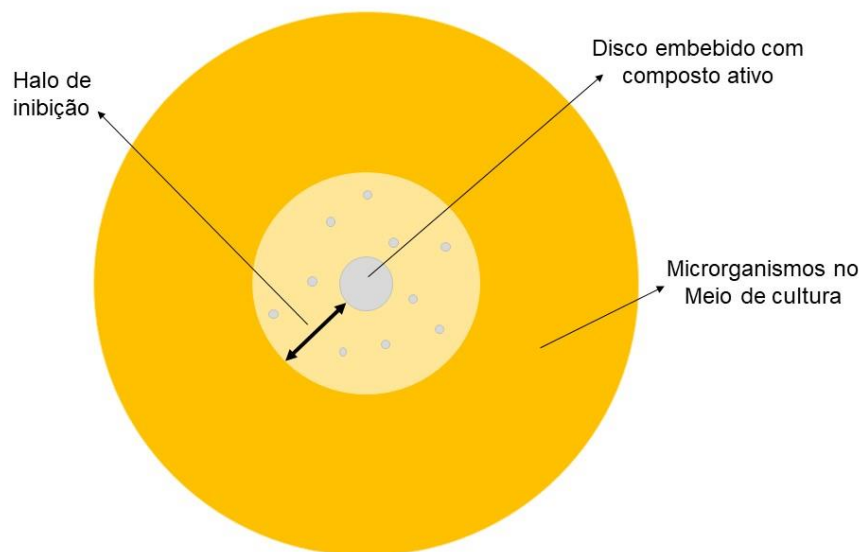
3.2.1.1 *Cromatografia Gasosa Acoplada com Espectrometria de Massas (GC-MS)*

Para a realização desta técnica utilizou-se o cromatógrafo gasoso modelo Trace 1300 acoplado com espectrômetro de massa modelo ISQ Single Quadrupole, ambos da marca ThermoScientific. A temperatura do injetor foi de 220°C, temperatura do detector a 240°C, velocidade linear de 46,3 cm/seg, razão de split de 20 e fluxo total de 36,8 mL/min. O programa de temperatura foi de 60°C/min, razão de aquecimento de 6°C/min até 100°C, com razão de 14°C/min até 240°C e tempo de análise total de 18,1 min.

3.2.1.2 *Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho pelo método do disco-difusão em ágar*

Para realizar a avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho, utilizaram-se culturas jovens das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para o ensaio pelo método disco-difusão em meio sólido (Figura 7), utilizou-se 4 discos de papel filtro previamente esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos, sendo 2 discos por bactéria, cada um com 5,2 mm de diâmetro. Os discos foram embebidos em óleo essencial de tomilho e colocados em placas de Petri previamente inoculadas com 0,1 mL de suspensão bacteriana (10^{-4} na escala MacFarland) em meio ágar nutritivo. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa por 48 horas a 30°C. Após este período, realizou-se a medida do halo de inibição com auxílio de um micrômetro.

Figura 7 – Modelo de ensaio de atividade antimicrobiana pelo método disco-difusão em ágar



Fonte: O autor

3.2.2 Preparação dos filmes poliméricos

Os filmes foram produzidos pelo método de evaporação do solvente (*solution casting*). Na preparação dos filmes foram utilizados: fécula de araruta, solução de quitosana, glicerol como plastificante, óleo essencial de tomilho e água destilada.

A solução de quitosana foi preparada com a dispersão de 1g de quitosana em 100 mL de ácido acético (1% v/v), sob agitação mecânica até completa solubilização.

Produziram-se soluções filmogênicas de 90g, de acordo com as seguintes composições: 8% m/m de amido de araruta, 50 mL de solução de quitosana, 30% m/m de glicerol e 2,5%, 5% e 10% de óleo essencial de tomilho (OET), sendo que as concentrações de glicerol e óleo essencial foram calculadas em relação a massa de amido.

Para o preparo das soluções filmogênicas, foram homogeneizados o amido, a solução de quitosana e o glicerol em água destilada. Em seguida, foram levados para agitação com auxílio de um *mixer* a 1.000 rpm, sob aquecimento em banho-maria a 90°C durante 9 minutos, com o objetivo de induzir a gelatinização do amido (Figura 8).

Figura 8 – Preparo do filme em banho maria sob agitação

Fonte: O autor

A incorporação do OET ocorreu após a gelatinização do amido. Pesou-se a massa de óleo correspondente em um béquer e a adicionou a solução filmogênica, lavando o béquer com cerca de 1 mL de água destilada. Manteve-se a solução filmogênica sob agitação por mais 1 minuto após a adição do óleo essencial. A Tabela 1 apresenta as massas relativas a cada componente dos filmes poliméricos.

Tabela 1 – Composição dos filmes poliméricos

Biofilme*	Amido (g)	Quitosana (g)	Glicerol (g)	Água (mL)	Óleo (g)
AQP	6,7	0,5	2,16	30,64	-
AQ02	6,7	0,5	2,16	30,64	0,18
AQ05	6,7	0,5	2,16	30,64	0,36
AQ10	6,7	0,5	2,16	30,64	0,72

*Amido/quitosana puro (AQP), amido/quitosana com 2,5% de óleo essencial de tomilho (AQ02), amido/quitosana com 5% de óleo essencial de tomilho (AQ05) e amido/quitosana com 10% de óleo essencial de tomilho (AQ10).

Fonte: O Autor

Posteriormente, a solução filmogênica foi levada para um dessecador acoplado com bomba a vácuo por 5 minutos, para retirada de bolhas (Figura 9). Por fim, foi vertida em filmes de polipropileno sobre placa de vidro e levadas para secagem em estufa de circulação de ar a 40°C durante 3 horas.

Figura 9 – Solução filmogênica em dessecador com bomba à vácuo



Fonte: O autor

3.2.3 Caracterização dos filmes poliméricos

3.2.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os filmes de amido/quitosana, tanto o puro quanto adicionados de 2,5%, 5% e 10% de óleo essencial de tomilho, foram analisados pela técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier para a análise da presença dos grupos funcionais dos compostos orgânicos presentes e para verificar a incorporação do óleo essencial de tomilho ao filme. O equipamento utilizado, de marca Jasco, modelo FT/IR-4600 type A está localizado no laboratório do Grupo de Instrumentação e Análises Químicas (GIAQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Serra Talhada. Foram utilizadas as seguintes condições: região do infravermelho na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} com 16 scans e acessório ATR.

3.2.3.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) foi associada a espectroscopia de infravermelho para investigar a incorporação do óleo essencial de tomilho nos filmes poliméricos. Foram realizadas leituras espectroscópicas em um filme de cada concentração (filmes de amido/quitosana puro e aditivados com 2,5, 5 e 10% de óleo essencial), sendo analisado em cinco pontos distintos de cada filme para obtenção do

modelo PCA. Desta forma, obteve-se através do software de análise de dados multivariados *The Unscrambler* uma matriz de dados multivariados com 20 espectros, sendo 5 para cada concentração dos filmes.

3.2.3.3 Difratometria de Raios-X (DRX)

Os ensaios foram realizados em um difratômetro de raios X da marca Rigaku, modelo Ultima, operando com tensão de 40 kV e corrente de 20 mA, com velocidade do goniômetro de $2\theta = 2$ graus/minuto, alcance angular de 5° a 50° (E) e com passo de $0,02^\circ$, conforme metodologia de Bet et al. (2018). Essa análise foi realizada no Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).

O cálculo da cristalinidade dos filmes foi efetuado pelo método de Separação Simples de Área, que prevê a subtração da área referente a parte amorfa da área total do difratograma (CAROLINO, 2017). Tanto para a fase cristalina quanto para a fase não cristalina, a densidade de elétrons significativa é aproximadamente a mesma, sendo possível distingui-las a partir do pressuposto de que a intensidade da dispersão cristalina está concentrada na área dos picos mais estreitos enquanto a dispersão não cristalina encontra-se na região difusa (STERN; SEGERMAN, 1968). Desta forma, utilizando o software *Origin Pro*, separou-se a integral da área das regiões cristalina e amorfa no intervalo de difração medido a 2θ . Em seguida, estimou-se o percentual de cristalinidade através da equação:

$$Cr = 100 \frac{A_c}{A_c + A_a} \quad \text{Equação 1.}$$

Onde Cr é o percentual de cristalinidade estimado, A_c é a área cristalina e A_a é a área amorfa.

3.2.3.4 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes de amido de araruta e quitosana puro e nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% de óleo essencial de tomilho foram determinados através do método gravimétrico padrão E96-95 da American Society for Testing and Materials (ASTM INTERNATIONAL, 2014), conforme descrito por FRÁGUAS et al. (2015), utilizando-se um gradiente de 75% de umidade relativa (UR)

a 25°C. A PVA foi medida em triplicata para cada uma das formulações dos filmes produzidos.

Para a realização da análise de PVA, preparou-se uma solução de cloreto de sódio (75% de UR) e a adicionou ao dessecador. Em seguida, foram utilizados 12 frascos de 30mL (3 por amostra) em que se adicionou Cloreto de Cálcio (CaCl_2) deixando um espaço de 1,5 cm entre o filme e o dessecante. Os recipientes foram dispostos no dessecador e foi efetuado o vácuo. Durante 8 dias as amostras foram retiradas e pesadas, e sempre que devolvidas ao dessecador, um novo vácuo era realizado.

A permeabilidade ao vapor de água foi calculada pela equação:

$$\text{WVP} = \frac{\Delta m}{A \Delta t} \frac{X}{\Delta P} \quad \text{Equação 2.}$$

Onde WVP é a permeabilidade ao vapor de água, $\Delta m/\Delta t$ é o peso do ganho de umidade por unidade de tempo (g/s), X é a espessura média do filme (mm), A é a área da superfície do filme exposta (m^2) e ΔP é a diferença de pressão do vapor de água entre os dois lados do filme (Pa).

3.2.3.5 *Análise Termogravimétrica*

Os filmes de amido e quitosana puro e aditivado com OET nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% foram analisados por análise termogravimétrica (TGA), afim de avaliar as taxas de perda de massa. Foram pesados aproximadamente 20mg de cada amostra, que foram introduzidas em uma termobalança da marca Shimadzu DTG 60H. As análises foram realizadas a uma faixa de temperatura de 25 a 600°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

3.2.3.6 *Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)*

Os parâmetros térmicos dos filmes de amido/quitosana puro e aditivado com 2,5%, 5% e 10% de óleo essencial de tomilho foram avaliados pela técnica de Calorimetria Diferencial Exploratória no equipamento da marca Mettler Toledo modelo 1 Star^e System (Figura 10).

Figura 10 – Equipamento de DSC, modelo 1 Star® System.



Fonte: O autor

A massa das amostras variou de 6,3 a 8,1mg. As amostras foram introduzidas em cadinhos de alumínio sobre atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. A análise térmica foi realizada utilizando uma faixa de temperatura de 25 a 200°C.

3.2.3.7 Ensaio de Tração

O teste mecânico de tração foi realizado utilizando o equipamento universal apresentado na Figura 11, da marca EMIC 500. O experimento foi realizado seguindo a norma da ASTM 882-12 (ASTM INTERNATIONAL, 2012), na temperatura ambiente e sem controle de umidade.

