

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Embalagem ativa para conservação de bolo: potencial antifúngico de filmes a base de amidos nativo e modificado de feijão carioca (*Phaseolus Vulgaris*) e óleo essencial da casca da laranja (*Citrus Sinensis L.*)

Graciele Saraiva Lemos
Química de Alimentos

Pelotas, 2025.

Graciele Saraiva Lemos

Embalagem ativa para conservação de bolo: potencial antifúngico de filmes a base de amidos nativo e modificado de feijão carioca (*Phaseolus Vulgaris*) e óleo essencial da casca da laranja (*Citrus Sinensis L.*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação:

Prof^a. Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias

Dr^a. Laura Martins Fonseca

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

L555e Lemos, Graciele Saraiva

Embalagem ativa para conservação de bolo [recurso eletrônico] : potencial antifúngico de filmes a base de amidos nativo e modificado de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*) e óleo essencial da casca da laranja (*Citrus sinensis* L.) / Graciele Saraiva Lemos ; Elessandra da Rosa Zavareze, orientadora ; Alvaro Renato Guerra Dias, Laura Martins Fonseca, coorientadores. — Pelotas, 2025.

67 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Biopolímeros. 2. Compostos voláteis. 3. Propriedades microbiológicas. I. Zavareze, Elessandra da Rosa, orient. II. Dias, Alvaro Renato Guerra, coorient. III. Fonseca, Laura Martins, coorient. IV. Título.

CDD 576.163

Graciele Saraiva Lemos

Embalagem ativa para conservação de bolo: potencial antifúngico de filmes a base de amidos nativo e modificado de feijão carioca (*Phaseolus Vulgaris*) e óleo essencial da casca da laranja (*Citrus Sinensis L.*)

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 13/03/2025

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze (Orientadora), Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof^a. Dr^a. Caroline Dellinghausen Borges, Doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra, Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr^a. Estefania Júlia Dierings de Souza, Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Aos meus pais, Juraci e Volnei, e minha irmã Chaiane e meu namorado Tomás,
dedico.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente a Deus, por trilhar meus caminhos da melhor forma possível e permitir realizar esta etapa com saúde, perseverança e com todos que me amam e apoiam ao meu lado.

Em especial, agradeço as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Juraci e Volnei, por me apoiarem em cada decisão e nunca medir esforços para me ajudarem a alcançar tudo que almejo. A pessoa que me tornei é devido ao amor e educação que vocês me proporcionaram. Amo vocês, incondicionalmente.

À meu companheiro de vida Tomás, obrigada por ser meu parceiro, sempre me incentivando e me apoiando em todas as minhas decisões, a vida sem dúvidas é mais leve ao teu lado. Extensivo a família do Tomás que sempre me acolheu com todo amor e carinho e minha sogra por sempre me incentivar a continuar estudando.

À minha avó Sueli, guardo no coração as lembranças e afeto comigo. Tenho muito orgulho de ser sua neta.

À minha irmã Chaiane, que ajudou na minha criação e me ajuda em todas as trajetórias da minha vida. Obrigada por tanto, por apoiar todas as minhas decisões.

Aos meus afilhados, que tenho tanta gratidão e amor por estarem na minha vida. À toda minha família e amigos que se preocupam e desejam meu sucesso. Embora ausente, meu carinho por todos nunca muda.

Aos meus orientadores, Prof^a. Elessandra e Prof. Alvaro, aos quais sempre me ouviram, me incentivaram e ensinaram. O sentimento que tenho por vocês é de gratidão e carinho, por tudo que vocês fazem para que os orientados sejam felizes durante e após o curso e que alcancem o sucesso. Obrigado pela dedicação e profissionalismo.

À minha co-orientadora e amiga Laura, por me ajudar e ensinar tanto. Obrigada pela amizade, carinho e dedicação comigo. Tu és incrível e sou imensamente grata por tudo.

À minha grande amiga Juliani, que trabalhou, chorou, riu, brincou e me acompanhou durante este período de curso. Minha trajetória se tornou especial e única, por estarmos juntas. Meu carinho por ti é eterno, assim como nossa amizade carregada guardada no meu coração.

À minha colega e amiga Francine, obrigada por todo carinho de sempre,

quando conversamos me vejo muito em ti, temos algumas coisas em comum, te admiro muito.

As minhas colegas que ajudaram para elaboração desse trabalho, Jéssica Silveira Vitoria, Laura Martins Fonseca, Juliani Buchveitz Pires, Francine Tavares da Silva, Tatiane Jéssica Siebeneichler, Camila de Oliveira Pacheco, gratidão.

Aos meus colegas e amigos da Pós-graduação, que de alguma forma me ajudaram nessa caminhada. Obrigado por terem me ajudado a chegar até aqui e/ou pelos momentos de descontração.

Aos professores do PPGCTA, por todos os ensinamentos.

Ao PPGCTA e coordenadoria por toda assistência durante a realização do curso.

À UFPel, FAPERGS, CAPES, CNPq e aos funcionários do CEME-SUL (FURG) por colaborar com a realização das análises de microscopia.

OBRIGADA!

“Devemos acreditar que somos dotados de alguma coisa e que essa coisa deve ser alcançada a qualquer custo.”

Marie Curie

LEMOS, Graciele Saraiva. **Embalagem ativa para conservação de bolo: potencial antifúngico de filmes a base de amidos nativo e modificado de feijão carioca (*Phaseolus Vulgaris*) e óleo essencial da casca da laranja (*Citrus Sinensis* L.).** 2025. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

Resumo

Este estudo teve como objetivo a aplicação de filmes antifúngicos como embalagens ativas biodegradáveis para a conservação de bolos. Amidos de feijão carioca nativo ou modificado com anidrido octenil succínico (OSA) (4%, p/v) foram utilizados para produzir filmes biodegradáveis incorporados com óleo essencial de casca de laranja (5 e 10%, v/p). O óleo essencial extraído da casca de laranja foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) e teve sua atividade antifúngica avaliada *in vitro*. Os filmes foram elaborados pela técnica de *casting* e posteriormente analisados quanto à morfologia, cor, opacidade, espessura, propriedades mecânicas, teor de umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água e ação antifúngica contra *Penicillium crustosum* e *Aspergillus flavus*. Além disso, os bolos foram submetidos a testes de simulação de embalagem ativa e análise da atividade antifúngica. O D-limoneno foi o composto majoritário (94,25%) no óleo essencial de casca de laranja. Os filmes apresentaram uma morfologia contínua, alta luminosidade (97,0%, amido nativo), baixa opacidade (8,6%, amido modificado), teor de umidade de 24,2%, e solubilidade em água de 38,0%, amido modificado com adição de 10% de óleo essencial e permeabilidade ao vapor de água de 4,97 g.mm/m².dia.KPa. Os filmes permaneceram intactos após 24 h de imersão em água. As propriedades mecânicas incluíram a resistência à tração (5,44 MPa) e a elongação (52,0%, amido modificado). A atividade antifúngica do óleo essencial e dos filmes frente ao fungos *P. crustosum* e *A. flavus* foi elevada, com maior inibição para *A. flavus*. A modificação do amido com OSA aprimorou as propriedades morfológicas dos filmes, tornando-os mais homogêneos comparados ao filme de amido nativo. Os filmes de amido de feijão nativo e modificado com 10% de óleo essencial de casca de laranja apresentaram maior efeito antifúngico e foram utilizados para aplicação na conservação de bolos, apresentando elevada inibição de fungos com potencial para a formação de embalagens biodegradáveis ativas para alimentos.

Palavras-chave: Biopolímeros; Compostos voláteis; Propriedades microbiológicas.

Lemos, Graciele Saraiva. **Active packaging for cake preservation: antifungal potential of films based on native and modified starches from carioca beans (*Phaseolus Vulgaris*) and essential oil from orange peel (*Citrus Sinensis L.*)**. 2025. 67 f. Dissertation (Master's in Food Science and Technology) – Postgraduate Program in Food Science and Technology, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2025.

Abstract

The aim of this study was to apply antifungal films as active biodegradable packaging for preserving cakes. Native carioca bean starch or starch modified with octenyl succinic anhydride (OSA) (4%, w/v) were used to produce biodegradable films incorporated with orange peel essential oil (5 and 10%, w/v). The essential oil extracted from the orange peel was characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and its antifungal activity was assessed in vitro. The films were analyzed for morphology, color, opacity, thickness, mechanical properties, moisture content, water solubility, water vapor permeability and antifungal action against *Penicillium crustosum* and *Aspergillus flavus*. In addition, the cakes were subjected to active packaging simulation tests and antifungal activity analysis. D-limonene was the majority compound (94.25%) in the orange peel essential oil. The films had a continuous morphology, high luminosity (97.0%), low opacity (8.6%), moisture content of 24.2%, water solubility of 38.0% and a water vapor permeability of 4.97 g.mm/m².day.KPa. The films remained intact after 24 h of immersion in water. The mechanical properties included tensile strength (5.44 MPa) and elongation (52.0%). The antifungal activity of the essential oil and the films against the fungi *Penicillium crustosum* and *Aspergillus flavus* was high, with greater inhibition for *A. flavus*. The modification of the starch with OSA improved the morphological properties of the films, making them more homogeneous compared to the native starch film. The bean starch films with 10% orange peel essential oil had a greater antifungal effect and were used for cake preservation, showing high fungal inhibition with the potential to form active biodegradable food packaging.

Keywords: Biopolymers; Volatile compounds; Microbiological properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A) Estrutura da amilose (polímero linear composto por D-glicoses unidas em α -1,4).B) Estrutura da amilopectina (polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α -1,4 e α -1,6). Fonte: Adaptado de LAJOLO & MENEZES (2006).....	19
Figura 2 - Elaboração de solução fimogênica pela técnica de <i>casting</i>	29
Figura 3 - Simulação de embalagem ativa em alimento: filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja para avaliar a atividade antifúngica <i>in situ</i> em bolos.....	35
Figura 4 - Morfologia dos filmes produzidos com amido de feijão nativo contendo (a,b) 0%, (c,d) 5% e (e,f) 10% de óleo essencial de casca de laranja.....	39
Figura 5 - Morfologia dos filmes produzidos com amido de feijão modificado com OSA contendo (a,b) 0%, (c,d) 5% e (e,f) 10% de óleo essencial de casca de laranja	40

APÊNDICES

Figure S1 - Cromatograma de compostos voláteis do óleo essencial de casca de laranja. Os picos correspondem aos seguintes compostos: 1) α -tujeno, 2) (-)- α -pineno, 3) (+)- α -pineno, 4) β -felandreno, 5) β -mirceno, 6) α -felandreno, 7) δ -3-careno, 8) α -terpineno, 9) o-cimeno, 10) d-limoneno, 11) γ -terpineno, 12) (+)-4-careno, 13) α -copaeno e 14) limonen-6-ol, pivalato.....	67
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento experimental para produção de embalagens ativas de alimentos para conservação de bolos, com potencial antifúngico de filmes biodegradáveis de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja.....	27
Tabela 2 - Compostos voláteis do óleo essencial de casca de laranja.....	37
Tabela 3 - Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) e opacidade de filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja.....	43
Tabela 4 - Solubilidade em água, espessura, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água de filmes de amidos de feijão nativo e modificados com OSA e com a incorporação de óleo essencial da casca de laranja.....	48
Tabela 5 - Atividade antifúngica <i>in vitro</i> do óleo essencial de casca de laranja avaliada por difusão em ágar e microatmosfera.....	51
Tabela 6 - Atividade antifúngica <i>in vitro</i> de filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja avaliada por difusão em ágar e microatmosfera.....	52
Tabela 7 - Atividade antifúngica <i>in situ</i> de filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja utilizados como embalagem contra fungos viáveis durante o armazenamento de bolos.....	54