Utilizaram-se os seguintes parâmetros para execução do teste:

- Velocidade da garra: 0,8 mm/seg;
- Distância inicial entre as garras: 40 mm;
- Dimensão do corpo de prova de 2,5 x 7,5 cm.

O ensaio de tração foi realizado com os filmes de amido/quitosana puro e com os aditivados com o OET. Utilizou-se um filme de cada formulação, e para cada filme foram ensaiados seis corpos de prova. O teste estatístico de Duncan foi aplicado aos resultados para avaliar as mudanças estatisticamente significativas.

Figura 11 – Equipamento de ensaio de tração EMIC.



Fonte: O autor

3.2.3.8 Análise da atividade antimicrobiana

Para a análise de atividade antimicrobiana dos filmes, utilizou-se uma matriz alimentícia de queijo muçarela obtido comercialmente e amostras do filme aditivado com 2,5% de óleo essencial. As amostras tinham área de 4x4cm e espessura de 2,2 mm.

A técnica foi realizada conforme metodologia do ensaio de atividade antimicrobiana *in situ* descrita por Dannenberg et al. (2017). As amostras dos filmes foram primeiramente expostas à luz ultravioleta por 15 minutos em ambos os lados. Em seguida, as amostras de queijo foram inoculadas em um dos lados com 0,1 mL de suspensão bacteriana (0,5 na escala de MacFarland) de *E. coli*. Posteriormente, as amostras do filme foram colocadas em contato com o queijo, sobre o seu lado contaminado. Após esse procedimento, as amostras foram dispostas em sacos previamente expostos a luz ultravioleta e armazenados a 4°C.

A quantificação de *E. coli* foi feita utilizando o método de contagem de células viáveis. Para obtenção da contagem bacteriana no queijo, as amostras inoculadas referentes aos dias a serem analisados foram lavadas com 9 mL de solução peptonada e posteriormente, 1 mL desta solução de lavagem foi retirada para preparar

suspensões em série de dez diluições em solução de peptona (0,1%). Em placas de Petri de tamanho 80x15 mm e numeradas conforme sua diluição, foi adicionado 1 mL de cada suspensão e em seguida, adicionou-se o ágar nutritivo. Este processo foi realizado em duplicata e as placas de Petri foram incubadas durante 48 horas em estufa a 35°C. O procedimento foi realizado no intervalo de 0, 3, 6, 9 e 13 dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO

4.1.1 Cromatografia Gasosa Acoplada com Espectrometria de Massas (GC-MS)

Para investigar a composição química do óleo essencial de tomilho, realizou-se a caracterização pela técnica de GC-MS. Contudo, o principal interesse desta análise foi conhecer os compostos majoritários do OET e suas respectivas proporções na amostra. Os principais componentes estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do óleo essencial de tomilho obtida por CG-MS

Composto	(%)
Cimeno	52,16%
Timol	28,21%
Carvacrol	13,26%
Canfeno	2,64%
α -Terpineol	1,29%
Outros compostos	2,44%

Fonte: O autor

Com os resultados da análise por CG-MS, é possível perceber a presença do cimeno, timol e carvacrol como componentes majoritários do OET, concordando com a literatura (SADEKUZZAMAN et al., 2018). Estes resultados também concordam com o estudo de (BURT, 2004), que estabelece as faixas de composição encontradas no óleo essencial de tomilho referente ao timol (10-64%) e cimeno (10-56%). Outros trabalhos também apontam o cimeno, timol e carvacrol como principais componentes do OET, mas em proporções diferentes das encontradas neste trabalho. Pirbalouti, Hashemi e Ghahfarokhi (2013) encontraram 35,51% de timol, 8,47% de cimeno e 6,87% de carvacrol no óleo de tomilho, enquanto Schött et al. (2017) observou 37,7% de timol, 7,5% de cimeno e 5,0% de carvacrol.

Esta diferença na concentração dos componentes majoritários no OET se deve aos fatores genéticos e condições ambientais (GONÇALVES et al., 2017), bem como podem ter relação com a variação sazonal, de umidade e temperatura do cultivo do tomilho, como também do processo de extração do óleo (LEMONS et al., 2017).

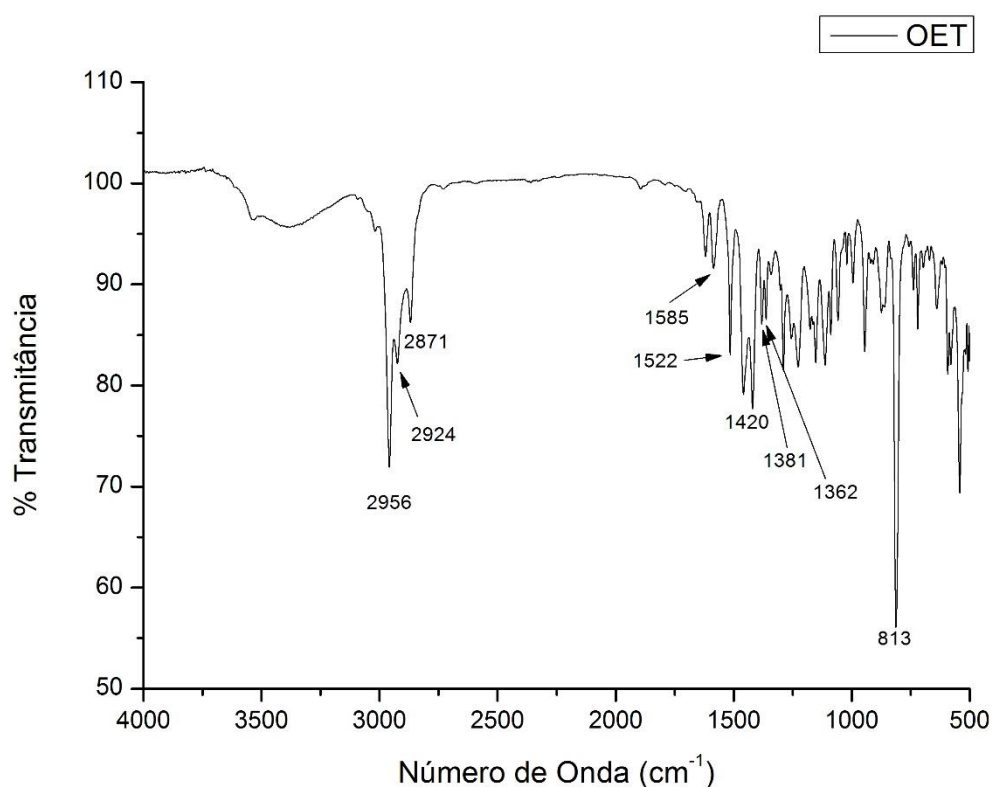
Portanto, pode-se verificar por CG-MS que o óleo essencial de tomilho analisado possui os principais componentes apresentados na literatura, que

funcionam como agentes antimicrobianos (CARVALHO et al., 2015; SADEKUZZAMAN et al., 2018). Assim, antes de produzir os biofilmes, realizou-se um estudo da atividade antimicrobiana apenas do OET, cujo resultado será apresentado posteriormente.

4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho do óleo essencial de tomilho foi realizada para complementar os resultados obtidos na análise de GC-MS, com o objetivo de identificar as bandas características dos componentes majoritários do OET (cimeno, timol e carvacrol). O espectro pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 – Espectro de infravermelho do óleo essencial de tomilho.



Fonte: O autor

O espectro de infravermelho obtido apresentou bandas características dos três componentes majoritários do óleo essencial de tomilho. As bandas localizadas em 1585 e 1420 cm^{-1} são atribuídas a ligação C=C das estruturas do timol e carvacrol e do anel aromático do cimeno, respectivamente. As bandas em 1381 e 1362 cm^{-1} referem-se aos grupos metil-isopropil dos componentes do óleo, enquanto em 1522

cm^{-1} encontra-se a banda referente ao fenil para-substituído do cimeno. A banda em 813 cm^{-1} é atribuída a vibração C-H fora do plano na estrutura do cimeno. As bandas localizadas entre 3000 e 2850 cm^{-1} são referentes aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H presentes no cimeno, timol e carvacrol. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos por Valderrama e Rojas (2017).

Tabela 3 – Atribuição das bandas características no espectro de infravermelho do cimeno, timol e carvacrol

Atribuição da banda	Bandas no espectro de infravermelho (cm^{-1})
Cimeno	
C-H (estiramento simétrico e assimétrico)	3000 - 2850
C=C do anel aromático	1500-1400
Grupo metil isopropil (estiramento simétrico)	1381
Grupo metil isopropil (estiramento assimétrico)	1362
Fenil para-substituído	1055-1019
C-H fora do plano	813
Timol e Carvacrol	
C-H (estiramento simétrico e assimétrico)	3000 - 2850
C=C	1600-1585
Grupo metil isopropil (estiramento simétrico)	1381
Grupo metil isopropil (estiramento assimétrico)	1362
Vibração do anel aromático	807, 811

Fonte: Valderrama e Rojas (2017)

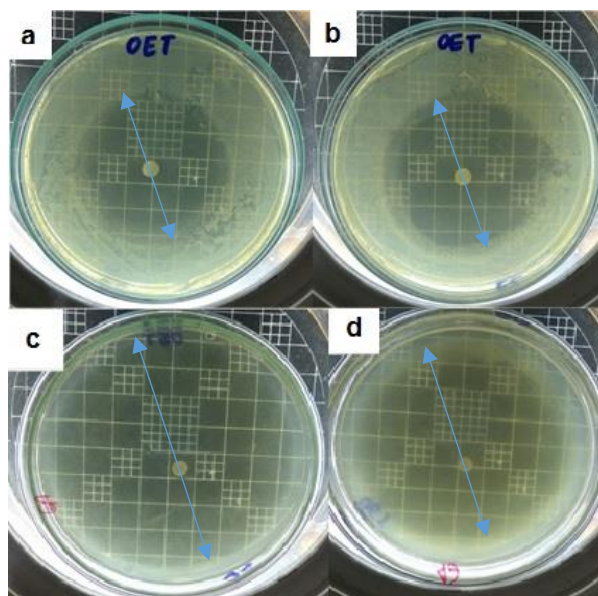
Esses autores identificaram as bandas características dos principais componentes do óleo essencial de tomilho, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

4.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho pelo método do disco-difusão em ágar

Após o período de incubação, verificou-se que o óleo essencial de tomilho inibiu o crescimento microbiano para as duas bactérias em estudo, conforme indica a Figura 13. O halo de inibição observado para a colônia da bactéria *Escherichia coli* foi de

49,7 mm (Figura 13a) e 50,2 mm (Figura 13b), enquanto para a colônia de *Staphylococcus aureus* os halos de inibição foram de 92,7 mm (Figura 13c) e 79,8 mm (Figura 13d).

Figura 13 – Teste de inibição microbiana do óleo essencial de tomilho para *Escherichia coli* (a, b) e *Staphylococcus aureus* (c, d)



Fonte: o autor

De acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2015), os halos de inibição para bactérias no teste do disco-difusão são classificados como: resistente para diâmetro igual ou menor que 14 mm, intermediário para diâmetro entre 15 e 19 mm e sensível para diâmetro superior a 20 mm.

Nesta análise, os halos de inibição tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus* apresentaram diâmetro da zona de inibição superiores a 20 mm. Deste modo, pode-se considerar que ambas as bactérias foram sensíveis ao óleo essencial de tomilho. Outros estudos encontrados na literatura também apontam a atividade antimicrobiana do OET para *S. aureus* e *E. coli* (GONÇALVES et al., 2013; CARVALHO et al., 2015; ZHANG et al., 2016), bem como outros micro-organismos como *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* (GHABRAIE et al., 2016), *Acinetobacter spp* e *Enterococcus sp* (ŁYSAKOWSKA; DENYS; SIENKIEWICZ, 2011; BILENLER et al., 2015).

Desta forma, pode-se observar com esses resultados que o óleo essencial de tomilho se mostrou bastante promissor como agente antimicrobiano para a formulação de biofilmes de amido/quitosana para embalagens ativas.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS

4.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A Tabela 4 apresenta as bandas vibracionais características no espectro de infravermelho para os filmes de amido e quitosana obtidos por Serrero et al (2010).

Tabela 4 – Atribuição das bandas características no espectro de infravermelho da quitosana e do amido

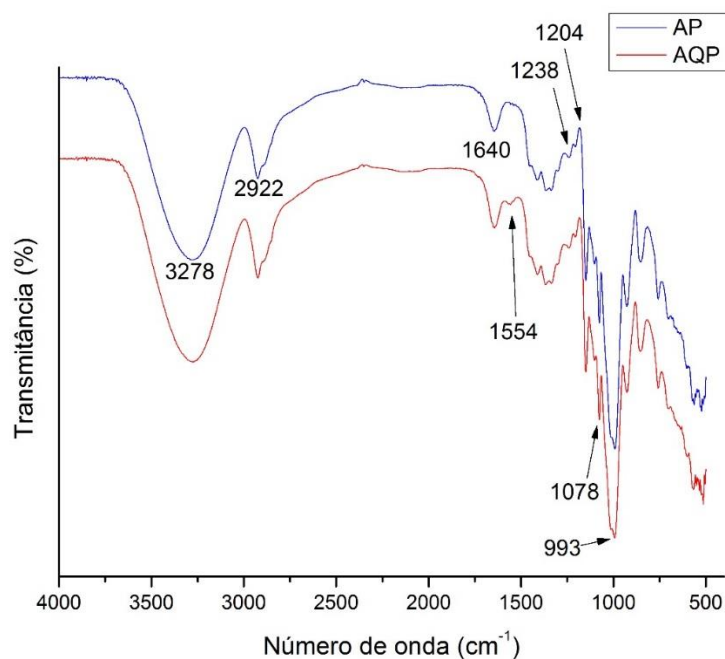
Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições da quitosana	Atribuições do amido
3700-3100	Estiramento O-H e N-H	Estiramento O-H
2880-2930	Estiramento C-H	Estiramento C-H
1655 (próximo)	Amida	-
1640	Flexão O-H da água	Flexão O-H da água
1624 e 1524	NH ₃ ⁺	
1455		CH ₂
1420-1320		C-H
1413	CH ₂	
1385	C-H	
1240, 1202	O-H	
1190-960	C-O	C-O

Fonte: Serrero et al (2010).

Essas bandas vibracionais podem ser observadas na Figura 14, que apresenta o espectro de infravermelho obtido do filme de amido puro e da blenda amido/quitosana. Observa-se que os espectros dos filmes são parecidos, devido à presença de bandas características do amido na mesma região da quitosana.

Contudo, é possível diferenciar os espectros dos filmes de amido puro e amido/quitosana pela presença de uma banda na região de 1554 cm⁻¹, referente a amina presente na estrutura da quitosana, como pode ser observada no espectro da blenda amido/quitosana, resultado esse concordante com os obtidos por Serrero et al (2010). Mathew, Brahmakumar e Abraham (2006) encontraram resultado semelhante ao realizar a espectroscopia na região do infravermelho em filmes de amido de batata/quitosana, onde encontraram uma banda referente a amina da quitosana na região entre 1548 e 1580 cm⁻¹.

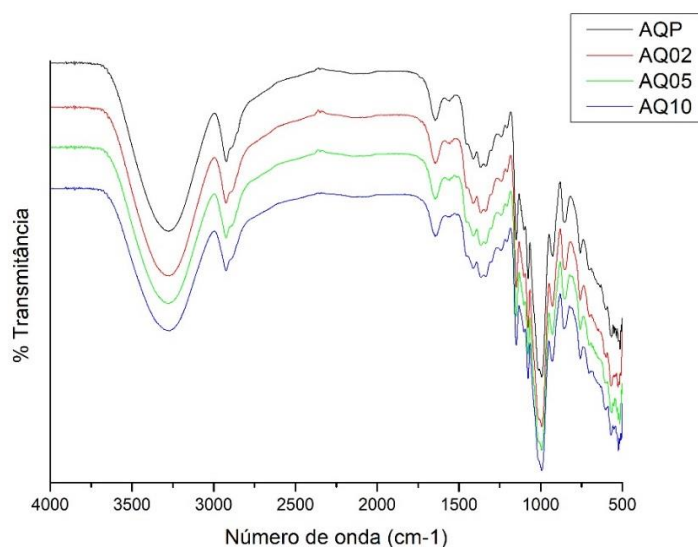
Figura 14 – Espectro de infravermelho dos filmes de amido puro (AP) e da blenda amido/quitosana (AQP)



Fonte: O autor

A incorporação do óleo essencial de tomilho também foi verificada pela técnica de espectroscopia por infravermelho, conforme a Figura 15.

Figura 15 – Espectro de infravermelho dos filmes de amido/quitosana e dos filmes aditivados com óleo essencial de tomilho.



Fonte: O autor

Percebe-se pela análise por FTIR dos filmes de amido/quitosana puro e aditivados com óleo essencial de tomilho que os espectros obtidos são semelhantes.

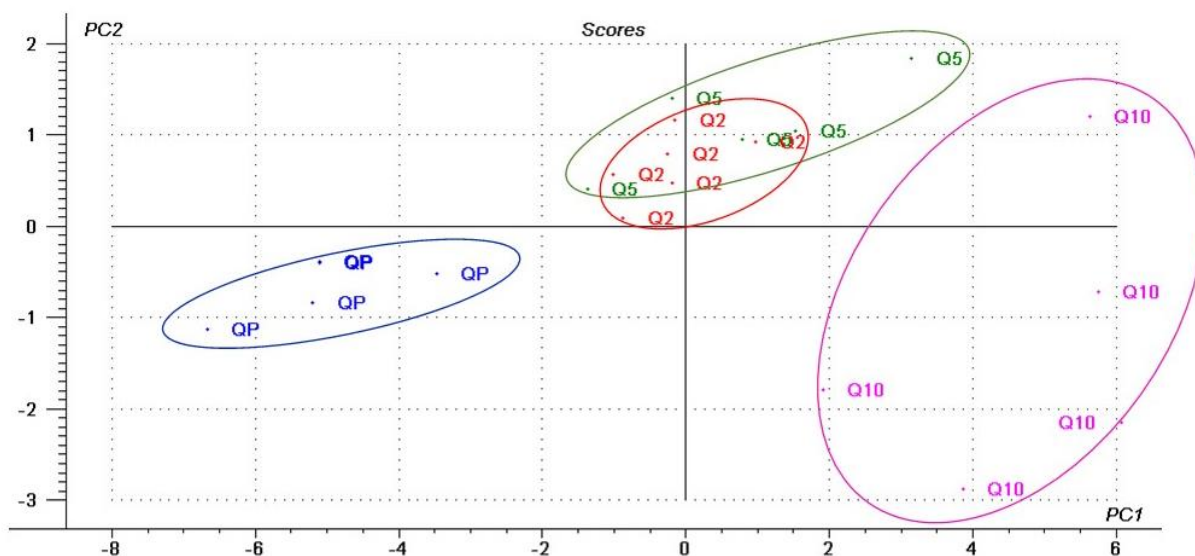
Essa semelhança se deve ao óleo essencial de tomilho apresentar bandas vibracionais características nas mesmas regiões do filme de amido/quitosana. Além disso, a maior concentração de amido em relação aos outros componentes contribui para a ocorrência de sobreposição de bandas no espectro de infravermelho, não sendo possível verificar as bandas referentes ao aditivo. Desta forma, foi necessário realizar a Análise de Componentes Principais (PCA) para evidenciar a diferença entre os filmes poliméricos de amido/quitosana puro e nas concentrações de 2,5, 5 e 10% de óleo essencial de tomilho.

4.2.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

Como ferramenta complementar aos resultados dos espectros de infravermelho, foi utilizada a Análise de Componentes Principais, com o objetivo de identificar a diferença entre as blendas amido/quitosana puro e aditivado com 2,5%, 5% e 10% de óleo essencial de tomilho. Essa análise foi realizada para observar a existência de alguma separação entre os grupos dos filmes com concentrações diferentes de óleo essencial na matriz polimérica. A faixa de estudo utilizada para a elaboração da PCA foi entre $4000-400\text{ cm}^{-1}$ por apresentar em sua totalidade, a maior parte das informações químicas das amostras.

Através do gráfico dos scores apresentado na Figura 16, observa-se que houve diferenciação química da matriz de amido/quitosana pura dos filmes aditivados com óleo essencial de tomilho. Além disso, os filmes de amido/quitosana aditivados com 2,5% e 5% de OET não apresentaram separação significativa na PCA. Pode-se atribuir esta observação às concentrações de óleo essencial, por serem próximas. Numa concentração mais elevada, como na adição de 10% de óleo essencial de tomilho, a separação é nítida nos scores da PCA.

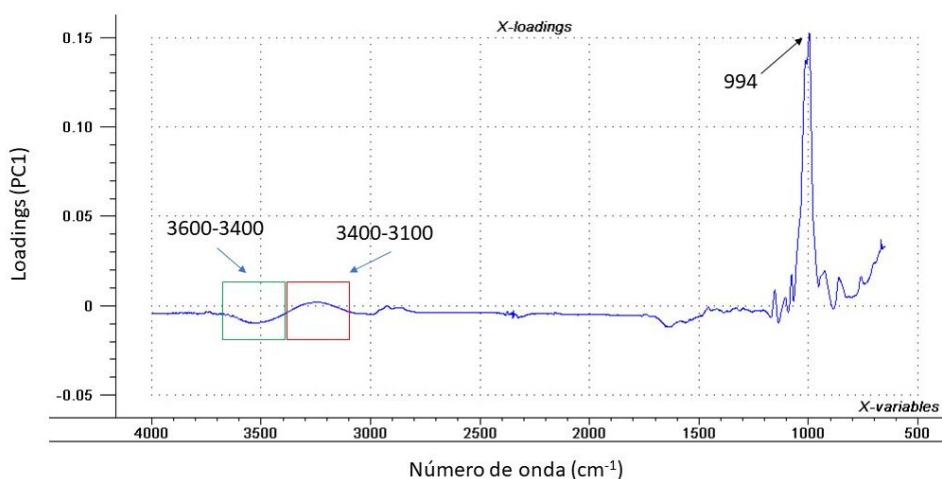
Figura 16 – Análise das componentes principais dos filmes de amido/quitosana puro e aditivado com 2,5, 5 e 10% de óleo essencial de tomilho.