Sumário

1	Introdução	14
2	Objetivos	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivo específicos.....	16
3	Hipótese	16
4	Revisão bibliográfica.....	17
4.1	Filme biodegradáveis	17
4.2	Amidos como polímero para produção de filmes biodegradáveis.....	18
4.3	Amido de feijão.....	22
4.4	Modificação de amido com anidrido octenil succínico (OSA).....	24
4.5	Óleos essenciais com propriedades antifúngicas.....	22
4.6	Aplicação de filmes biodegradáveis em produtos de panificação.....	24
5	Material e métodos	26
5.1	Material	26
5.2	Delineamento experimental e métodos.....	26
5.3	Caracterização do óleo essencial da casca de laranja.....	27
5.3.1	Compostos voláteis do óleo essencial da casca de laranja – Cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS)	27
5.4	Elaboração dos filmes	28
5.5	Caracterização dos filmes com adição de óleo essencial de laranja.....	29
5.5.1	Morfologia.....	29
5.5.2	Cor e opacidade	29
5.5.3	Teor de umidade e solubilidade em água.....	30
5.5.4	Espessura e propriedades mecânicas.....	30
5.5.5	Permeabilidade ao vapor de água.....	31
5.5.6	Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial da casca de laranja	31
5.5.6.1	Preparação do inóculo.....	31
5.5.6.2	Teste de difusão em ágar.....	32
5.5.6.3	Teste de microatmosfera.....	32

5.5.7 Atividade antifúngica <i>in situ</i> dos filmes	33
5.5.7.1 Teste de difusão em ágar.....	33
5.5.7.2 Teste de microatmosfera.....	34
5.5.8 Preparação do bolo.....	34
5.5.9 Simulação de embalagens biodegradáveis ativas e atividade antifúngica in sito dos filmes	34
5.6 Análise estatística	36
6 Resultados e discussões.....	36
6.1 Compostos voláteis do óleo essencial da casca de laranja.....	36
6.2 Morfologia.....	37
6.3 Cor e Opacidade	41
6.4 Teor de umidade, solubilidade em água, espessura, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água.....	44
6.5 Atividade antifúngica in vitro	49
6.6 Atividade antifúngica in situ de filmes.....	53
7 Considerações finais	55
Referências Bibliográficas	56
Apêndice A.....	67

1 Introdução

O óleo essencial da casca da laranja (*Citrus sinensis* L.) é rico em compostos bioativos que, em sinergismo, atuam como agente antifúngico. O limoneno é o principal composto que tem um efeito eficaz contra fungos como *Penicillium crustosum* e *Aspergillus flavus* (ANDRADE *et al.*, 2020; SIMONA *et al.*, 2021). Os óleos essenciais são amplamente estudados para aplicações alimentares, como em produtos de panificação. Kringel *et al.* (2021) aplicaram óleo essencial de casca de laranja encapsulado em β -ciclodextrina como agente antifúngico em bolos. Silva *et al.* (2023) aplicaram este óleo essencial em oleogéis para a produção de pão. No entanto, as aplicações de filmes biodegradáveis contendo óleos essenciais de casca de laranja como embalagens ativas são escassas (EVANGELHO *et al.*, 2019; FATTAHI *et al.*, 2023). Os filmes biodegradáveis podem ser baseados em polímeros de fontes naturais, como polissacarídeos, destacando-se o amido, que confere excelentes propriedades de barreira e baixa solubilidade (BRUNI *et al.*, 2020; EVANGELHO *et al.*, 2019).

O uso de fontes alternativas de amido está crescendo em pesquisas, como o amido de feijão carioca para produção de filmes (EVANGELHO *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2017; VANIER *et al.*, 2019), apresentando excelentes propriedades de formação devido ao seu alto teor de amilose. O amido é capaz de formar filmes comestíveis, sendo promissor por suas propriedades como não ser tóxico e ser abundante, de baixo custo, renovável, biocompatível e biodegradável (PACHECO *et al.*, 2024). O amido pode ser modificado para ampliar suas aplicações, sendo o amido modificado com anidrido octenil succínico (OSA) uma alternativa eficaz para melhorar a interação com óleos essenciais. Essa modificação reduz a hidrofilicidade do amido devido à adição de grupos hidrofóbicos, favorecendo a formação de filmes coesos e estruturalmente intactos (PACHECO *et al.*, 2024; SOUZA *et al.*, 2025). Além disso, é seguro para aplicação em alimentos, atendendo os requisitos do Food Chemical Codex (FCC) (SOUZA *et al.*, 2025).

Os filmes à base de amido e incorporados com óleos essenciais podem ser aplicados como embalagens ativas, que interagem com o alimento, visando sua conservação e aumento do prazo de validade. Os filmes aqui produzidos alcançaram a sustentabilidade ao atingir os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS da ONU, Agenda 2030), como fome zero, saúde e bem-estar e ação climática. Isto é

conseguido através da utilização de conservantes naturais e materiais biodegradáveis na elaboração de filmes ativos. Uma possível aplicação para estes filmes é a conservação de bolos, desempenhando um papel vital na redução do desperdício alimentar na indústria de panificação e trazendo benefícios tanto para a economia como para o ambiente.

A contaminação fúngica é uma grande preocupação, uma vez que fungos como o *Penicillium* e o *Aspergillus* se encontram habitualmente nos produtos de panificação, levando à sua deterioração e representando riscos para a saúde devido à produção de micotoxina (INGLIS *et al.*, 2024). O óleo essencial de laranja, com as suas propriedades antifúngicas, inibe de forma eficaz o crescimento de fungos. Além disso, o seu aroma caraterístico costuma ser bem aceito pelos consumidores, tornando-o um composto ideal para incorporação em produtos de panificação, como bolos (KRINGEL *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2023).

Neste contexto, os filmes de amido de feijão carioca apresentam propriedades mecânicas e de barreira promissoras para elaboração de embalagens de alimentos, e a incorporação do óleo essencial de casca de laranja promove uma atividade antifúngica, que é eficaz na conservação de bolos (KRINGEL *et al.*, 2020). Portanto, este trabalho apresenta uma inovação ao utilizar o amido de feijão carioca modificado, uma fonte alternativa de amido ainda não explorada, para produzir filmes biodegradáveis com a incorporação de óleo essencial de casca de laranja. Além disso, o estudo destaca a aplicação desses filmes como embalagens antifúngicas e sustentáveis para a conservação de bolos, oferecendo uma alternativa natural e eficaz para o aumento da vida útil.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar o potencial antifúngico de filmes biodegradáveis à base de amidos de feijão nativo ou modificado com OSA, incorporados com óleo essencial de casca de laranja, visando sua aplicação como embalagem ativa para a conservação de bolos.

2.2 Objetivo específicos

- Formular e caracterizar filmes biodegradáveis à base de amido de feijão nativo e modificado com OSA contendo diferentes concentrações de óleo essencial de casca de laranja;
- Avaliar as propriedades físico-químicas, mecânicas e de barreira dos filmes;
- Avaliar a atividade antifúngica dos filmes frente a fungos deteriorantes de bolos;
- Avaliar a influência dos filmes ativos na conservação e vida útil dos bolos armazenados;
- Comparar a eficácia dos filmes ativos na preservação dos bolos.

3 Hipótese

Filmes de amido de feijão carioca apresentam propriedades mecânicas e de barreira promissoras para elaboração de embalagens de alimentos.

A incorporação de óleo essencial de casca de laranja promove atividade bioativa frente a fungos.

A aplicação de filmes de amido de feijão adicionados de óleo essencial de laranja em bolo aumenta sua vida útil.

4 Revisão bibliográfica

4.1 Filmes biodegradáveis

Filmes biodegradáveis são películas de espessura fina, preparado a partir de materiais biológicos, como polissacarídeos, proteínas, lipídios e derivados. Esses filmes podem atuar como barreira a elementos externos e proteger os produtos embalados de danos físicos, químicos e/ou biológicos, contribuindo assim para aumentar sua vida útil. Eles podem ser aplicados de várias formas, proporcionando boa aparência, aumentando a vida útil e mantendo as propriedades funcionais e sensoriais do alimento (GOMES *et al.*, 2016; HE *et al.*, 2023). A produção dos filmes pode ser realizada por meio da técnica de *Casting* clássica, na qual os filmes são obtidos pela evaporação de solvente em estufa. Ainda, pode se utilizar a técnica de *casting* contínuo, técnica por compressão térmica. (LEITE, 2019).

Os filmes também podem atuar como embalagens ativas, pois além de preservação do alimento, podem apresentar funcionalidade adicional como ser carreadores de substâncias antioxidantes e antimicrobianas. A embalagem ativa pode ser definida como um tipo de embalagem que prolonga a vida útil dos alimentos, aumentando a segurança ou mantendo as propriedades sensoriais e a qualidade do alimento. Existem várias formas estruturais das embalagens ativas como: cartões, filmes, etiquetas, sachês e vedantes para tampas “liners” (BRAGA, 2017). As propriedades mais importantes de embalagens ativas são a eliminação ou redução de O₂ e etileno, captação e emissão de CO₂, regulação de umidade, ser veículo de substâncias antimicrobianas, propiciar a liberação de antioxidantes e liberação ou adsorção de sabores e odores (HE *et al.*, 2023). A incorporação de compostos antifúngicos em filmes biodegradáveis é um recurso distinto para aumentar a segurança e a vida útil de alimentos prontos para o consumo (BODINI *et al.*, 2011).

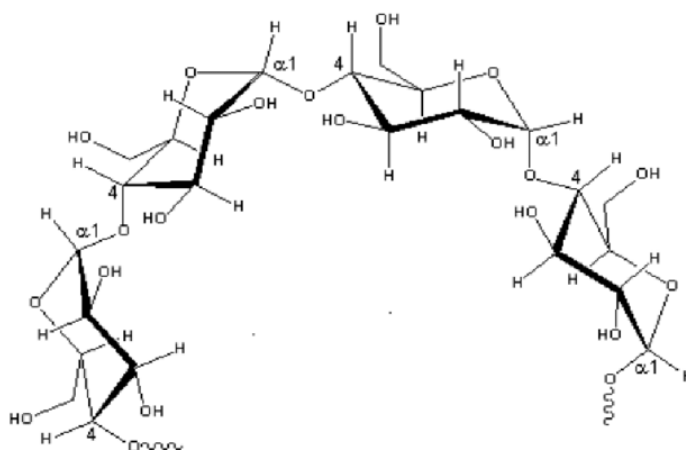
Os polímeros naturais, assim como aditivos naturais com propriedades ativas, são cada vez mais utilizados como alternativas para a elaboração de filmes, oferecendo uma substituição às embalagens sintéticas (EVANGELHO *et al.*, 2019). A escolha do material polimérico para a formulação dos filmes é de extrema importância, pois influencia as interações entre os componentes, impactando diretamente nas propriedades de barreira e mecânicas dos filmes (ALMEIDA *et al.*, 2013). Dentre os materiais utilizados, o amido tem se destacado por ser um polímero abundante e de

baixo custo, além de apresentar possibilidades de modificação química, física ou genética, originando filmes resistentes e biodegradáveis (EVANGELHO *et al.*, 2019).