Fonte: O autor

A partir dos espectros apresentados pelos loadings da PCA é possível identificar os sinais responsáveis pela separação dos grupos nos gráficos de scores. Analisando-se a figura 17, é possível visualizar uma banda positiva e outra negativa entre 3600-3100 cm^{-1} referentes aos estiramentos O-H e N-H da quitosana e O-H do amido. O sinal positivo em 994 cm^{-1} é característico do estiramento C-O do amido e quitosana.

Figura 17 – Loadings da PCA referentes aos filmes de amido/quitosana

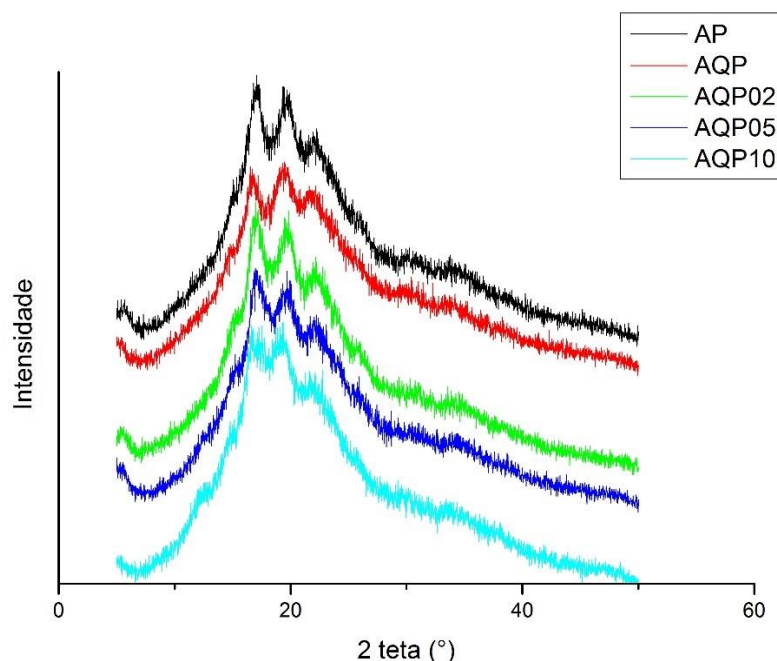


Fonte: O Autor

4.2.3 Difratometria de Raios-X (DRX)

O Difratoograma de Raios-X dos filmes de amido/quitosana aditivados com óleo essencial de tomilho está representado na Figura 18.

Figura 18 – Difratoograma de Raios-X do filme de amido puro (AP); filme de amido/quitosana puro (AQP) e filmes aditivados com óleo essencial de tomilho nas concentrações de 2,5% (AQ02), 5% (AQ05) e 10% (AQ10)



Fonte: O autor

Os filmes obtidos após o processo de gelatinização apresentaram picos de difração a 2θ em torno de 5° , 15° , 17° , 20° e 22° , indicando uma mistura de polimorfos tipo A e B característicos do amido de araruta (NOGUEIRA; FAKHOURI; OLIVEIRA, 2018). Uma maior intensidade encontrada no pico de 20° pode ser atribuído também a presença de quitosana (MATHEW; BRAHMAKUMAR; ABRAHAM, 2006). O pico de 10° referente à quitosana em sua forma cristalina, não aparece nos difratogramas obtidos, devido ao seu perfil amorfo e a sua baixa concentração em relação ao teor de amido (XU et al., 2005).

Os difratogramas apresentam picos de baixa intensidade, indicando sua baixa cristalinidade e predominância de um perfil amorfo. Este caráter amorfo dos filmes se dá pelas interações intermoleculares entre os grupos amina e hidroxila presentes na quitosana e no amido, limitando o movimento da cadeia molecular e desta forma, reduzindo sua cristalização (MATHEW; BRAHMAKUMAR; ABRAHAM, 2006; ZHONG; SONG; LI, 2011).

Não foram verificadas diferenças significativas entre os difratogramas dos filmes analisados, exceto pelo filme de amido/quitosana aditivado com 2,5% de OET, que se apresentou mais cristalino, como pode ser observado na Tabela 5. Esse evento

pode ser atribuído à incidência de uma miscibilidade molecular entre os componentes do filme (BOURTOOM; CHINNAN, 2008).

Tabela 5 – Grau de cristalinidade estimado para os filmes de amido e amido/quitosana.

Biofilme	X _c (grau de cristalinidade)
AP	7,64%
AQP	6,36%
AQ02	8,62%
AQ05	6,94%
AQ10	6,67%

Fonte: O autor

É possível verificar também a diferença de cristalinidade entre o filme de amido puro e a blenda amido/quitosana. O filme cuja matriz é formado pela blenda polimérica apresenta menor cristalinidade devido às interações intramoleculares entre o NH₃⁺ e os grupos hidroxil da quitosana que, conforme explicado anteriormente, limitam o movimento molecular de sua cadeia, reduzindo o grau de cristalização (MATHEW; BRAHMAKUMAR; ABRAHAM, 2006).

4.2.4 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

Os valores do teste de Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA) dos filmes de amido e quitosana aditivados com óleo essencial de tomilho estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de permeabilidade ao vapor de água do filme de amido/quitosana puro (AQP) e filmes aditivados com óleo essencial de tomilho nas concentrações de 2,5% (AQ02), 5% (AQ05) e 10% (AQ10).

Filme*	PVA (g.h-1.m-1. Pa-1).10 ⁷
AQP	1,75 ± 1,43 ^a
AQ02	1,81 ± 1,35 ^a
AQ05	2,29 ± 1,67 ^b
AQ10	2,52 ± 1,46 ^b

Fonte: O autor

Pelos dados obtidos, pode-se observar que a adição de 2,5% de OET não alterou significativamente a PVA do filme. Já com a adição de concentrações superiores do óleo essencial, houve aumento significativo da permeabilidade do filme de amido/quitosana, ao contrário do que é esperado para filmes incorporados com substâncias hidrofóbicas (ELSABEE; ABDOL, 2013; GHASEMLOU et al., 2013). A

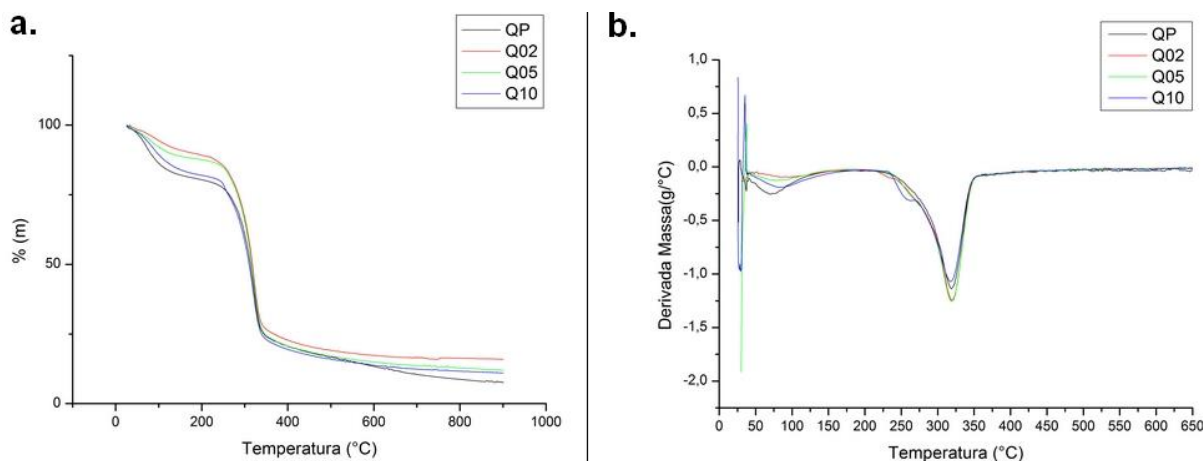
incorporação de substâncias hidrofóbicas, na matriz polimérica, deve reduzir sua interação com a água, reduzindo a permeabilidade ao vapor de água dos filmes (PENG; LI, 2014).

Possivelmente, o aumento da PVA se deu pelas interações dos componentes do óleo essencial de tomilho com a matriz polimérica do filme, quando em concentrações mais elevadas. Os sítios hidrofílicos do timol e do carvacrol presentes na composição do OET interagem com as hidroxilas do amido, enfraquecendo as ligações de hidrogênio, ocorrendo a perda de coesão da matriz e aumentando o espaçamento entre as cadeias, permitindo consequentemente uma maior permeabilidade de água devido à formação de poros (DAVOODI; KAVOOSI; SHAKERI, 2017; VALENCIA-SULLCA et al., 2018). Além disso, sabe-se que o amido utilizado como matriz do biofilme possui caráter hidrofílico (ROCHA et al., 2014).

4.2.5 Análise Termogravimétrica

O termograma dos filmes produzidos é apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Curvas de TGA (a) e DTG (b) dos filmes de amido de araruta/quitosana puro e aditivados com 2,5%, 5% e 10% (m/m) de óleo essencial de tomilho



Fonte: O autor

O primeiro estágio pode ser observado na faixa entre 25°C e sua temperatura final varia de 150 °C a 163 °C a depender do tipo do filme. A perda de massa nessa faixa pode ser atribuída a evaporação de água e ácido acético da matriz polimérica (ALTIOK; ALTIOK; TIHMINLIOGLU, 2010; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010; NOGUEIRA; FAKHOURI; OLIVEIRA, 2018) e simultaneamente a evaporação do óleo essencial de tomilho, a partir de 74°C (GHAHFAROKHI et al., 2016) e a decomposição dos grupamentos amina da quitosana a 135°C. Uma segunda perda de massa pode

ser observada entre 200°C e 400°C. A evaporação do glicerol utilizado como plastificante na formulação, tem sua perda de massa na faixa entre 200 e 330°C (QUIJADA-GARRIDO et al., 2007; GUTIÉRREZ et al., 2015) e paralelamente ocorre a etapa final de degradação térmica dos grupos polihidroxilas da quitosana (a partir de 300°C) e do amido (acima de 330°C), acompanhada da despolimerização e decomposição das matrizes poliméricas, seguida de carbonização (MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010; GUTIÉRREZ et al., 2018).

Analizando a Figura 18.a., pode-se observar que a adição de 2,5% e 5% de óleo essencial de tomilho ao biofilme causou uma perda de massa inicial menor em comparação ao filme puro e ao aditivado com 10% de OET, agregando ao filme uma maior estabilidade térmica no primeiro estágio da degradação, porém sem interferir nas suas temperaturas de degradação, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros de TGA e DTG dos filmes

Filmes	1º estágio			2º estágio		
	T _{on}	T _{off}	T _{máx}	T _{on}	T _{off}	T _{máx}
AQP	25	161	71	204	407	319
AQ02	25	150	79	204	409	319
AQ05	25	151	77	207	407	319
AQ10	25	163	81	204	408	318

Fonte: O autor

4.2.6 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A Tabela 8 apresenta a temperatura de fusão e a entalpia obtidas através do termograma de DSC dos filmes de amido/quitosana puro e aditivado com óleo essencial de tomilho.

Tabela 8 – Parâmetros térmicos (DSC) dos filmes

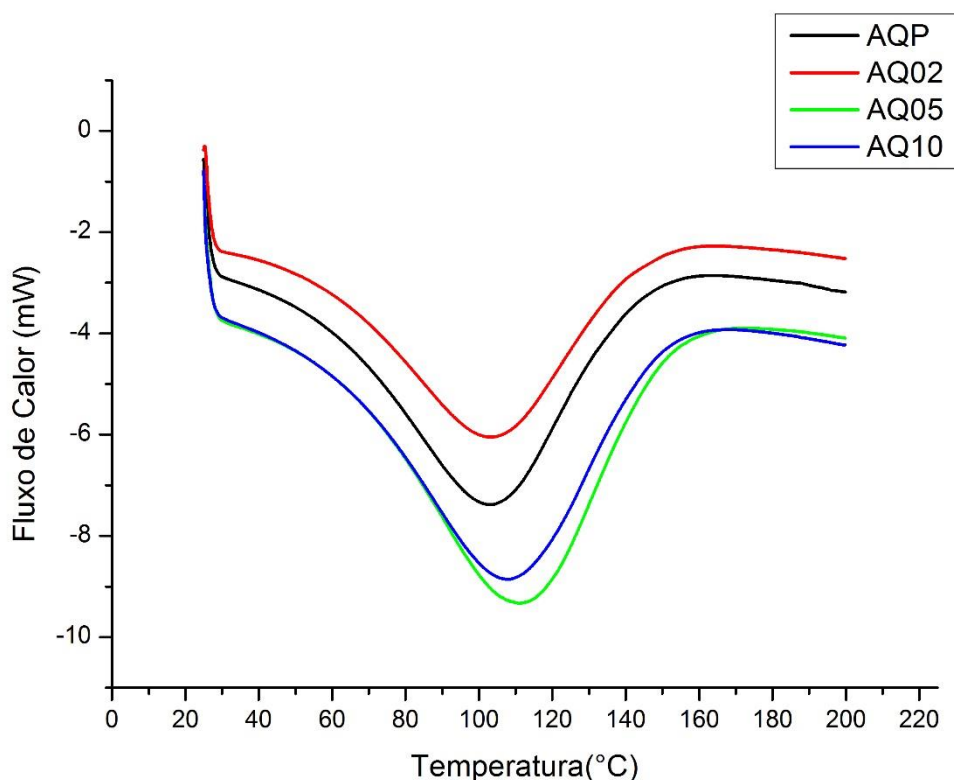
Biofilmes	Pico Endotérmico (°C)	ΔH_f (J.g ⁻¹)
AQP	103,39	160,77
AQ02	103,77	165,80
AQ05	110,97	195,38
AQ10	108,16	187,51

Fonte: O autor

Observando a Figura 20 e os dados da Tabela 8, é possível perceber em todos os filmes analisados a presença de um pico endotérmico em torno de 100°C referente a evaporação da água (LUCHESE et al., 2018). A presença de apenas um pico endotérmico no termograma de DSC pode ser atribuída à miscibilidade e homogeneidade dos componentes da blenda polimérica, tanto relacionado à presença da quitosana como a do óleo (LOPEZ et al., 2014).

Os valores de entalpia encontrados para os filmes de amido/quitosana puro e aditivados com óleo essencial de tomilho corroboram com os estudos de Suriyatem, Auras e Rachtanapun (2018), que verificaram a entalpia para o filme de amido de arroz a 160,4°C e para filmes amido/quitosana entre 145,6 e 219,2°C.

Figura 20 – Termograma dos filmes de amido/quitosana puro e aditivados com óleo essencial de tomilho.



Fonte: O autor

A temperatura de transição vítrea (T_g) não pode ser observada neste estudo devido as limitações do equipamento de DSC utilizado, que não atinge temperaturas abaixo de zero, visto que a T_g do amido plastificado é de -50°C, de acordo com a literatura (LÓPEZ et al., 2011). Ghanbarzadeh, Almasi e Entezami (2010) apontaram

que a T_g de filmes à base de amido plastificado é difícil de ser determinada uma vez que a alteração de capacidade de calor ou o sinal do fluxo de calor é geralmente mais fraca do que a dos polímeros convencionais. Além disso, o DSC é um método cuja sensibilidade da análise é baixa, em especial para materiais não puros, como misturas de polímeros ou compósitos (LORANDI; CIOFFI; ORNAGHI JR., 2016). Estudos recentes demonstram que para a detecção da T_g em filmes que usam amido como matriz polimérica é necessário usar a técnica de Análise Dinâmica Mecânica, comumente chamada de DMA (THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2006; SURIYATEM; AURAS; RACHTANAPUN, 2018). A determinação da T_g de um material por DMA é uma das técnicas mais utilizadas, devido a sua alta sensibilidade a transições e confiança dos dados, principalmente quando se trata de misturas de materiais (LORANDI; CIOFFI; ORNAGHI JR., 2016).

4.2.7 Ensaio de Tração

O ensaio de tração dos filmes poliméricos foi realizado com a finalidade de verificar a influência do óleo essencial de tomilho nas propriedades mecânicas das blendas amido/quitosana. Para este estudo (Tabela 9) foi aplicado o teste estatístico de Duncan de forma a avaliar as mudanças significativas ($p < 0,05$) nas propriedades mecânicas dos filmes aditivados ou não com OET.

Tabela 9 – Parâmetros mecânicos dos filmes de amido/quitosana aditivados com óleo essencial de tomilho

Biofilme	Tensão na força máxima (MPa)	Deformação Específica na Ruptura (%)	Módulo Elástico (MPa)
AQP	5,646 ± 0,251 ^a	23,550 ± 14,223 ^a	67,135 ± 21,029 ^a
AQ02	2,820 ± 1,039 ^b	56,358 ± 12,059 ^b	16,953 ± 5,771 ^b
AQ05	4,308 ± 0,253 ^c	53,685 ± 9,887 ^{ab}	24,980 ± 4,049 ^b
AQ10	4,796 ± 0,388 ^{ac}	38,872 ± 2,873 ^a	32,220 ± 3,277 ^b

Fonte: O autor

A partir dos resultados apresentados na Tabela 9, pode-se notar um decréscimo na Tensão na Força Máxima de 5,646 MPa no filme amido/quitosana puro para 2,82 MPa, 4,308 MPa e 4,796 MPa para os filmes aditivados, respectivamente, com 2,5%, 5% e 10% de óleo essencial de tomilho. A tensão na força máxima está relacionada a resistência mecânica do filme; desta forma, é possível verificar que o filme com adição de 2,5% de OET apresentou menor resistência mecânica em relação

aos demais. Porém, observa-se também que as outras propriedades mecânicas tiveram maiores alterações nesta concentração, apresentando o menor valor de módulo de elasticidade e o maior valor de deformação específica na ruptura, significando que o filme tornou-se menos rígido e mais flexível em comparação aos demais. Resultados semelhantes foram observados por Sapper et al. (2018), que estudaram o efeito da adição de óleo essencial de tomilho em filmes de amido/goma gelana e verificaram diminuição na rigidez e na resistência mecânica em relação ao filme puro.

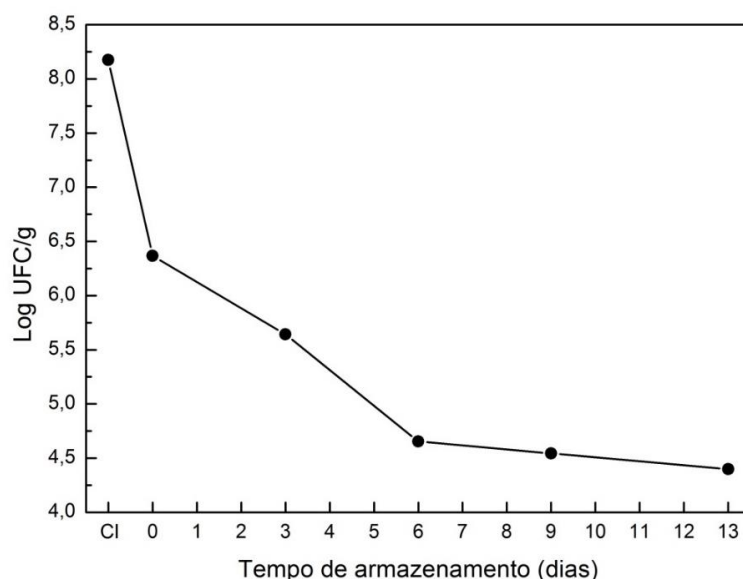
Diversos estudos corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, onde concentrações mais elevadas de óleo essencial adicionadas a matriz polimérica reduzem a resistência mecânica dos filmes devido à formação de descontinuidades em sua estrutura (JIMÉNEZ et al., 2014; JOUKI et al., 2014). Por outro lado, a utilização de pequenas concentrações do óleo essencial plastifica a matriz polimérica através da redução das forças de interação das cadeias sem introduzir descontinuidades significativas na estrutura dos filmes (SAPPER et al., 2018). Desta forma, pode-se inferir que a adição de 2,5% de óleo essencial de tomilho promoveu melhor efeito plastificante nos filmes de amido/quitosana em comparação às concentrações mais elevadas e ao filme puro.

De modo geral, o filme de amido/quitosana aditivado com 2,5% de óleo essencial de tomilho apresentou as melhores propriedades em comparação aos outros filmes, como melhor cristalinidade, melhores propriedades mecânicas e maior estabilidade térmica. Desta forma, optou-se por realizar a análise de atividade antimicrobiana somente com o filme de amido/quitosana com 2,5% de OET, devido a limitação de tempo para a execução de tal análise.

4.2.8 Análise da Atividade Antimicrobiana

A análise *in situ* em amostra de queijo muçarela demonstrou que o filme de amido/quitosana aditivado com 2,5% de óleo essencial de tomilho apresentou atividade antimicrobiana para a concentração testada, conforme exposto na Figura 21.

Figura 21 – Atividade antimicrobiana do filme de amido/quitosana aditivado com 2,5% de óleo essencial de tomilho



Fonte: O autor

Imediatamente após a aplicação do biofilme, uma redução significativa na contagem de células viáveis de *E. coli* foi observada, de 8,17 para 6,36 Log UFC/g. A redução também ocorreu nos dias seguintes de análise, podendo-se observar através dos resultados que ocorreu maior atividade antimicrobiana após 13 dias de contato do filme com a amostra de queijo muçarela.

A migração do óleo essencial de tomilho, assim como os resultados obtidos, pode ser justificada pela afinidade existente entre o óleo essencial, que possui componentes apolares, com a amostra testada (muçarela), que apresenta teor de aproximadamente 27,7% de lipídeos (INMETRO, 2011). Esta afinidade facilita a migração do óleo essencial de tomilho do interior do filme para a superfície do queijo, permitindo uma melhor dispersão do agente antimicrobiano no alimento (DANNENBERG et al., 2017).