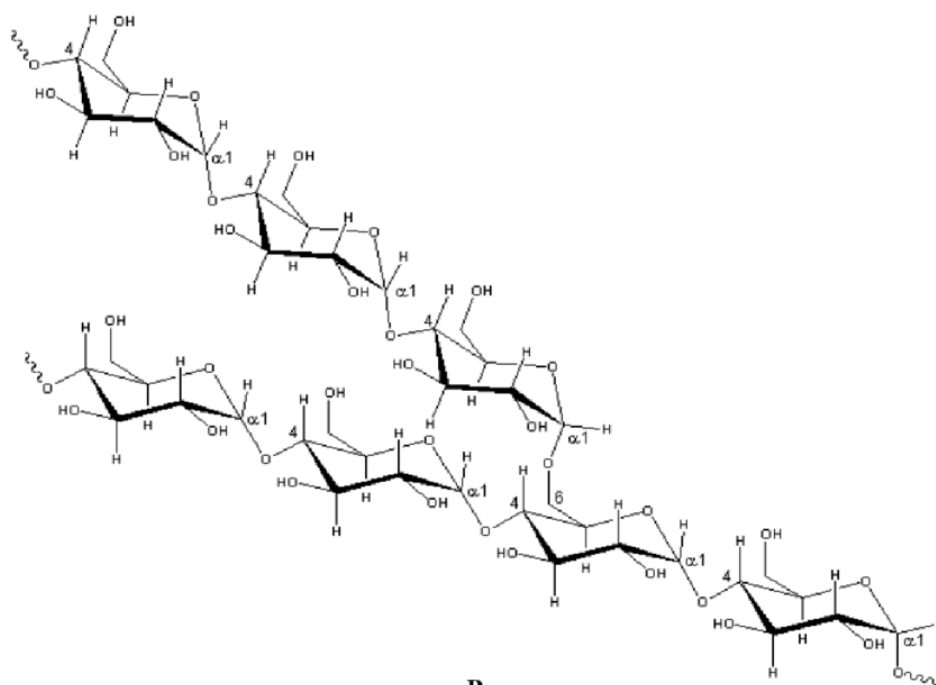
4.2 Amido como polímero para produção de filmes biodegradáveis

O amido é o polissacarídeo de armazenamento de maior abundância nas plantas, além de representar a maior fonte de carboidratos presentes na dieta humana (LIU *et al.*, 2021). É encontrado em vegetais e contribui em diversas propriedades nos produtos alimentícios, como agente de textura, espessante, estabilizador de colóides, agente gelificante e de volume, adesivo e na retenção de água. O amido é formado por dois tipos de polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina, os quais apresentam estruturas e funcionalidades diferentes. A amilose é um polímero linear que é composto por unidades de D-glicose ligadas por ligações α -1,4 e a amilopectina é um polímero ramificado, com unidades de D-glicose com ligações α -1,4 e ramificações em α -1,6 (Figura 1) (WARACZEWSKI; MUSZYŃSKI; SOŁOWIEJ 2022).

Figura 1 - A) Estrutura da amilose (polímero linear composto por D-glicoses unidas em α -1,4). B) Estrutura da amilopectina (polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α -1,4 e α -1,6).



A



B

Fonte: Adaptado de Lajolo & Menezes, 2006.

A aplicação do amido na produção de filmes baseia-se nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose para formação de géis e na sua habilidade para formar filmes. As moléculas de amilose em solução, devido à sua linearidade, aproximam-se o suficiente para formar ligações de hidrogênio entre hidroxilas de polímeros adjacentes. Como resultado, a afinidade do polímero por água é reduzida, melhorando a formação de pastas opacas e filmes resistentes (FREIRE, 2019).

Quando ocorre o aquecimento de uma solução de amido e água em uma certa temperatura, o grânulo de amido será submetido ao processo de formação de gel,

durante esse processo ocorre a ruptura das estruturas cristalinas do grânulo de amido, o qual absorve água e intumescce irreversivelmente, adquirindo tamanho maior que o original. A amilose encontrada no interior dos grânulos é liberada durante e após a gelatinização, formando uma fase contínua de gel ao redor destes grânulos, obtendo um aumento da viscosidade. (AZEVEDO *et al.*, 2018). Com a perda de calor da pasta de amido, após a sua gelatinização, as cadeias de amido ficam menos energéticas e as pontes de hidrogênio ficam mais fortes, fazendo com que as moléculas de amilose apresentem uma forte tendência a se associarem com ligações de hidrogênio a partir de moléculas de amilose adjacentes, formando uma estrutura ordenada, processo conhecido como retrogradação (WANG *et al.*, 2015). A firmeza de géis é causada pela retrogradação do amido, atribuída à formação de associação entre moléculas, que através da sinérese, originam-se géis mais firmes.

Na produção de filmes biodegradáveis quando incorporados de compostos bioativos o amido de milho modificado com OSA é reportado por Liu *et al.* (2024), os quais destacam benefícios como suas características anfifílicas e hidrofóbicas que contribuem para a liberação controlada de compostos bioativos, tornando esse material promissor para aplicações em sistemas de entrega de substâncias ativas.

4.3 Amido de feijão

O amido de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris L.*) tem despertado interesse crescente devido às suas propriedades únicas e potenciais aplicações industriais, especialmente no desenvolvimento de embalagens biodegradáveis para alimentos, como uma fonte abundante de amido. No Brasil, a variedade é a mais cultivada, representando aproximadamente 70% da produção, seguida pelo feijão preto, com cerca de 15% (DEMIATE *et al.*, 2016). Com o envelhecimento, o feijão carioca torna-se mais resistente ao cozimento, perdendo suas características sensoriais e reduzindo seu valor comercial. Esse fator o transforma em uma alternativa promissora para a extração de amido, especialmente em comparação com outras fontes convencionais. Dessa forma, a extração de amido surge como um aproveitamento estratégico para esse recurso ainda pouco explorado (SANTOS *et al.*, 2024).

O amido de feijão carioca possui características físico-químicas distintas. Por exemplo, pesquisas demonstraram que o amido de feijão carioca apresenta

estabilidade térmica até 257 °C, o que pode ser vantajoso em processos que envolvem altas temperaturas (FIGUEROA *et al.*, 2015).

A crescente demanda por materiais sustentáveis tem incentivado pesquisas sobre o uso do amido de feijão carioca na produção de embalagens biodegradáveis. Um estudo recente, desenvolveu bioplásticos a partir da combinação de amido de chuchu (*Sechium edule*) e amido de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*), avaliando suas propriedades físicas e biodegradabilidade em diferentes condições de solo (SAAVEDRA *et al.*, 2024). Outra pesquisa avaliou o efeito de modificações físicas e químicas sinérgicas no amido de feijão carioca, visando aprimorar as propriedades de filmes biodegradáveis produzidos a partir desse amido (EVANGELHO *et al.*, 2021).

Essas iniciativas ressaltam o grande potencial do amido de feijão carioca como matéria-prima para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis. O uso desse amido, além de proporcionar uma alternativa sustentável à produção de embalagens, atende às crescentes demandas por soluções ecologicamente responsáveis na indústria alimentícia, contribuindo para a redução do impacto ambiental e promovendo práticas mais sustentáveis no setor.

4.4 Modificação de amido com anidrido octenil succínico (OSA)

A modificação do amido com anidrido octenil succínico (OSA) é uma técnica amplamente utilizada para aprimorar as propriedades funcionais do amido, especialmente na indústria alimentícia. Essa modificação química envolve a esterificação dos grupos hidroxila do amido com o OSA, resultando em um produto com características anfifílicas, ou seja, que possui tanto afinidade por água quanto por óleo, tornando o amido modificado com OSA um excelente agente emulsificante, capaz de estabilizar emulsões óleo-em-água de forma eficaz (ALTUNA *et al.* 2018; PACHECO *et al.* 2024).

A modificação com OSA também influencia as propriedades reológicas do amido. Ao inibir as interações das cadeias de amilose e reduzir a formação de zonas de junção, o amido modificado forma géis mais fracos. Alterações na conformação molecular e na estrutura do amido podem resultar em mudanças significativas nas propriedades reológicas, afetando o manuseio, processamento e utilização dos alimentos aos quais o amido é adicionado. Além disso, a modificação com OSA melhora a hidrofobicidade do amido, tornando-o um agente emulsificante eficiente

(WON *et al.*, 2017; OLAWOYE *et al.*, 2023).

A segurança do uso de amido modificado com OSA em aplicações alimentícias é respaldada por órgãos reguladores. Nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou a adição de OSA para aplicações alimentares desde 1972, com a condição de que não exceda 3% do peso seco do amido (DEWI *et al.*, 2022)

Segundo Souza *et al.* (2024), o amido modificado com OSA é um polímero capaz de reter compostos voláteis dos óleos essenciais. Este fato deve possivelmente ao efeito de resistência térmica, quando utilizado como materiais de parede, o que diminui a taxa de transferência de calor e aumento a temperatura de pirólise. Siroha *et al.* (2022) relataram que após o tratamento com OSA, o poder de solubilidade dos amidos de milho perolado aumentou; essa propriedade dos amidos OSA acelera o processo de biodegradabilidade dos filmes e ajuda a manter um ambiente mais sustentável. A adição de amido modificado com OSA na elaboração de filmes biodegradáveis pode ser uma estratégia eficaz para melhorar suas propriedades físicas e funcionais. A modificação com OSA confere ao amido menor hidrofobicidade e boa estabilidade, podendo resultar em filmes com melhor resistência mecânica, maior flexibilidade e menor solubilidade em água. Além disso, essa modificação pode melhorar a compatibilidade do amido com outros polímeros e compostos lipofílicos, como óleos essenciais, favorecendo a formação de matrizes mais homogêneas e reforçadas.

4.5 Óleos essenciais com propriedades antifúngicas

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos e voláteis extraídos de componentes como raízes, flores, caules, folhas, sementes, frutos e outras partes das plantas (SÁNCHEZ *et al.* 2010). Esses compostos são muito utilizados na medicina, perfumaria e cosméticos há séculos e adicionados aos alimentos como especiarias. A extração dos óleos essenciais pode ser realizada por meio de diferentes métodos, como a hidrodestilação, destilação a vapor, hidrodifusão e extração por solvente (AZIZ *et al.*, 2018). A indústria de alimentos utiliza os óleos essenciais principalmente como aromatizantes, mas os mesmos representam também uma fonte antimicrobiana e antioxidante natural alternativa, podendo ser utilizados na conservação dos produtos alimentícios (HYLDGAARD *et al.*, 2012). Por apresentarem aromas intensos, o uso

direto de óleos essenciais em alimentos é limitado pois a concentração de compostos ativos neles é muito alta. O aroma intenso dos óleos essenciais, perceptível mesmo em concentrações muito baixas, pode afetar as propriedades sensoriais negativamente (LV *et al.*, 2011). Com isso, eles têm sido largamente utilizados incorporados em matrizes poliméricas, a exemplo da sua incorporação em filmes biodegradáveis, visando a obtenção de uma embalagem ativa que auxilia no aumento da vida útil e manter a qualidade sensorial, nutricional e microbiológica dos alimento (BAGHI *et al.*, 2022).

Os óleos essenciais são propostos como aditivos naturais promissores para embalagens de alimentos pois representam uma alternativa natural de bom funcionamento aos compostos antioxidantes sintéticos, como BHA (butil-hidroxianisol) ou BHT (butil-hidroxitolueno). A atividade antimicrobiana inerente dos óleos essenciais é parcialmente reduzida *in vitro*, uma vez que os compostos interagem com matrizes alimentares e diminuem a atividade antimicrobiana (SIMONA *et al.*, 2021). No entanto, o uso de óleos essenciais em embalagens de alimentos pode ser altamente recomendado pois tem a capacidade de funcionar como embalagem ativa; alguns compostos podem migrar gradualmente para os alimentos e melhorar suas propriedades. Certamente, a taxa de liberação é afetada pela estrutura e composição do material da embalagem. Os compostos de óleos essenciais incorporados em embalagens comestíveis podem ser liberados lentamente no alimento (MAISANABA *et al.*, 2017; SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

A contaminação microbiana dos alimentos representa um problema sério para os produtores, encurta a vida útil do produto e pode levar a infecções fatais em humanos (KARANTH *et al.*, 2023). Em um estudo sobre óleos essenciais de plantas pertencentes ao gênero *Citrus*, incluindo óleo essencial de laranja, contra diferentes patógenos de origem alimentar, o óleo essencial de laranja exibiu atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (EVANGELHO *et al.*, 2019). Torrez-alvarez *et al.* (2017) também relataram resultados que comprovaram o potencial antibacteriano e antioxidante do óleo essencial de laranja, destacando-o como uma alternativa para o desenvolvimento de produtos mais seguros e aceitos pelos consumidores que preferem ingredientes naturais. Este óleo essencial também tem sido estudado por suas atividades antioxidante e anti-hiperglicêmica (SILVA *et al.*, 2023). Segundo Farouk *et al.*, (2022), óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* L.

exibiu atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., este estudo usou do óleo de casca de *Citrus sinensis* L. e nanoemulsão como um agente antifúngico, juntamente com o efeito do ultrassom de alta intensidade nos constituintes químicos e na atividade das nanocápsulas de óleo.

O óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* L.), obtido da casca de frutas cítricas tem forte atividade contra o crescimento de fungos como *Penicillium Chrysogenum*, *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* (ANDRADE *et al.*, 2020), o que pode ser devido à alta quantidade relativa de compostos terpênicos, incluindo D-limoneno (90%–96%), mirceno (19%) e linalol (0,32%) (FATTAHI *et al.*, 2023). Tornando-se um produto ideal para conservar produtos de panificação, pois são suscetíveis à deterioração fúngica.

4.6 Aplicações de filmes biodegradáveis antifúngicos em produtos de panificação

Os produtos de panificação, como pães, bolos e biscoitos, são altamente perecíveis devido ao seu teor de umidade e presença de nutrientes favoráveis ao crescimento microbiano, armazenados em condições convencionais e sem conservantes. Esses produtos perdem qualidade como resultado do aumento da atividade de água, levando à deterioração microbiológica e consequentes perdas financeiras. Por esse motivo, conservantes químicos têm sido usados para estender a vida útil desses produtos. No entanto, os danos causados pelo uso indiscriminado de conservantes químicos e a busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis aumentaram a demanda por conservantes naturais (KRINGEL, 2021).

Entre os compostos naturais utilizados como conservantes em panificação estão os óleos essenciais, considerados uma ótima opção para atender a uma tendência global e à demanda por alimentos naturais chamados de alternativas *clean-label* (DEBONNE *et al.*, 2018). A adição de óleos essenciais em filmes biodegradáveis de amido pode atuar na conservação desses produtos, prolongando sua vida útil sem a necessidade de conservantes sintéticos (VALDÉS 2017).

Além da atividade antimicrobiana, a adição de óleos essenciais pode aprimorar as propriedades físico-químicas dos filmes biodegradáveis. Segundo estudos, a incorporação de óleo essencial de orégano em filmes de amido reduziu sua

permeabilidade ao vapor de água, além de aumentar a flexibilidade e resistência mecânica dos filmes, tornando-os mais adequados para aplicação na proteção de pães e outros produtos assados (FAKHOURI et al., 2018).

A aplicação prática desses filmes pode ser realizada de diferentes formas, como revestimento direto sobre os produtos ou como embalagens secundárias que liberam gradualmente os compostos ativos no ambiente de armazenamento (HAMED et al., 2022). Ensaios com pães embalados com filmes biodegradáveis contendo óleos essenciais indicaram redução significativa do crescimento fúngico e manutenção da qualidade sensorial por um período prolongado em comparação com pães armazenados em embalagens convencionais (KHOSRAVI-DARANI & BUCCI, 2015).

Sapper et al. (2018) elaboraram filmes baseados em misturas de amido e gelatina em proporções de 9:1 e 8:2 contendo óleo essencial de tomilho (*Thymus zygis*) emulsionado ou encapsulado em lecitina (0,25 ou 0,5 g/g de polímero). Os filmes com óleo essencial encapsulado em lecitina foram mais eficazes no controle do crescimento fúngico contra *Botrytis fuckeliana* que *Alternaria alternata*. No estudo de Noshirvani et al. (2017), o efeito dos óleos de canela e gengibre foi investigado em algumas propriedades biológicas, físicas e físico-químicas de filmes de quitosana-carboximetilcelulose emulsionados com ácido oleico. Observou-se que os efeitos antifúngicos aumentaram com o aumento da concentração dos óleos essenciais. Na comparação entre os óleos essenciais de canela e gengibre, verificou-se que o óleo de canela foi mais eficaz na inibição do crescimento de *Aspergillus niger*. A atividade antifúngica dos filmes contra *A. niger* foi avaliada por meio do método de difusão em disco.

Apesar dos avanços promissores, desafios ainda precisam ser superados para viabilizar a aplicação comercial dos filmes biodegradáveis de amido com óleos essenciais. Questões como a compatibilidade entre os componentes da matriz polimérica, a liberação controlada dos compostos voláteis e a aceitação sensorial pelos consumidores são aspectos que exigem mais pesquisas (REDONDO et al., 2024). No entanto, as evidências científicas apontam que essa tecnologia pode representar uma alternativa viável e sustentável para a conservação de produtos de panificação, alinhando-se às demandas do mercado por soluções ecológicas e seguras.

5 Material e métodos

5.1 Material

O amido de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*) foi extraído (nativo) e modificado com anidrido octenil succínico (OSA) em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, apresentando teores de amilose de 41,2% e 26,2%, respectivamente (PACHECO et al., 2024). A extração do amido do feijão carioca foi realizada de acordo com Rupollo et al. (2011), adaptado por Pacheco et al. 2024. A modificação do amido de feijão carioca com OSA foi realizada de acordo com Bai e Shi (2011), com adaptações de Pacheco et al. (2024). O óleo essencial da casa da laranja (*Citrus Sinensis* L.) foi adquirido da Ecocitrus.

Glicerol (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) foi usado como plastificante para produzir os filmes. O ágar dextrose de batata (PDA, CAT: K25-1022) foi adquirido da KASVI. Os fungos *Penicillium crustosum* QCP1 (número de acesso ao GenBank: MT582770) e *Aspergillus flavus* QCA2 (número de acesso ao GenBank: MZ317324) foram isolados de queijo e previamente caracterizados (dados não mostrados). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.2 Delineamento experimental

Na Tabela 1, está apresentado o delineamento experimental utilizado para elaboração e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja, com potencial antifúngico para conservação de bolos.

Tabela 1. Delineamento experimental para produção de embalagens ativas de alimentos para conservação de bolos, com potencial antifúngico de filmes biodegradáveis de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja.

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes
	Filmes de amido de feijão	Óleo essencial da casca da laranja (OECL)	
1		Controle	Caracterização do óleo essencial de casca de laranja
2	Nativo	5%	
3	Modificado	10%	
4	(OSA)*		Compostos voláteis: Cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM)
5			
6			Atividade antifúngica <i>in vitro</i>
			Caracterização dos filmes
			Microscopia eletrônica de varredura
			Cor e opacidade
			Espessura e propriedades mecânicas
			Umidade
			Solubilidade em água
			Permeabilidade ao vapor de água
			Atividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>
			Caracterização dos bolos
			Simulação de embalagens ativas
			Análise antifúngica

*OSA: Anidrido octenil succínico

OECL: Óleo essencial da casca da laranja

5.3 Caracterização do óleo essencial da casca de laranja

5.3.1 Compostos voláteis: Cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM)

Os compostos voláteis do óleo essencial de casca de laranja foram avaliados por microextração em fase sólida (SPME) combinada com cromatografia gasosa-

espetrometria de massa (GC-MS) (SILVA *et al.*, 2018). A análise foi realizada usando um sistema Shimadzu® GC-MS QP2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O processo de SPME começou com a preparação da amostra: 2,0 mg de óleo essencial foram dissolvidos em 10 mL de água ultrapura num frasco selado e vortexado. Uma alíquota de 10 µL desta solução foi subsequentemente adicionada a 5 mL de água ultrapura contendo 1 g de cloreto de sódio (NaCl). A mistura foi selada hermeticamente e homogeneizada com agitação magnética durante 15 minutos a 37 ± 1 °C. Uma fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), 50/30 µm (Supelco 57328-U®, Darmstadt, Alemanha), foi então exposta ao espaço livre da amostra durante 15 minutos nas mesmas condições. Após a extração, a fibra foi removida e inserida diretamente no injetor GC para dessorção térmica a 260 °C durante 15 minutos.

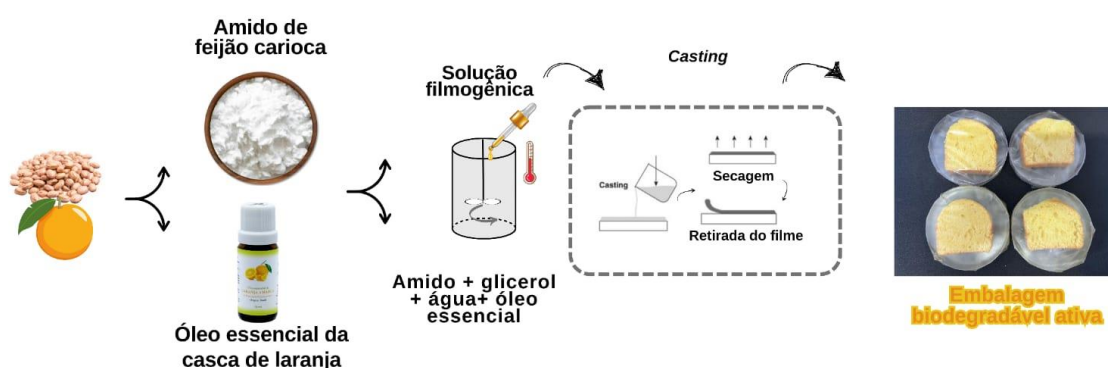
A separação cromatográfica foi efetuada utilizando uma coluna Rxi-1MS (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm) com o seguinte programa de temperatura: a temperatura inicial foi mantida a 40 °C durante 5 min, aumentada a 3 °C/min para 50 °C (mantida durante 0,5 min), seguida de um aumento a 5 °C/min para 120 °C (mantida durante 0,5 min). A temperatura foi então aumentada a 7 °C/min para 175 °C (mantida durante 0,31 min) e finalmente aumentada a 10 °C/min para 230 °C, que foi mantida durante 8 min. O espectrômetro de massa funcionou em modo de ionização de electrons (IE) a 70 eV, com uma gama de massas de 50-600 m/z. As temperaturas da fonte de íons e da interface foram fixadas em 200 °C e 290 °C, respetivamente. O gás de arraste utilizado foi o hélio (pureza 99,999%), com um fluxo de 1 mL/min.

5.4 Elaboração dos filmes

Os filmes foram produzidos utilizando a técnica de *casting*, de acordo com Evangelho *et al.* (2019), com adaptações. A solução filmogênica foi preparada com 4% (p/v) de amidos de feijão carioca nativo ou modificado por OSA em água destilada, utilizando 30% de glicerol (p/p, em relação a massa do amido) como plastificante. As soluções foram aquecidas numa placa de aquecimento (FISATOM, 752A, Brasil) com agitação magnética a 90 °C durante 30 minutos. Após resfriamento a 40 °C, o óleo essencial de casca de laranja foi adicionado nas concentrações de 5% e 10% (v/p, em relação à massa seca de amido) e homogeneizado em Ultraturrax (IKA®, T18B, Werke, Alemanha) a 7000 rpm por 3 min. Foi produzido um filme controle sem o óleo

essencial de casca de laranja (0%). As soluções filmogênicas (50 g) foram vertidas em placas de Petri de acrílico (15 cm de diâmetro). Em seguida, foram secas em estufa (Ethik Technology, Brasil) com circulação de ar a 30 °C durante cerca de 16 h. Após a secagem, as películas foram armazenadas a 21 °C e 32% de umidade relativa até a realização das análises.

Figura 2. Elaboração de solução fimogênica pela técnica de *casting*



Fonte: Autor, 2025.