Conforme pode ser interpretado a partir da Figura 20, a liberação do óleo essencial de tomilho dos filmes ocorre já no dia zero, ou seja, no primeiro contato do filme com o alimento. A migração ocorre gradualmente, matando parte das bactérias e inibindo o crescimento microbiano ao longo dos dias analisados. A explicação para a morte das bactérias é atribuída ao timol e o carvacrol, compostos fenólicos presentes no óleo essencial de tomilho, bem como os grupos amino da quitosana presente no filme, desintegram a membrana externa de bactérias, liberando componentes

intracelulares (JOUKI et al., 2014; RIAZ et al., 2018). O efeito do carvacrol frente as bactérias intensifica-se quando atua em sinergismo com o cimeno, hidrocarboneto que faz parte da composição do OET (BURT, 2004). O tempo de liberação do óleo essencial da matriz do filme para a amostra também tem um papel importante na propriedade antimicrobiana do filme (MORADI et al., 2016), prolongando o tempo de vida útil do alimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Altıok, Altıok e Tihminlioglu (2010), que registrou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho incorporado a filmes de quitosana contra *E. coli*.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Através da Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (GC-MS) foi possível determinar a composição do óleo essencial de tomilho. Verificou-se que o óleo essencial possui alta concentração dos seus componentes ativos, apresentando 52,16% de cimeno, 28,21% de timol e 13,26% de carvacrol. Através da espectroscopia de infravermelho pode-se complementar os resultados do GC-MS, pelo qual identificou-se as bandas características dos componentes majoritários do óleo essencial de tomilho. O ensaio de atividade antimicrobiana por disco-difusão em ágar apresentou ótimo potencial inibidor frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, que apresentaram-se sensíveis ao óleo essencial.

A espectroscopia de infravermelho (FTIR) junto com a análise de componentes principais (PCA) comprovaram a incorporação do óleo essencial de tomilho nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% na matriz polimérica da blenda amido/quitosana.

Pela análise termogravimétrica (TGA) observou-se que o óleo essencial de tomilho nas concentrações de 2,5% e 5% influenciou na temperatura do primeiro estágio de degradação dos filmes ativos, tornando-os mais termicamente estáveis. Na Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) os filmes de amido/quitosana puro e incorporados com óleo essencial apresentaram entalpia concordante com os valores encontrados na literatura. A temperatura de transição vítrea não pode ser identificada devido às limitações do equipamento utilizado.

Observou-se com os resultados da Difractometria de raios-X (DRX) que o filme de amido/quitosana aditivado com 2,5% de óleo essencial de tomilho apresentou-se mais cristalino do que nos filmes de amido puro, amido/quitosana puro e com concentrações superiores do aditivo. O ensaio de tração revelou que o filme de amido/quitosana com 2,5% de OET tornou-se menos rígido e mais flexível que os demais filmes, apesar de sua menor resistência mecânica.

O ensaio de atividade antimicrobiana do filme de amido/quitosana aditivado com 2,5% de óleo essencial de tomilho realizado in situ nas amostras de queijo muçarela contaminadas com *Escherichia coli* apresentou ótima migração do componente ativo para o alimento, acarretando na morte das bactérias no primeiro

contato do filme com a amostra do queijo e ao longo dos 13 dias de realização do ensaio.

Desta forma, pode-se concluir que os filmes de amido/quitosana são bastantes promissores para o seu uso como embalagem ativa, em especial a blenda polimérica aditivada com 2,5% de óleo essencial de tomilho, que apresentou as melhores propriedades na maioria dos ensaios realizados e também demonstrou excelente atividade antimicrobiana no teste com o alimento.

Como perspectivas futuras, sugere-se realizar ensaios adicionais para melhor compreender as propriedades e comportamento dos filmes como Microscopia Eletrônica de Varredura e a DMA, bem como investigar o efeito de outros métodos de esterilização, como o uso da radiação gama.

REFERÊNCIAS

- AGRIOPOULOU, S. Active Packaging for Food Applications. **EC Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 86–87, 2016.
- AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 163, p. 115–124, 2016.
- ALMEIDA, L. P.; RODRIGUES, W. L.; AGUIAR, N. V.; DA SILVA, R. S.; MOREIRA, C. K. P. Extração de quitina, síntese e caracterização de quitosana obtida através de resíduos de camarão (*Macrobrachium amazonicum*). In: Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - Cobeq IC 2015, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Editora Edgard Blücher, jun. 2015.
- ALTINTAS, A.; TABANCA, N.; TYIHÁK, E.; OTT, P. G.; MÓRICZ, Á. M.; MINCSOVICS, E.; WEDGE, D. E. Characterization of Volatile Constituents from *Origanum onites* and Their Antifungal and Antibacterial Activity. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 6, p. 1200–1208, 1 nov. 2013.
- ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p. 2227–2236, 2010.
- ALVES, T. M.; KLOSOSKI, S. J.; MONTANHINI, M. T. M. Produção e caracterização de amidos de mandioca modificados. **AGROTEC - Revista Agropecuária Técnica**, v. 36, n. ISSN 0100-7467, p. 58–64, 2015.
- ANVISA. Resolução CNNPA nº 12, de 1978. **Anvisa**, p. 23–25, 1978.
- ARANCIBIA, M. Y.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; MONTERO, P. Antimicrobial and rheological properties of chitosan as affected by extracting conditions and humidity exposure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 802–810, mar. 2015.
- ARAÚJO, G. K. P. DE. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis de amido incorporados com extrato de própolis**. Trabalho de Conclusão de Curso. UTFPR, 2014.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM D882: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **ASTM Standards**, p. 12, 2012.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM E96-95: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. **ASTM Standards**, p. 1–13, 2014.
- ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 51–62, fev. 2016.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. a; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, a C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.

- BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014–2019, 2008.
- BATTISTI, R.; FRONZA, N.; VARGAS JÚNIOR, Á.; SILVEIRA, S. M. da; DAMAS, M. S. P.; QUADRI, M. G. N. Gelatin-coated paper with antimicrobial and antioxidant effect for beef packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 11, p. 115–124, 2017.
- BET, C. D.; OLIVEIRA, C. S. De; DENCK, T. A.; MARINHO, M. T.; LACERDA, L. G.; RAMOS, P.; SCHNITZLER, E. Organic amaranth starch: a study of its technological properties after heat-moisture treatment. **Food Chemistry**, 2018.
- BILBAO-SAINZ, C.; CHIOU, B.-S.; WILLIAMS, T.; WOOD, D.; DU, W.-X.; SEDEJ, I.; BAN, Z.; RODOV, V.; POVERENOV, E.; VINOKUR, Y.; MCHUGH, T. Vitamin D-fortified chitosan films from mushroom waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 97–104, jul. 2017.
- BILENLER, T.; GOKBULUT, I.; SISLIOGLU, K.; KARABULUT, I. Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 30, n. 5, p. 392–398, 2015.
- BONILLA, J.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 303–312, fev. 2013.
- BONILLA, J.; POLONI, T.; LOURENÇO, R. V.; SOBRAL, P. J. A. Food Bioscience Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/chitosan films. **Food Bioscience**, v. 23, p. 107–114, 2018.
- BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1633–1641, 2008.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, ago. 2004.
- CAROLINO, A. de S. **Estimativa do Percentual de cristalinidade de polímeros semicristalinos derivados da anilina Através dos padrões de Difração de raios-X**. Dissertação de Mestrado. UFAM, p. 88, 2017.
- CARVALHO, R. J. de; SOUZA, G. T. de; HONÓRIO, V. G.; SOUSA, J. P. de; CONCEIÇÃO, M. L. da; MAGANANI, M.; SOUZA, E. L. de. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v. 52, p. 59–65, 2015.
- CAVALLINI, C. M.; FRANCO, C. M. L. Effect of acid-ethanol treatment followed by ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava starch. **Starch/Staerke**, v. 62, n. 5, p. 236–245, 2010.
- CHARLES, A. L.; CATO, K.; HUANG, T. C.; CHANG, Y. H.; CIOU, J. Y.; CHANG, J. S.; LIN, H. H. Functional properties of arrowroot starch in cassava and sweet potato composite starches. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 187–191, 2016.
- CHENWEI, C.; ZHIPENG, T.; YARUI, M.; WEIQIANG, Q.; FUXIN, Y.; JUN, M.; JING,

X. Physicochemical, microstructural, antioxidant and antimicrobial properties of active packaging films based on poly(vinyl alcohol)/clay nanocomposite incorporated with tea polyphenols. **Progress in Organic Coatings**, v. 123, p. 176–184, out. 2018.

CLSI. M02-A12 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2015.

COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527–1534, 2009.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S. De; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. a. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros**, v. 15, p. 268–273, 2005.

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

CRUZ-GÁLVEZ, A. M.; CASTRO-ROSAS, J.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M. L.; CADENA-RAMÍREZ, A.; TELLEZ-JURADO, A.; TOVAR-JIMÉNEZ, X.; CHAVEZ-URBIOLA, E. A.; ABREU-CORONA, A.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A. Antimicrobial activity and physicochemical characterization of a potato starch-based film containing acetic and methanolic extracts of *Hibiscus sabdariffa* for use in sausage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, p. 300–305, 2018.

DAI, L.; QIU, C.; XIONG, L.; SUN, Q. Characterisation of corn starch-based films reinforced with taro starch nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 174, p. 82–88, maio 2015.

DANNENBERG, G. da S.; FUNCK, G. D.; CRUXEN, C. E. dos S.; MARQUES, J. de L.; SILVA, W. P. da; FIORENTINI, Â. M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314–318, 2017.

DAVOODI, M.; KAVOOSI, G.; SHAKERI, R. Preparation and characterization of potato starch-thymol dispersion and film as potential antioxidant and antibacterial materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 173–179, 2017.

DE SOUSA, J. P.; TORRES, R. de A.; DE AZERÊDO, G. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; VASCONCELOS, M. A. da S.; DE SOUZA, E. L. Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 9–13, 2012.

DEHNAD, D.; MIRZAEI, H.; EMAM-DJOMEH, Z.; JAFARI, S. M.; DADASHI, S. Thermal and antimicrobial properties of chitosan-nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 148–154, 2014.

DILKES-HOFFMAN, L. S.; 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.

DOMÍNGUEZ, R.; BARBA, F. J.; GÓMEZ, B.; PUTNIK, P.; BURSAĆ KOVAČEVIĆ, D.; PATEIRO, M.; SANTOS, E. M.; LORENZO, J. M. Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. **Food Research International**, v. 113, n. July, p. 93–101, 2018.

EL-OBEID, T.; YEHA, H. M.; SAKKAS, H.; LAMBRIANIDI, L.; TSIRAKI, M. I.; SAVVAIDIS, I. N. Shelf-life of smoked eel fillets treated with chitosan or thyme oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 578–583, jul. 2018.

ELIASSEN, A.-C. **Starch in food: structure, function and applications**. 1. ed. Abington, England: Woodhead Publishing, 2004.

ELLIS, R. P.; COCHRANE, M. P.; DALE, M. F. B.; DUPUS, C. M.; LYNN, A.; MORRISON, I. M.; PRENTICE, R. D. M.; SWANSTON, J. S.; TILLER, S. a. Starch Production and Industrial Use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, p. 289–311, 1998.

ELSABEE, M. Z.; ABDOL, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 4, p. 1819–1841, 2013.

EMIROĞLU, Z. K.; YEMİŞ, G. P.; COŞKUN, B. K.; CANDOĞAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 283–288, out. 2010.

FERREIRA, L. E.; BENINCASA, B. I.; FACHIN, A. L.; FRANÇA, S. C.; CONTINI, S. S. H. T.; CHAGAS, A. C. S.; BELEBONI, R. O. Thymus vulgaris L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against Haemonchus contortus from sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 228, n. August, p. 70–76, set. 2016.

FRÁGUAS, R. M.; SIMÃO, A. A.; FARIA, P. V.; QUEIROZ, E. de R.; OLIVEIRA JUNIOR, Ê. N. de; ABREU, C. M. P. de. Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. **Polímeros**, v. 25, n. spe, p. 48–53, 2015.

GALLUCCI, N.; CASERO, C.; OLIVA, M.; ZYGADLO, J.; DEMO, M. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta- lactam antibiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 10, p. 30–32, 2006.

GARDESH, A. S. K.; BADII, F.; HASHEMI, M.; ARDAKANI, A. Y.; MAFTOONAZAD, N.; GORJI, A. M. Effect of nanochitosan based coating on climacteric behavior and postharvest shelf-life extension of apple cv. Golab Kohanz. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 33–40, 2016.

GENDE, L.; MAGGI, M.; VAN BAREN, C.; DI LEO, A.; BANDONI, A.; FRITZ, R.; EGUARAS, M. Antimicrobial and miticide activities of Eucalyptus globulus essential oils obtained from different Argentine regions. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 3, p. 642–650, 2010.

GHABRAIE, M.; VU, K. D.; TATA, L.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 332–339, 2016.

GHAHFAROKHI, M. G.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A.; AZIZI, M. H. Enhancement of thermal stability and antioxidant activity of thyme essential oil by encapsulation in Chitosan Nanoparticles. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 18, p.

1781–1792, 2016.

GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H.; ENTEZAMI, A. A. Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 697–702, out. 2010.

GHASEMLOU, M.; ALIHEIDARI, N.; FAHMI, R.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; KESHAVERZ, B.; CRAN, M. J.; KHAKSAR, R. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 1–27, 2013.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 42–51, 2014.

GONÇALVES, G. M. S.; SREBERNICH, S. M.; BRAGAGNOLO, N.; MADALOZZO, E. S.; MERHI, V. L.; PIRES, D. C. Study of the composition of *Thymus vulgaris* essential oil, developing of topic formulations and evaluation of antimicrobial efficacy. v. 7, n. 23, p. 1736–1745, 2013.

GONÇALVES, N. D.; PENA, F. de L.; SARTORATTO, A.; DERLAMELINA, C.; DUARTE, M. C. T.; ANTUNES, A. E. C.; PRATA, A. S. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, v. 96, p. 154–160, 2017.

GUTIÉRREZ, T. J.; HERNIOU-JULIEN, C.; ÁLVAREZ, K.; ALVAREZ, V. A. Structural properties and in vitro digestibility of edible and pH-sensitive films made from guinea arrowroot starch and wastes from wine manufacture. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, n. September 2017, p. 135–143, 2018.

GUTIÉRREZ, T. J.; MORALES, N. J.; PÉREZ, E.; TAPIA, M. S.; FAMÁ, L. Physico-chemical properties of edible films derived from native and phosphated cush-cush yam and cassava starches. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 3, p. 1–8, 2015.

HAZZIT, M.; BAALIOUAMER, A.; VERÍSSIMO, A. R.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 714–721, 2009.

HOMEZ-JARA, A.; DAZA, L. D.; AGUIRRE, D. M.; MUÑOZ, J. A.; SOLANILLA, J. F.; VÁQUIRO, H. A. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1233–1240, 2018.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate polymers*,. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 253–267, 2001.

HOSSEINI, M. H.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, M. A. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, n. 6, p. 727–743, dez. 2009.

HOSSEINZADEH, S.; JAFARIKUKHDAN, A.; HOSSEINI, A.; ARMAND, R. The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. September, p.

635–642, 2015.

INMETRO. Programa de análise de produtos: relatório sobre análise de gordura e colesterol em queijos. **INMETRO**, p. 32, 2011.

ITO, E. N.; PESSAN, L. A.; HAGE JR., E.; COVAS, J. A. Análise do desenvolvimento morfológico da blenda polimérica PBT/ABS durante as etapas de mistura por extrusão e moldagem por injeção. **Polímeros**, v. 14, n. 2, p. 83–92, 2004.

JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 879–884, ago. 2007.

JAVIDI, Z.; HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M. Development of flexible bactericidal films based on poly(lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 251–260, out. 2016.

JIMÉNEZ, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; DESOBRY, S.; CHIRALT, A.; TEHRANY, E. A. Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. v. 35, p. 159–169, 2014.

JOUKI, M.; MORTAZAVI, S. A.; YAZDI, F. T.; KOOCHKEI, A. Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. v. 99, p. 537–546, 2014.

JYOTHI, A. N.; SAJEEV, M. S.; SREEKUMAR, J. Hydrothermal modifications of tropical tuber starches - Effect of ANN on the physicochemical, rheological and gelatinization characteristics. **Starch/Stärke**, v. 63, n. 9, p. 536–549, 2011.

KACZMAREK, B.; SIONKOWSKA, A.; SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J. Influence of glycosaminoglycans on the properties of thin films based on chitosan/collagen blends. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 80, p. 189–193, abr. 2018.

KAYA, M.; ČESONIENE, L.; DAUBARAS, R.; LESKAUSKAITE, D.; ZABULIONE, D. Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 355–360, 2016.

KHALEQUE, M. A.; KEYA, C. A.; HASAN, K. N.; HOQUE, M. M.; INATSU, Y.; BARI, M. L. Use of cloves and cinnamon essential oil to inactivate *Listeria monocytogenes* in ground beef at freezing and refrigeration temperatures. **LWT**, v. 74, p. 219–223, dez. 2016.

KHANEGHAH, A. M.; HASHEMI, S. M. B.; LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 1–19, set. 2018.

KHORSHIDIAN, N.; YOUSEFI, M.; KHANNIRI, E.; MORTAZAVIAN, A. M. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 62–75, 2018.

KIM, J.; REN, C.; SHIN, M. Physicochemical properties of starch isolated from eight different varieties of Korean sweet potatoes. **Starch - Stärke**, v. 65, n. 11–12, p.

923–930, 2013.

KOMAKI, A.; HOSEINI, F.; SHAHIDI, S.; BAHARLOUEI, N. Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 3, p. 257–261, 2015.

KREPKER, M.; SHEMESH, R.; DANIN POLEG, Y.; KASHI, Y.; VAXMAN, A.; SEGAL, E. Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. **Food Control**, v. 76, p. 117–126, jun. 2017.

KUETE, V. *Thymus vulgaris*. In: **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 599–609.

LEMONS, M. F.; LEMOS, M. F.; PACHECO, H. P.; GUIMARÃES, A. C.; FRONZA, M.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R. Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 543–548, 2017.

LI, L.; CHEN, H.; WANG, M.; LV, X.; ZHAO, Y.; XIA, L. Development and characterization of irradiated-corn-starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 395–400, ago. 2018.

LOPES, J. C.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SCHEIDT, G. N.; SOARES, L. P.; CHAGAS, L. F. B. Biomassa e extração de quitina e quitosana a partir de isolados de *Cunninghamella* sp. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 38, n. 1, p. 25, 18 dez. 2017.

LOPEZ, O.; GARCIA, M. A.; VILLAR, M. A.; GENTILI, A.; RODRIGUEZ, M. S.; ALBERTENGO, L. Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 106–115, 2014.

LÓPEZ, O. V.; LECOT, C. J.; ZARITZKY, N. E.; GARCÍA, M. A. Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 2, p. 254–263, jul. 2011.

LORANDI, N. P.; CIOFFI, M. O. H.; ORNAGHI JR., H. Análise Dinâmico-Mecânica de Materiais Compósitos Poliméricos. **Scientia cum Industria**, v. 4, n. 1, p. 48, 2 abr. 2016.

LUCHESI, C. L.; GARRIDO, T.; SPADA, J. C.; TESSARO, I. C.; DE LA CABA, K. Development and characterization of cassava starch films incorporated with blueberry pomace. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 834–839, 2018.

LUCHESI, C. L.; SPADA, J. C.; TESSARO, I. C. Starch content affects physicochemical properties of corn and cassava starch-based films. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. May, p. 619–626, dez. 2017.

LUZI, F.; PUGLIA, D.; DOMINICI, F.; FORTUNATI, E.; GIOVANALE, G.; BALESTRA, G. M.; TORRE, L. Effect of gallic acid and umbelliferone on thermal, mechanical, antioxidant and antimicrobial properties of poly (vinyl alcohol-co-ethylene) films. **Polymer Degradation and Stability**, v. 152, p. 162–176, 2018.

ŁYSAKOWSKA, M.; DENYS, A.; SIENKIEWICZ, M. The activity of thyme essential oil against *Acinetobacter* spp. **Central European Journal of Biology**, v. 6, n. 3, p. 405–

413, 2011.

MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications.

Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, n. 4–5, p. 207–233, 2007.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137, 30 abr. 2010.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; EZQUERRA-BRAUER, J. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M. M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M. S.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 305–315, 2010.

MARTUCCI, J. F.; GENDE, L. B.; NEIRA, L. M.; RUSECKAITE, R. A. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 205–213, set. 2015.

MATHEW, S.; BRAHMAKUMAR, M.; ABRAHAM, T. E. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch–chitosan blend films. **Biopolymers**, v. 82, n. 2, p. 176–187, 5 jun. 2006.

MEI, J.; YUAN, Y.; WU, Y.; LI, Y. Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 17–21, 2013.

MENDES, F. R. S.; BASTOS, M. S. R.; MENDES, L. G.; SILVA, A. R. A.; SOUSA, F. D.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; CHENG, H. N.; BISWAS, A.; MOREIRA, R. A. Preparation and evaluation of hemicellulose films and their blends. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 181–190, set. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Alimentos Regionais Brasileiros**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

MORADI, M.; TADJIQUE, H.; ROHANI, S. M. R.; MAHMOUDIAN, A. Efeitos antioxidantes e antimicrobianos de filmes comestíveis de zeína impregnados com *Zataria multiflora* Boiss. óleo essencial e monolaurina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 37–43, 2016.

MORENO, O.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A.; CRUZ-ROMERO, M. C.; KERRY, J. Starch-gelatin antimicrobial packaging materials to extend the shelf life of chicken breast fillets. **LWT - Food Science and Technology**, jul. 2018.

MURIEL-GALET, V.; CRAN, M. J.; BIGGER, S. W.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 9–16, mar. 2015.

NABAVI, S. M.; MARCHESE, A.; IZADI, M.; CURTI, V.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. **Food Chemistry**, v. 173, p. 339–347, 2015.

NEVES, M. C. P.; COELHO, I. da S.; ALMEIDA, D. L. de. Araruta: Resgate de um Cultivo Tradicional. **Embrapa**, n. Comunicado Técnico 79, p. 1–4, 2005.