5.5 Caracterização dos filmes de amido

5.5.1 Morfologia

A morfologia dos filmes foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (SEM, JEOL, JSM-6610LV, NJ, EUA). Para análise da secção transversal, as películas foram fraturadas com nitrogênio líquido e depois colocadas num stub; para análise de superfície, os filmes foram cortadas e colocadas nos stubs. As amostras foram revestidas com ouro utilizando um pulverizador catódico (Desk V, JEOL, EUA). As imagens da seção transversal e de superfície foram visualizadas utilizando uma tensão de aceleração de 10 kV, com aproximação de 500x para superfice e 300x transversal. As imagens foram registradas e armazenadas como micrografias (BRUNI *et al.*, 2020).

5.5.2 Cor e opacidade

A cor e a opacidade dos filmes foram determinadas conforme descrito por Evangelho *et al.* (2019) utilizando um colorímetro (3nh, NR 200, China). A cor e a

opacidade foram avaliadas pela média de cinco valores obtidos no centro do filme, sendo realizado em triplicata para cada amostra. Os filmes foram colocadas em uma placa branca definida como padrão e iluminante D65 (luz do dia) para determinar os parâmetros de cor. O parâmetro L^* indica a luminosidade, que varia de 0 (preto) a 100 (branco); os parâmetros a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade, em que a^* varia de verde (-) a vermelho (+) e b^* varia de azul (-) a amarelo (+). A diferença total de cor (ΔE^*) foi calculada utilizando a Equação 1, em que: $\Delta L^* = L_{\text{branco padrão}} - L_{\text{amostra}}$; $\Delta a^* = a_{\text{branco padrão}} - a_{\text{amostra}}$; $\Delta b^* = b_{\text{branco padrão}} - b_{\text{amostra}}$.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Eq.1})$$

A opacidade foi calculada como a relação entre a opacidade do filme (parâmetro “y”) sobreposta ao padrão preto (S_{black}) e ao padrão branco (S_{white}), de acordo com a Equação 2.

$$\text{Opacidade} = \frac{S_{\text{black}}}{S_{\text{white}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

5.5.3 Teor de umidade e solubilidade em água

O teor de umidade foi avaliado de acordo com o método da AACC (AACC, 1995) em estufa a 105 °C até atingir massa constante. Os resultados foram expressos em g/100 g.

A solubilidade em água foi calculada como a porcentagem de matéria seca do filamento solubilizado após imersão por 24 h em água a 25 °C. As medições foram realizadas em triplicata e calculadas pela Equação 3, em que “SW” é a porcentagem de matéria seca do filme solubilizado após imersão (%), “ M_i ” é a matéria seca inicial (g) e “ M_f ” é a matéria seca final (g) (BRUNI *et al.*, 2020).

$$SW = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

5.5.4 Espessura e propriedades mecânicas

A espessura dos filmes foi medida com um micrômetro digital (modelo Insize, China) em cinco pontos de amostragem diferentes em triplicata de cada filme. Os resultados foram expressos em mm (BRUNI *et al.*, 2020).

As propriedades mecânicas foram determinadas pela resistência à tração e pela porcentagem de alongação utilizando um texturômetro (TA.XTplus, Stable Micro Systems, UK), de acordo com o método ASTM D-882-91 (1995). A separação inicial

das garras foi fixada em 50 mm e a velocidade da sonda (pinça pneumática) em 1 mm/s. Os filmes foram cortados (85 mm × 25 mm) e fixados na sonda do texturômetro. As medições foram efetuadas em quadruplicata. A resistência à tração foi calculada pela Equação 4, em que “ RT ” é a resistência à tração (MPa), “ F_m ” é a força máxima no momento da rutura da filme (N) e “ A ” é a área da secção transversal (m²) e a elongação pela Equação 5, em que “ E ” é a elongação (%); “ d_i ” é a distância inicial de separação (cm) e “ d_r ” é a distância no momento da rutura (cm).

$$RT = \left(\frac{F_m}{A} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$E = \left(\frac{d_r}{d_i} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.5})$$

5.5.5 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi medida utilizando o método padrão E96-95-ASTM (ASTM, 1995). Os filmes foram colocados em células de permeação contendo cloreto de cálcio anidro (CaCl₂) (0% UR) e acondicionadas num dessecador contendo 30% (p/p) de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (75% UR). A permeabilidade ao vapor d'água foi analisada em triplicata e calculada pela Equação 6, em que “ PVA ” é a permeabilidade ao vapor d'água (g.mm/m².dia.KPa), “ m_{ab} ” a massa de umidade absorvida (g), “ t ” o tempo do período de incubação (s), “ e ” a espessura do filme (m), “ A ” a área de superfície exposta do filme (m²) e “ ΔP ” a diferença de pressão parcial através do filme (3,166 kPa).

$$PVA = \left(\frac{m_{ab}}{t} \frac{e}{A \cdot \Delta P} \right) \quad (\text{Eq. 6})$$

5.5.6 Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de casca da laranja

5.5.6.1 Preparação do inóculo

A preparação do inóculo fúngico foi realizada de acordo com as metodologias descritas por Gurgel *et al.* 2005. Culturas dos fungos *Penicillium crustosum* e *Aspergillus flavus* previamente armazenadas em ágar batata-dextrose (BDA) sob refrigeração (a 5 °C) foram transferidas para uma placa contendo o mesmo meio de cultura e incubadas a 25 °C por 5 dias em câmara de germinação (SolidSteel, SSGFa,

Brasil). Após o período de incubação, 2 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl, Synth, Brasil) foram adicionados à superfície das culturas. A suspensão resultante foi cuidadosamente removida, evitando-se a coleta de fragmentos do meio de cultura, transferida para tubos estéreis para ser diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,85%, Synth, Brasil) e padronizada de acordo com a escala de McFarland para uma concentração de 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para o teste de microatmosfera, diluições seriadas foram feitas para obter um inóculo padronizado entre aproximadamente 10^5 e 10^6 UFC/mL. Finalmente, 0,1 mL da solução fúngica padronizada foi inoculada homogeneamente na superfície de placas de Petri contendo BDA (diâmetro de 90 mm).

5.5.6.2 Teste de difusão em ágar

A análise de difusão em ágar foi realizada seguindo a metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) com adaptações. O teste foi iniciado com a colocação de três discos de papel de filtro estéreis (4 mm de diâmetro) em cada placa, posicionados equidistantes sobre a superfície do ágar dextrose de batata em placas de Petri previamente semeadas com inóculo de fungos, conforme descrito anteriormente. Um dos discos foi impregnado com água destilada estéril (controle negativo), enquanto os outros dois foram tratados com óleo essencial de casca de laranja nos volumes de 2,5, 5, 10 e 20 µL. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 25 °C em câmara de germinação (Sol idSteel, SSGFa, Brasil). Após 3, 5 e 8 dias de incubação, as placas foram examinadas quanto ao aparecimento de halos de inibição ao redor dos discos de papel, medidos em mm com paquímetro universal (FORTG, FG8330, Brasil). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

5.5.6.3 Teste de microatmosfera

A análise de microatmosfera foi realizada seguindo a proposta de Ghabraie et al. (2016), com algumas modificações. Um teste de microatmosfera foi utilizado para determinar a ação volátil do óleo essencial de casca de laranja aplicado nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 µL em papel de filtro estéril (40 × 40 mm) fixado à tampa de placas de Petri. Essas mesmas placas continham ágar dextrose de batata semeado com fungos, conforme descrito anteriormente. Uma solução composta de

água destilada estéril e Tween 80 (1%, v/v, 9005-65-6, Labsynth) foi preparada e utilizada para a diluição do óleo essencial. A mistura foi ajustada para um volume final uniforme de 200 µL, garantindo a distribuição homogênea do óleo essencial no papel de filtro em todas as concentrações testadas. Solução salina estéril (0,85% de NaCl, Synth, Brasil) foi utilizada como controle positivo de crescimento. As placas foram seladas com parafilme e incubadas invertidas (tampas voltadas para baixo) a 25 °C por 3 dias em câmara de germinação (SolidSteel, SSGFa, Brasil). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas. Os resultados foram expressos como redução percentual no crescimento fúngico e calculados de acordo com a Equação 7, onde Cc é o crescimento do controle (sem óleo essencial de casca de laranja) e Ct é o crescimento do tratamento com óleo essencial de casca de laranja.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{C_c - C_t}{C_c} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

5.5.7 Atividade antifúngica *in vitro* dos filmes

5.5.7.1 Teste de difusão em ágar

A análise de difusão em ágar foi efetuada de acordo com a metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) utilizando os fungos *Penicillium crustosum* e *Aspergillus flavus*, com adaptações. Os filmes foram cortados em discos de 4 mm de diâmetro e colocados equidistantemente na superfície do meio de cultura em placas. Em cada placa, um dos discos foi preparado sem óleo essencial de casca de laranja, atuando como um controle negativo, enquanto os outros dois continham óleo essencial de casca de laranja em concentrações de 5% ou 10%. As placas foram hermeticamente fechadas para evitar a dispersão de voláteis e incubadas a 25 °C numa câmara de germinação (SolidSteel, SSGFa, Brasil). As zonas de inibição do crescimento dos fungos foram avaliadas nos dias 3, 5 e 8 de incubação. As zonas de inibição foram medidas com auxílio de um paquímetro digital (FORTG, FG8330, Brasil) e seu resultado expresso em mm.

5.5.7.2 Teste de microatmosfera

A análise da microatmosfera foi realizada seguindo a proposta de Ghabraie *et al.* (2016), com algumas modificações. Os filmes com óleo essencial de casca de laranja nas concentrações de 0, 5 e 10% foram cortados (40 x 40 mm) e avaliados pela ação dos voláteis. Os filmes foram fixados na parte superior das placas. As placas contendo apenas o crescimento dos fungos foram utilizadas como controle. As placas foram seladas com parafilme e incubadas invertidas (tampas voltadas para baixo) a 25 °C por 3 dias em uma câmara de germinação (SolidSteel, SSGFa, Brasil). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas. Os resultados foram expressos em percentagem de redução do crescimento fúngico e calculados de acordo com a Equação 7.

5.5.8 Preparação dos bolos

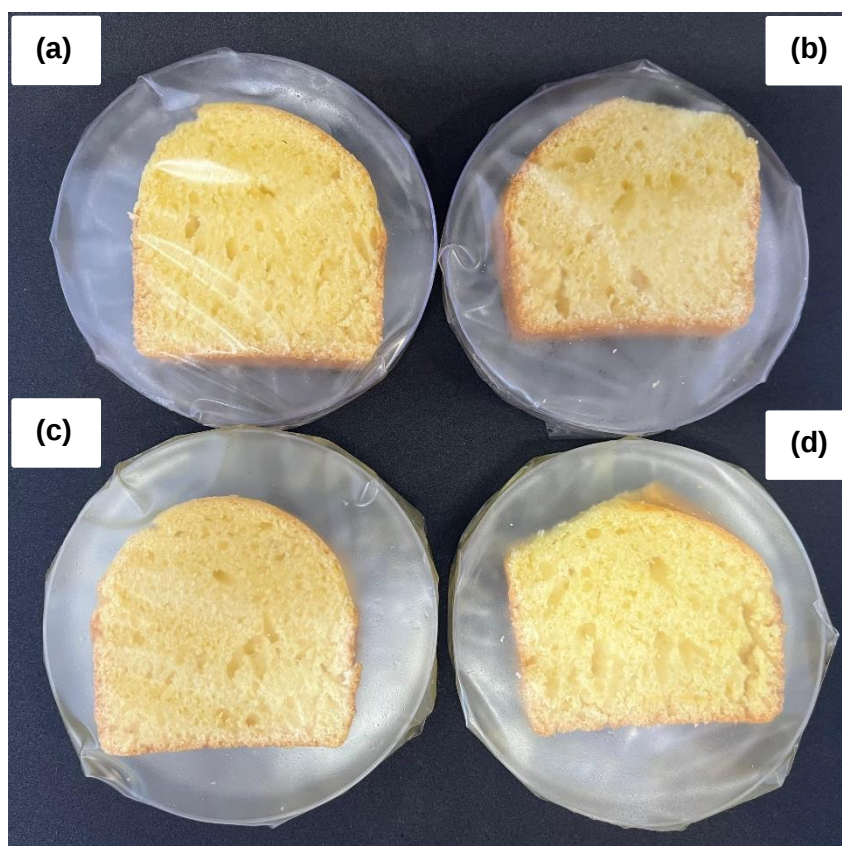
Os bolos foram preparados em laboratório, de acordo com metodologia proposta por (HASHEMINYA & DEHGHANNYA, 2024). A formulação utilizada consistiu em 495 g de farinha de trigo, 240 g de açúcar, três ovos (152 g), 82 g de gordura vegetal, 247 g de leite (líquido) e 11 g de fermento em pó. Os ingredientes foram adicionados ao poucos e após homogeneizados em batedeira (Britânia, 340W) por um período de 5 a 10 minutos. Em seguida, a massa foi transferida para uma forma retangular e submetida à cocção em forno pré-aquecido a 180 °C por 40 minutos. Após o processo de cocção, os bolos foram resfriados à temperatura ambiente e posteriormente fracionados em porções de 25 g.