NOGUEIRA, G. F.; FAKHOURI, F. M.; OLIVEIRA, R. A. de. Extraction and characterization of arrowroot (*Maranta arundinaceae* L.) starch and its application in edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, n. January, p. 64–72, 2018.

O'LOUGHLIN, R. S.; MONTGOMERY, H. F.; DWYER, CHARLES. The Delineator. The Butterick Publishing Co. v.99, p. 105, 1921.

PENG, Y.; LI, Y. Combined effects of two kinds of essential oils on physical , mechanical and structural properties of chitosan films. **Food hydrocolloids**, v. 36, p. 287–293, 2014.

PEPE, L. S.; MORAES, J.; ALBANO, K. M.; TELIS, V. R. N.; FRANCO, C. M. L. Effect of heat-moisture treatment on the structural, physicochemical, and rheological characteristics of arrowroot starch. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 3, p. 256–265, 2016.

PIRBALOUTI, A. G.; HASHEMI, M.; GHAFAROKHI, F. T. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops & Products**, v. 48, p. 43–48, 2013.

QUEIROZ, F. C. F.; KUMMER, R.; SILVA, C. F. E.; CARVALHO, M. D. de B.; CUNHA, J. M.; GRESPAN, R.; AMADO, C. A. B.; CUMAN, R. K. N. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

QUENTAL, A. C.; CARVALHO, F. P. De; TADA, E. dos S.; FELISBERTI, M. I. Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 438–446, 2010.

QUIJADA-GARRIDO, I.; IGLESIAS-GONZÁLEZ, V.; MAZÓN-ARECHEDERRA, J. M.; BARRALES-RIENDA, J. M. The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-Propantriol (glycerol). **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 173–186, 2007.

QUIROGA, A. L. B. Amidos. **Food ingredients Brasil**, v. N°35, p. 31–56, 2015.

RÂPĂ, M.; MITELUȚ, A. C.; TĂNASE, E. E.; GROSU, E.; POPESCU, P.; POPA, M. E.; ROSNES, J. T.; SIVERTSVIK, M.; DARIE-NIȚĂ, R. N.; VASILE, C. Influence of chitosan on mechanical, thermal, barrier and antimicrobial properties of PLA-biocomposites for food packaging. **Composites Part B: Engineering**, v. 102, p. 112–121, out. 2016.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 404–419, 2014.

REDDY, C. K.; HARIPRIYA, S.; NOOR MOHAMED, A.; SURIYA, M. Preparation and characterization of resistant starch III from elephant foot yam (*Amorphophallus paeonifolius*) starch. **Food Chemistry**, v. 155, p. 38–44, 2014.

REIS, R. C.; CÔRREA, P. C.; DEVILLA, I. A.; SANTOS, E. S.; ASCHERI, D. P. R.; SERVULO, A. C. O.; E SOUZA, A. B. M. Drying of yam starch (*Discorea* ssp.) and glycerol filmogenic solutions at different temperatures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 651–656, 2013.

REN, L.; YAN, X.; ZHOU, J.; TONG, J.; SU, X. Influence of chitosan concentration on

mechanical and barrier properties of corn starch/chitosan films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1636–1643, dez. 2017.

RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1629–1652, 2013.

RIAZ, A.; LEI, S.; AKHTAR, H. M. S.; WAN, P.; CHEN, D.; JABBAR, S.; ABID, M.; HASHIM, M. M.; ZENG, X. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 547–555, jul. 2018.

ROCHA, G. O.; FARIAS, M. G.; CARVALHO, C. W. P. de; ASCHERI, J. L. R.; GALDEANO, M. C. Filmes compostos biodegradáveis a base de amido de mandioca e proteína de soja. **Polímeros**, v. 24, n. 5, p. 587–595, 2014.

ROMANENKO, E. P.; TKACHEV, A. V. Identification by GC-MS of cymene isomers and 3,7,7-trimethylcyclohepta-1,3,5-triene in essential oils. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 42, n. 6, p. 699–701, nov. 2006.

SADEKUZZAMAN, M.; MIZAN, M. F. R.; KIM, H. S.; YANG, S.; HA, S. Do. Activity of thyme and tea tree essential oils against selected foodborne pathogens in biofilms on abiotic surfaces. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, n. October 2017, p. 134–139, 2018.

SAPPER, M.; WILCASO, P.; SANTAMARINA, M. P.; CHIRALT, A. Antifungal and functional properties of starch-gellan films containing thyme (*Thymus zygis*) essential oil. v. 92, p. 505–515, 2018.

SARKA, E.; DVORACEK, V. New processing and applications of waxy starch (a review). **Journal of Food Engineering**, v. 206, p. 77–87, 2017.

SARTORI, T.; MENEGALLI, F. C. Development and characterization of unripe banana starch films incorporated with solid lipid microparticles containing ascorbic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 210–219, abr. 2016.

SCHÖTT, G.; LIESEGANG, S.; GAUNITZ, F.; GLESS, A.; BASCHE, S.; HANNIG, C.; SPEER, K. The chemical composition of the pharmacologically active *Thymus* species, its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antiadherent effects of *T. vulgaris* on the bacterial colonization of the in situ pellicle. **Fitoterapia**, v. 121, p. 118–128, 2017.

SERRERO, A.; TROMBOTTO, S.; CASSAGNAU, P.; BAYON, Y.; GRAVAGNA, P.; MONTANARI, S.; DAVID, L. Polysaccharide gels based on chitosan and modified starch: structural characterization and linear viscoelastic behavior. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 6, p. 1534–1543, 2010.

SINGH, T.; CHITTENDEN, C. Efficacy of essential oil extracts in inhibiting mould growth on panel products. **Building and Environment**, v. 45, n. 10, p. 2336–2342, 2010.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 695–702, dez. 2016.

SIROCCHI, V.; DEVLIEGHERE, F.; PEELMAN, N.; SAGRATINI, G.; MAGGI, F.; VITTORI, S.; RAGAERT, P. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil combined

with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1069–1076, abr. 2017.

SIRVIÖ, J. A.; LIIMATAINEN, H.; NIINIMÄKI, J.; HORMI, O. Sustainable packaging materials based on wood cellulose. **RSC Advances**, v. 3, n. 37, p. 16590–16596, 2013.

SOUZA, G.; SANTOS, A.; VINHAS, G. Avaliação das propriedades da blenda de poli(3-hidroxibutirato)/quitosana após esterilização térmica ou radiolítica. **Polímeros**, v. 26, n. 4, p. 352–359, 2016.

STAHL-BISKUP, E.; VENSKUTONIS, R. P. Thyme. In: **Handbook of Herbs and Spices**. Cambridge: Elsevier, 2012. p. 499–525.

STERN, P. G.; SEGERMAN, E. On the structure of polypropylene fibres. **Polymer**, v. 9, p. 471–477, jan. 1968.

ŠUBARIĆ, D.; BABIĆ, J.; LALIĆ, A.; AČKAR, D.; KOPJAR, M. Isolation and characterisation of starch from different barley and oat varieties. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. 4, p. 354–360, 2011.

SUNG, S. Y.; SIN, L. T.; TEE, T. T.; BEE, S. T.; RAHMAT, A. R.; RAHMAN, W. A. W. A.; TAN, A. C.; VIKHRAMAN, M. Antimicrobial agents for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 110–123, 2013.

SURIYATEM, R.; AURAS, R. A.; RACHTANAPUN, P. Improvement of mechanical properties and thermal stability of biodegradable rice starch–based films blended with carboxymethyl chitosan. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 37–48, out. 2018.

TALÓN, E.; TRIFKOVIC, K. T.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Release of polyphenols from starch-chitosan based films containing thyme extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 122–130, 2017.

TECHATHUVANAN, C.; REYES, F.; DAVID, J. R. D.; DAVIDSON, P. M. Efficacy of Commercial Natural Antimicrobials Alone and in Combinations against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 2, p. 269–275, fev. 2014.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. E172–E176, 31 maio 2006.

VALDERRAMA, A. C. S.; ROJAS, G. C. de. Traceability of Active Compounds of Essential Oils in Antimicrobial Food Packaging Using a Chemometric Method by ATR-FTIR. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 08, n. 11, p. 726–741, 2017.

VALENCIA-SULLCA, C.; VARGAS, M.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer films containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 107–115, 2018.

VAN HAUTE, S.; RAES, K.; DEVLIEGHERE, F.; SAMPERS, I. Combined use of cinnamon essential oil and MAP/vacuum packaging to increase the microbial and sensorial shelf life of lean pork and salmon. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 12,

p. 51–58, jun. 2017.

VAN LONG, N. N.; JOLY, C.; DANTIGNY, P. Active packaging with antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 73–90, mar. 2016.

VEJDAN, A.; OJAGH, S. M.; ADELI, A.; ABDOLLAHI, M. Effect of TiO₂ nanoparticles on the physico-mechanical and ultraviolet light barrier properties of fish gelatin/agar bilayer film. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 88–95, set. 2016.

VIACAVA, G. E.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; ANSORENA, M. R. Effect of free and microencapsulated thyme essential oil on quality attributes of minimally processed lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 145, p. 125–133, nov. 2018.

VILELA, C.; PINTO, R. J. B.; COELHO, J.; DOMINGUES, M. R. M.; DAINA, S.; SANTOS, A. O.; FREIRE, C. S. R.; SADOCCO, P. Bioactive chitosan/ellagic acid films with UV-light protection for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 120–128, 2017.

VILLAR, M. A.; BARBOSA, S. E.; CASTILLO, L.; LOPEZ, O. V. **Starch-based materials in food packaging : processing, characterization and applications**. 1. ed. London: Academic Press, 2017.

VILLAS-BOAS, F.; FRANCO, C. M. L. Effect of bacterial β -amylase and fungal α -amylase on the digestibility and structural characteristics of potato and arrowroot starches. **Food Hydrocolloids**, v. 52, 2016.

VIUDA-MARTOS, M.; EL GENDY, A. E.-N. G. S.; SENDRA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; ABD EL RAZIK, K. A.; OMER, E. A.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Listeria Activities of Essential Oils Obtained from Some Egyptian Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9063–9070, 25 ago. 2010.

WALENTOWSKA, J.; FLACZYK, J. F. Thyme essential oil for antimicrobial protection of natural textiles. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 84, p. 407–411, out. 2013.

WANG, S.; SHARP, P.; COPELAND, L. Structural and functional properties of starches from field peas. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1546–1552, 2011.

WATTANASATCHA, A.; RENGPIPAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1–2, p. 360–365, 2012.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHAL, E. F. **Starch: Chemistry and Technology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1984.

WU, C. S.; LIAO, H. T. Interface design and reinforced features of arrowroot (Maranta arundinacea) starch/polyester-based membranes: Preparation, antioxidant activity, and cytocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 54–61, 2017.

XU, Y. X.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185–192, 2005.

YOUNES, I.; SELLIMI, S.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57–63, ago. 2014.

ZHANG, Y.; MA, Q.; CRITZER, F.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Organic thyme oil emulsion as an alternative washing solution to enhance the microbial safety of organic cantaloupes. **Food Control**, v. 67, p. 31–38, 2016.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 335–342, 2011.