5.5.9 Simulação de embalagens biodegradáveis ativas e atividade antifúngica *in situ* dos filmes

Os filmes biodegradáveis ativos com 10% de óleo essencial de casca de laranja foram selecionadas para análise *in situ*, enquanto os sem óleo essencial de casca de laranja (0%) serviram de controle. A escolha deste filme foi em virtude dos resultados obtidos na análise *in vitro* pelos testes de difusão em ágar e de microatmosfera. O objetivo foi utilizar o filme como uma embalagem bioativa, e pela volatilização dos compostos contribuir para a conservação do bolo. O sistema experimental foi desenvolvido com base no método descrito por Hasheminya e Dehghannya (2024),

com algumas modificações. Fatias do bolo preparado foram colocadas em placas de petri estéreis (XX mm) e cobertas com filmes de amido nativo ou modificado com OSA contendo 0% e 10% de óleo essencial de casca de laranja (Figura 3). As embalagens foram hermeticamente fechadas com parafilme e armazenadas em condições controladas a 22 °C e aproximadamente 40% de umidade relativa. Nos dias de armazenamento 0, 3, 6 e 9, as amostras de bolo foram analisadas.

Figura 3. Simulação de embalagem ativa em alimento: filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja para avaliar a atividade antifúngica *in situ* em bolos.



(a) filme de amido nativo controle (0% de óleo essencial de casca de laranja), (b) filme de amido modificado com OSA controle (0% de óleo essencial de casca de laranja), (c) filme de amido nativo com 10% de óleo essencial de casca de laranja e (d) filme de amido modificado com OSA com 10% de óleo essencial de casca de laranja.

A atividade antifúngica de filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja utilizados como embalagem de bolo foi avaliada de acordo com Ribes *et al.* (2018), com algumas adaptações. Para isso foi realizada a quantificação de fungos em fatias de bolo (25 g), que foram colocadas em frasco com 225 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl, Synth, Brasil) e homogeneizadas por 1 min. Diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) foram então preparadas. De cada diluição,

0,1 mL foi inoculado na superfície de placas de ágar batata dextrose (PDA), espalhado uniformemente e incubado a 25 °C em uma câmara de germinação (SolidSteel, SSGFa, Brasil). A contagem de fungos (Log UFC/g) foi realizada após 3 dias de incubação. A análise foi realizada em triplicata.

5.6 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e submetidas a análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

6. Resultados e discussão

6.1 Compostos voláteis do óleo essencial da casca de laranja

A microextração em fase sólida (SPME) utilizando a fibra DVB/CAR/PDMS extraiu eficazmente 14 compostos voláteis do óleo essencial de casca de laranja, podemos observar os picos que correspondem aos compostos identificados por CG-EM na Figura S1 no apêndice A. O principal componente volátil encontrado no óleo essencial de casca de laranja foi o D-limoneno (94,25%), um composto amplamente documentado neste óleo essencial (RAZOLA-DÍAZ *et al.*, 2021). Adicionalmente, este óleo essencial contém β -mirceno (3,06%), um hidrocarboneto monoterpeneo presente em menores quantidades, e outras substâncias com quantidades inferiores a 1% (Tabela 2).

Os óleos essenciais, tal como outros compostos derivados do metabolismo especializado das plantas, são sintetizados em quantidades e composições químicas que variam de acordo com fatores genéticos, morfogênicos e ambientais. O acúmulo destes compostos é frequentemente uma estratégia adaptativa utilizada pelas plantas para responder a alterações nas condições ambientais. Consequentemente, são observadas variações na composição química do óleo essencial de casca de laranja em função do local de cultivo (KHALID, 2021), da época de colheita (ABD ELGHANI *et al.*, 2023), da cultivar e do estágio de maturação do fruto (FERRER *et al.*, 2022). Os compostos identificados no presente estudo foram relatados na maioria dos estudos anteriores encontrados na literatura (RAZOLA-DÍAZ *et al.*, 2021). Em geral, para além do componente principal D-limoneno, estão também presentes outros compostos como os pinenos, o mirceno e o felandreno (ANDRADE *et al.*, 2020; FERRER *et al.*, 2022; RAZOLA-DÍAZ *et al.*, 2021). Além disso, não foram identificados monoterpeneos

oxigenados, o que reflete a qualidade dos óleos essenciais (FARAHMANDFAR *et al.*, 2020).

A concentração de componentes químicos nos óleos essenciais pode ter um impacto significativo na sua atividade biológica. O D-limoneno foi descrito como um agente antifúngico de largo espectro. Pode ter como alvo estruturas-chave nas membranas celulares dos fungos, como o ergosterol e o β -1,3-glucano (LIN *et al.*, 2024). Além disso, foi demonstrado que o D-limoneno modula a expressão genética em fungos, afetando genes que codificam enzimas-chave envolvidas na produção de ATP mitocondrial e na regulação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, perturba a biossíntese da parede e da membrana celular dos fungos (Lin *et al.*, 2024).

Tabela 2. Compostos voláteis do óleo essencial de casca de laranja.

Nº	TR*	Nome do composto	Classe	Fórmula	%
1	8,304	α -tujeno	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₈ O	0,12
2	8,394	(-)- α -pineno	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	0,04
3	8,505	(+)- α -pineno	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	0,15
4	10,143	β -felandreno	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	0,20
5	11,272	β -mirceno	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	3,06
6	11,577	α -felandreno	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	0,19
7	11,898	δ -3-carene	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	0,22
8	12,134	α -terpineno	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	0,24
9	12,279	o-cimene	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₄	0,29
10	12,789	d-limoneno	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₄	94,25
11	13,759	γ -terpineno	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	0,35
12	14,826	(+)-4-carene	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆	0,42
13	23,676	α -copaene	Sesquiterpeno	C ₁₅ H ₂₄	0,22
14	24,689	limoneno-6-ol, pivalato	Álcool	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	0,25

*TR: Tempo de retenção.

6.2 Morfologia

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para investigar a morfologia com micrografias que ilustram as propriedades da superfície e da secção transversal dos filmes à base de amido nativo (Figura 4) e de amido modificado com OSA (Figura 5). Nos filmes de amido nativo e modificado sem óleo essencial de casca de laranja (Figuras 4a e 5a, respetivamente), observou-se uma superfície contínua

com ligeiras ondulações. A seção transversal do filme de amido nativo, na ausência de óleo essencial, mostrou uma estrutura com fissuras (Figura 4b).

A adição de 5% de óleo essencial ao filme de amido nativo (Figura 4c) aumentou a homogeneidade da seção transversal; porém, na maior concentração de óleo essencial (10%), houve uma redução da homogeneidade. Esse comportamento também foi relatado por Evangelho *et al.* (2019), que desenvolveram filmes de amido de milho com óleo essencial de casca de laranja e relataram uma redução na homogeneidade dos filmes contendo óleo essencial de laranja. Segundo esses autores, a heterogeneidade do filme, como a presença de caminhos preferenciais (poros), pode potencializar suas propriedades antibacterianas ao promover a difusão do óleo essencial da matriz polimérica para a superfície.

Os filmes à base de amido modificado com OSA apresentaram uma estrutura mais uniforme (Figura 5b) em comparação com os de amido nativo. A natureza anfifílica do amido modificado com OSA aprimorou as propriedades morfológicas das filmes de amido OSA com óleo essencial, aumentando a estabilidade e a homogeneidade da solução fílogênica. Este comportamento pode ser atribuído às interações hidrofóbicas entre o óleo essencial de casca de laranja e o amido modificado com OSA. As morfologias obtidas neste estudo não mostraram a presença de gotículas de óleo essencial, em contraste com os achados de Andrade *et al.* (2020), que elaboraram filmes de poli (butileno adipato-co-tereftalato) com óleo essencial de casca de laranja. Eles relataram que a presença de gotículas de óleo essencial poderia ser atribuída à dificuldade que o óleo essencial causou para as cadeias de polímero se agregarem, resultando em uma estrutura mais aberta.

Figura 4. Morfologia da superfície e seção transversal dos filmes produzidos com amido de feijão nativo contendo 0% (a,b), 5% (c,d) e 10% (e,f) de óleo essencial de casca de laranja.

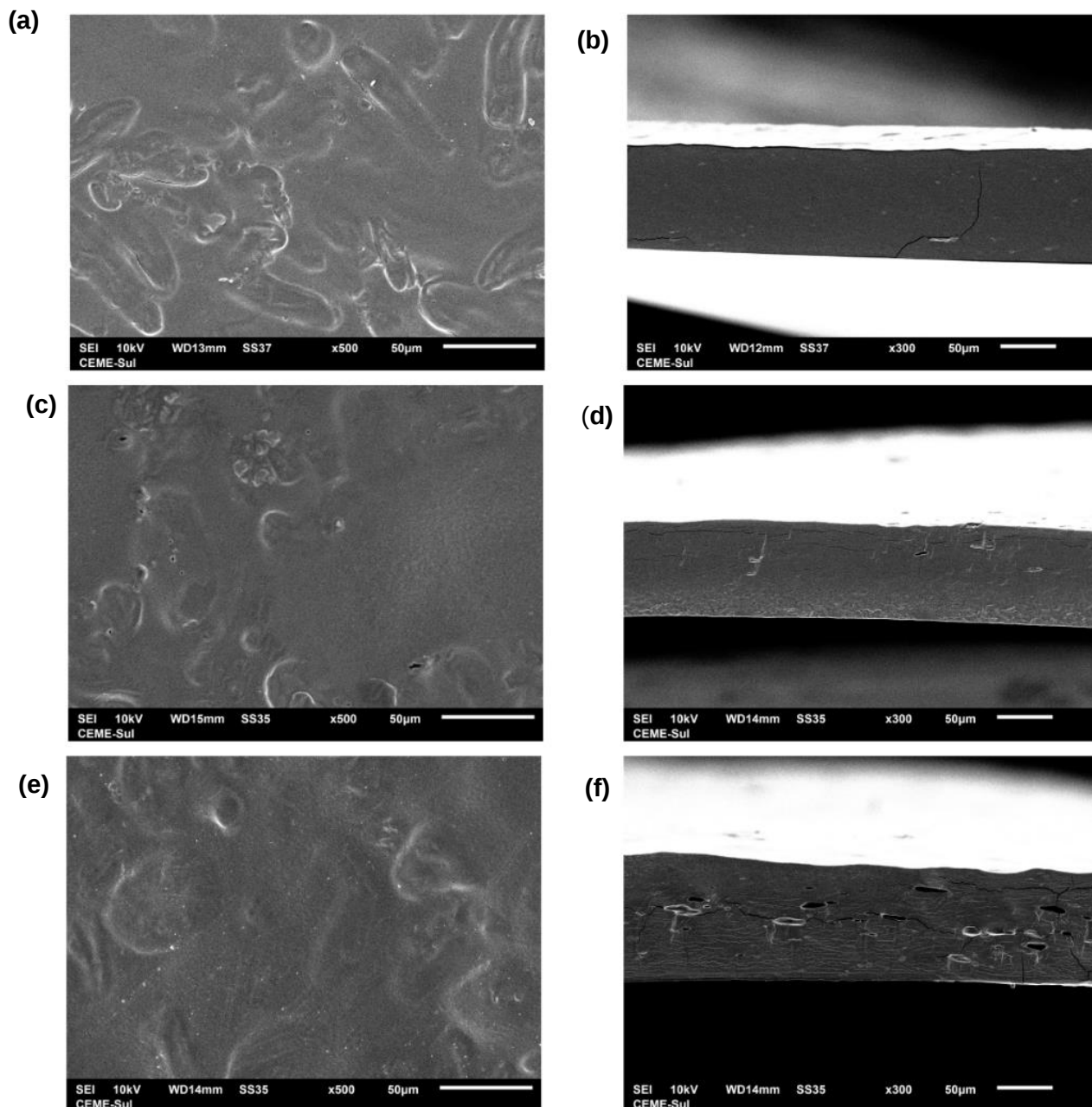
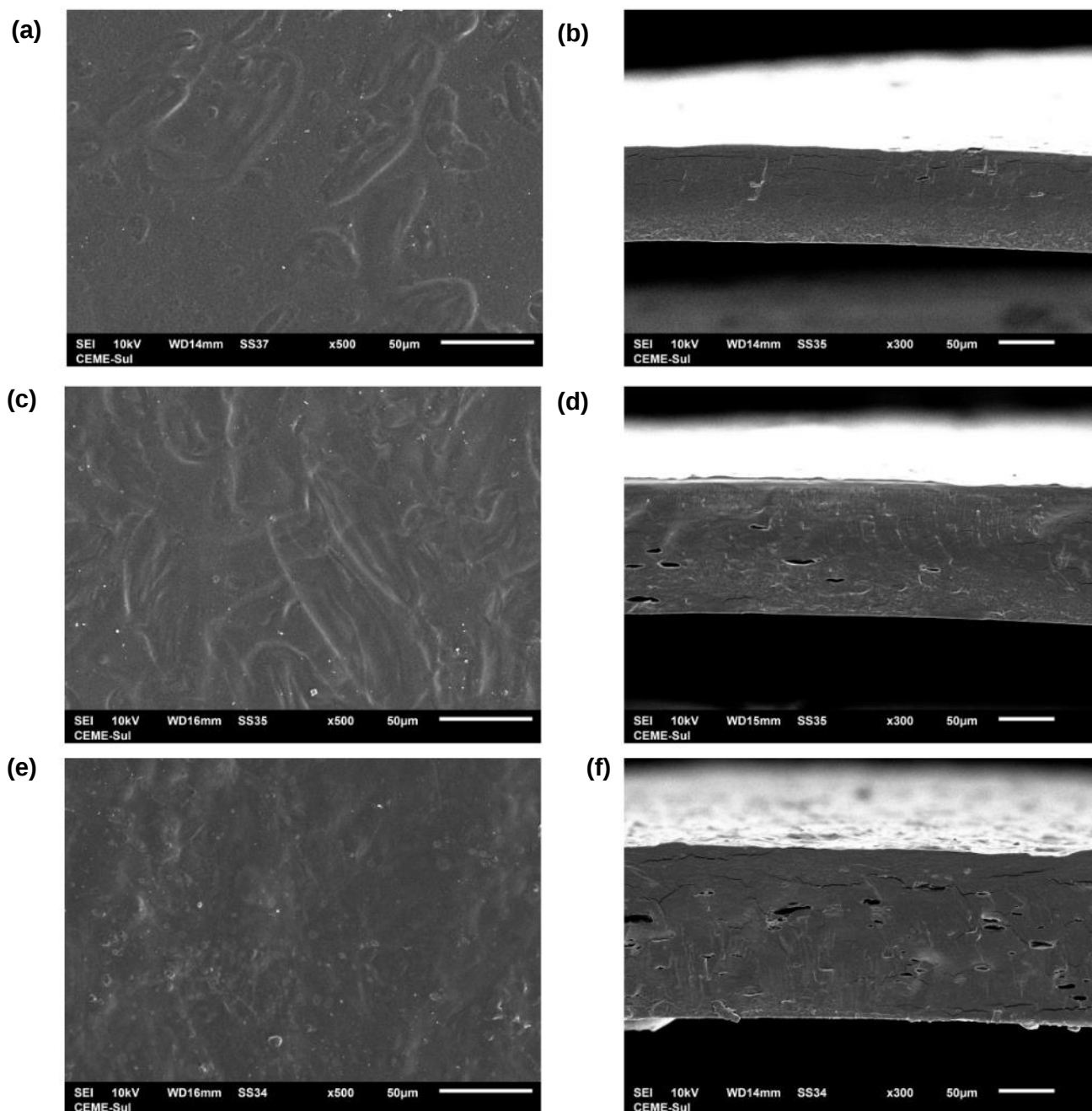


Figura 5. Morfologia da superfície e seção transversal dos filmes produzidos com amido de feijão modificado com OSA, contendo 0% (a,b), 5% (c,d) e 10% (e,f) de óleo essencial de casca de laranja.



6.3 Cor e Opacidade

Os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , ΔE^*) e opacidade dos filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja estão descritos na Tabela 3. A luminosidade (L^*) dos filmes variou de 96,22 a 97,00, demonstrando sua alta refletância, já que os valores foram próximos de 100. As coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) indicaram uma tendência para o verde e o amarelo. A adição de óleo essencial de casca de laranja aos filmes resultou em valores significativamente mais altos de b^* , indicando uma cor mais amarela, o que já era esperado devido à tonalidade do óleo essencial de casca de laranja.

Evangelho *et al.* (2019), ao incorporarem óleo essencial de casca de laranja em filmes de amido de milho, obtiveram um comportamento um pouco diferente, pois o filme controle apresentou valores de b^* que não diferiram daqueles com o óleo essencial. Sugere-se que esse comportamento pode estar relacionado às diferentes concentrações de óleo essencial de casca de laranja nos filmes, à variedade da laranja utilizada na extração do óleo essencial e/ou ao método de extração do óleo essencial de casca de laranja. O valor da diferença cromática total (ΔE^*) variou entre 1,88 e 7,64, sendo que os filmes com maior concentração de óleo essencial de casca de laranja (10% p/v) apresentaram significamente a maior diferença. Em contrapartida, os filmes sem adição de óleo essencial de casca de laranja apresentaram as menores diferenças. Essa modificação pode ser considerada positiva em aplicações onde uma mudança visual seja desejável, como em sistemas de embalagem ativa com apelo visual funcional ou como possível indicativo de presença de compostos bioativos. Por outro lado, os menores valores de ΔE^* observados nos filmes sem adição de óleo essencial sugerem estabilidade visual, o que pode ser vantajoso em aplicações que demandam maior transparência ou aparência neutra. Assim, a escolha da concentração do óleo deve considerar o equilíbrio entre funcionalidade e impacto visual, de acordo com o uso pretendido do material.

Relativamente à opacidade dos filmes, não se verificou uma tendência de aumento ou diminuição com a incorporação do óleo essencial de casca de laranja. A opacidade é uma propriedade importante, pois define a quantidade de luz que é capaz de atravessar o material, como é o caso dos filmes de embalagem. A capacidade de discernir os produtos embalados depende precisamente da opacidade (TRIPATHI *et al.*, 2022). Assim, o resultado observado neste trabalho, de que a incorporação do

óleo essencial de casca de laranja não aumentou a opacidade dos filmes é promissor para a utilização destes materiais como embalagem de alimentos.

Tabela 3 - Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) e opacidade de filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja.

Filme de amido de feijão **	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidade (%)
Nativo 0%	97,00 ± 0,35 ^a	-0,29 ± 0,32 ^a	1,01 ± 0,14 ^d	1,88 ± 0,46 ^d	8,55 ± 0,39 ^{ab}
Nativo 5% OECL	96,59 ± 0,32 ^{ab}	-1,39 ± 0,18 ^{bc}	3,35 ± 0,36 ^{bc}	3,92 ± 0,33 ^c	8,23 ± 0,21 ^c
Nativo 10% OECL	96,22 ± 0,25 ^b	-2,32 ± 0,18 ^d	7,31 ± 0,77 ^a	7,64 ± 0,80 ^a	8,05 ± 0,22 ^c
OSA-modificado 0%	96,97 ± 0,27 ^a	-0,25 ± 0,18 ^a	0,95 ± 0,08 ^d	1,88 ± 0,32 ^d	8,64 ± 0,16 ^a
OSA-modificado 5% OECL	96,72 ± 0,26 ^{ab}	-1,37 ± 0,22 ^b	3,11 ± 0,41 ^c	3,67 ± 0,48 ^c	8,33 ± 0,12 ^{bc}
OSA-modificado 10% OECL	96,25 ± 1,19 ^b	-1,71 ± 0,47 ^c	4,07 ± 1,21 ^b	4,86 ± 1,40 ^b	8,63 ± 0,21 ^a

Os resultados são expressos como a média ($n = 3$) ± desvio padrão.

^{a,b,c,d} Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p > 0,05$).

** Filmes de amido de feijão nativo ou modificado por OSA com 0%, 5% ou 10% (v/p) de óleo essencial de casca de laranja (OECL).

6.4 Teor de umidade, solubilidade em água, espessura, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água

Os resultados do teor de umidade, solubilidade, espessura, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água são apresentados na Tabela 4. O teor de umidade variou de 15,3% a 24,2%. Esses valores já eram esperados e são semelhantes aos relatados na literatura (EVANGELHO et al., 2019). A solubilidade dos filmes variou de 19,6% a 38,0%. A adição de óleo essencial de casca de laranja não afetou significativamente o teor de umidade e a solubilidade, exceto na comparação entre o filme de amido nativo com 5% e o filme de amido modificado com OSA com 10% de óleo essencial de casca de laranja. Sharma et al. (2021) produziram e avaliaram filmes de amido nativo de feijão-miúdo (*Phaseolus vulgaris*) com concentrações variáveis de nanopartículas de amido de feijão, formando um biocompósito. Esses autores encontraram um valor de solubilidade de 10,5% para os filmes de amido sem a adição de nanopartículas de amido, valor inferior ao observado no presente estudo. Essa diferença pode ser atribuída à utilização de uma variedade diferente de feijão, a concentração de polímero, quantidade de plastificante, tempo de secagem, composto adicionado.

A solubilidade em água de um filme biodegradável é uma característica essencial, pois determina sua viabilidade para diversas aplicações, permitindo a seleção das melhores formulações para o acondicionamento de alimentos. Em geral, para preservar a integridade do alimento embalado, o filme deve ter baixa solubilidade (LU et al., 2022). Vários parâmetros podem influenciar significativamente nas propriedades físico-químicas dos filmes, como as modificações no amido (tipo e grau de modificação) e a adição e concentração de compostos, como de óleos essenciais. A modificação química do amido visa adicionar ou substituir grupos funcionais na sua estrutura molecular, o que pode afetar várias propriedades dos filmes com ele produzidos. Quando se utiliza a modificação por OSA, os grupos hidrofílicos do amido são substituídos por grupos hidrofóbicos de OSA, levando à quebra das ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila e as moléculas de água (FATIMA et al., 2024). Neste estudo, a modificação não afetou significativamente a solubilidade, como esperado, devido à hidrofobicidade do amido modificado com OSA.

Embora a adição de grupos hidrofóbicos ao amido tenha geralmente como objetivo reduzir a sua solubilidade em água, em alguns casos, este efeito pode não

ocorrer como esperado. Isto pode ser atribuído a vários fatores, como a distribuição desigual dos grupos hidrofóbicos ao longo da cadeia de amido, que pode impedir a formação de uma barreira eficaz contra a água. Além disso, alterações na estrutura cristalina do amido podem neutralizar ou mesmo reverter o efeito da hidrofilação, comprometendo a redução da solubilidade.

No que diz respeito à incorporação de óleos essenciais, a sua dispersão na matriz biopolimérica pode reduzir a solubilidade em água do filme, dificultando a difusão da umidade. Essa tendência é mais acentuada à medida que a concentração de óleo essencial aumenta (FATTAHI et al., 2023). A variação da solubilidade também está relacionada com a hidrofobicidade do óleo essencial incorporado (VIANNA et al., 2021). Estudos mostram que o óleo essencial pode aumentar ou diminuir a solubilidade. Por exemplo, o óleo essencial de laranja em filmes de amido de milho aumentou a solubilidade (EVANGELHO et al., 2019), enquanto o óleo essencial de canela, em concentrações de 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% e 2,5% (p/v) em filmes de mandioca reduziu a solubilidade de 52,8% (controle) para 42,5%, 24,2%, 18,7%, 16,1% e 29,0%, respectivamente (ZHOU et al., 2021).

A composição da matriz polimérica influencia também a espessura dos filmes que apresentaram valores que variaram de 0,098 mm (filme de amido modificado com OSA sem óleo essencial de laranja) a 0,121 mm (filme de amido nativo com 10% de óleo essencial de casca de laranja). Essas alterações podem estar relacionadas com os diferentes teores de umidade (Tabela 4) dos filmes. O filme de amido nativo com 10% de óleo essencial de casca de laranja apresentou significativamente maior espessura em comparação com o filme de amido nativo com 5% de óleo essencial de casca de laranja e o filme modificada com OSA sem óleo essencial. De acordo com Zhou et al. (2021), o aumento da espessura do filme deve-se à interação e ligação física entre o filme e o óleo essencial, bem como à formação de microgotículas do óleo essencial hidrofóbico durante a homogeneização da solução formadora do filme.

As propriedades mecânicas são cruciais para avaliar a integridade estrutural dos filmes de amido. Como apresentado na Tabela 4, a modificação com OSA e a incorporação do óleo essencial de casca de laranja, em diferentes concentrações, não afetaram a resistência à tração dos filmes. No entanto, o alongamento na ruptura diminuiu no filme de amido modificado com OSA e adicionado de 10% de

óleo essencial de casca de laranja em comparação com o filme de amido modificado com OSA controle (sem óleo essencial de casca de laranja).

Vários estudos demonstraram que a resistência à tração dos filmes pode ser aprimorada por meio da incorporação de óleos essenciais (CAI et al., 2020; SONG et al., 2018). No entanto, outros estudos também relatam uma diminuição desta propriedade devido à incorporação de óleos essenciais (EVANGELHO et al., 2019; ZHOU et al., 2021). Ao comparar a resistência à tração dos filmes desenvolvidos neste estudo com os reportados por Evangelho et al. (2019) e Zhou et al. (2021), é evidente que os filmes deste estudo exibiram valores mais elevados para os parâmetros avaliados. Zhou et al. (2021) reportaram que a redução da resistência à tração de filmes contendo óleos essenciais pode ser atribuída à penetração do óleo essencial na rede de biopolímeros e às interações intra e intermoleculares dentro dos constituintes hidrofóbicos, que consequentemente enfraquecem a matriz contínua dos filmes. Além disso, os óleos essenciais podem ter um forte efeito plastificante, o que pode aumentar a flexibilidade dos filmes.

Um filme ideal para embalagem de alimentos deve ser resistente a tensões externas, proporcionando a flexibilidade necessária para o processo de embalagem, garantindo a integridade do produto e prolongando o seu prazo de validade. Estes parâmetros podem variar em função das características do produto que está a ser embalado. Idealmente, estes materiais devem ser provenientes de recursos renováveis e serem biodegradáveis (MARCET, 2023).

A permeabilidade ao vapor de água após 24 h não diferiu entre os diferentes filmes, com valores de aproximadamente 4,97 g.mm/m².dia.KPa (Tabela 4). Esse resultado mostra que a modificação do amido e a incorporação do óleo essencial de casca de laranja não afetaram a propriedade de barreira ao vapor de água. A permeabilidade é a taxa de transmissão de vapor de água por unidade de área através de um filme de espessura conhecida induzida por um gradiente de pressão entre duas superfícies específicas de umidade relativa e temperatura especificadas (ASTM, 1995). Evangelho et al. (2019) também avaliaram a permeabilidade ao vapor de água de filmes de amido de milho com óleo essencial de laranja, observando um aumento desse parâmetro conforme a concentração do óleo essencial aumentava. Os valores obtidos foram semelhantes aos do presente estudo, atingindo até 4,53 g.mm/m².dia.KPa. Esta propriedade de barreira é essencial para a escolha da

aplicação de filmes biodegradáveis. Com isso, podemos afirmar que os valores encontrados no presente estudo são satisfatórios para a formação de embalagens ativas para alimentos que necessitam de uma permeabilidade ao vapor de água baixa.

A modificação do amido pode alterar as suas propriedades, uma vez que aumenta os grupos hidrofóbicos e reduz o teor de amilose, que foi medido em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (PACHECO et al., 2024). O teor de amilose influencia nas propriedades do amido e na sua aplicação. A redução do teor de amilose pode ser devida ao tratamento que pode causar a lixiviação da amilose ou a despolimerização parcial das moléculas de amilose promovida pelo processo de esterificação (PACHECO et al., 2024). No entanto, no nosso estudo, não foi observada nenhuma tendência para as propriedades dos filmes produzidos com amido nativo ou modificado com OSA.

Tabela 4. Solubilidade em água, espessura, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água de filmes de amidos de feijão nativo e modificado com OSA, com a incorporação de óleo essencial da casca de laranja.

Filme de amido de feijão*	Teor de umidade (%)	Solubilidade em água (%)	Espessura (mm)	Resistência à tracção (MPa)	Elongação (%)	Permeabilidade ao vapor de água em 24 h (g.mm/m ² .dia.KPa)
Nativo 0%	17,7 ± 2,4 ^{ab}	31,8 ± 1,9 ^{ab}	0,111 ± 0,010 ^{ab}	5,27 ± 0,41 ^a	39,0 ± 1,7 ^{ab}	5,65 ± 0,16 ^a
Nativo 5% OECL	15,3 ± 2,2 ^b	19,6 ± 2,5 ^b	0,106 ± 0,014 ^b	5,29 ± 0,81 ^a	41,5 ± 3,3 ^{ab}	4,22 ± 0,89 ^a
Nativo 10% OECL	22,3 ± 3,7 ^{ab}	35,5 ± 2,8 ^{ab}	0,121 ± 0,01 ^a	5,62 ± 0,56 ^a	40,5 ± 4,6 ^{ab}	4,68 ± 0,31 ^a
OSA-modificado 0%	19,7 ± 2,3 ^{ab}	34,4 ± 2,0 ^{ab}	0,098 ± 0,013 ^b	5,28 ± 0,29 ^a	52,0 ± 6,2 ^a	4,62 ± 0,39 ^a
OSA-modificado 5% OECL	19,4 ± 0,6 ^{ab}	33,7 ± 1,3 ^{ab}	0,109 ± 0,011 ^{ab}	5,24 ± 0,26 ^a	41,5 ± 4,6 ^{ab}	5,98 ± 1,76 ^a
OSA-modificado 10% OECL	24,2 ± 0,7 ^a	38,0 ± 2,3 ^a	0,110 ± 0,012 ^{ab}	5,94 ± 0,93 ^a	29,0 ± 9,9 ^b	4,68 ± 0,63 ^a

Os resultados são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.

^{a,b} Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p > 0,05).

* Filmes de amido de feijão nativo ou modificado com OSA com 0%, 5% ou 10% (v/p) de óleo essencial de casca de laranja (OECL).

6.5 Atividade antifúngica *in vitro*

O óleo essencial de casca de laranja e os filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja foram avaliados frente aos fungos *Penicillium crustosum* e *Aspergillus flavus* usando o teste de difusão em ágar durante períodos de incubação de 3, 5 e 8 dias e o teste de microatmosfera. No teste de difusão em ágar, o óleo essencial de casca de laranja demonstrou maior atividade antifúngica contra *A. flavus* do que *P. crustosum* (Tabela 5), com formação de zonas de inibição a partir de 5 µL de tratamento, que se mantiveram consistentes até o 8º dia, sem diferenças significativas de tamanho, variando de $14,4 \pm 3,4$ mm a $13,8 \pm 1,1$ mm.

O óleo essencial de casca de laranja apresentou zona de inibição para *P. crustosum* apenas a partir dos 10 µL de tratamento, com zonas variando de $15,8 \pm 4,4$ mm a $14,0 \pm 3,3$ mm. Além disso, na maior concentração (20 µL), a zona de inibição contra *A. flavus* atingiu $33,0 \pm 4,7$ mm no 3º dia, mantendo uma inibição considerável até o último dia de incubação, com $26,1 \pm 2,2$ mm. Essa inibição foi significativamente maior do que a observada contra *P. crustosum*, que variou de $20,1 \pm 4,2$ mm a $16,1 \pm 4,6$ mm nos dias 3 e 8, respectivamente. A formação e o tamanho das zonas de inibição obtidas no teste de difusão em ágar refletem a suscetibilidade dos fungos ao óleo essencial. As zonas de inibição com diâmetros superiores a 12 mm indicam um efeito inibitório satisfatório, enquanto as zonas inferiores a 7 mm são consideradas como tendo uma atividade baixa (ARORA & KAUR, 1999).

Em geral, os filmes não apresentaram atividade antifúngica no teste de difusão em ágar (Tabela 6). Esse resultado pode ser atribuído ao mecanismo de ação dos óleos essenciais, que ocorre principalmente através dos seus compostos voláteis (Tabela 1). Portanto, o contato direto dos filmes com o ágar BDA pode ter dificultado a volatilização dos compostos do óleo essencial de casca de laranja, comprometendo sua eficácia antifúngica neste método (REYES-JURADO *et al.*, 2020). Considerando que outros métodos *in vitro* são igualmente simples e de baixo custo para avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais, optou-se por realizar ensaios em microatmosfera para investigar a ação dos compostos voláteis presentes no óleo essencial de casca de laranja.

Em consonância com os resultados do teste de difusão em ágar, no teste de microatmosfera, o óleo essencial de casca de laranja também apresentou maior atividade contra *A. flavus*, com diferenças significativas em todos os tratamentos,

atingindo 95,6% de inibição no tratamento com 20 µL de óleo essencial de casca de laranja (Tabela 5). Como suposto, os filmes de amidos nativo e modificado com OSA com 5% e 10% de óleo essencial de casca de laranja apresentaram atividade antifúngica, com inibição significativamente maior contra *A. flavus* em todos os tratamentos. Devido à maior quantidade de óleo essencial, foi alcançada uma inibição completa com os filmes de amido contendo 10% de óleo essencial. Foi verificado também que a modificação do amido com OSA não teve influência sob a atividade antifúngica.

Os óleos essenciais exercem a sua atividade antifúngica principalmente por meio da interação dos seus compostos lipofílicos, como os terpenos e os fenóis, com a membrana celular dos fungos. Esses compostos desestabilizam a bicamada lipídica, aumentam a permeabilidade da membrana e provocam a fuga de metabolitos essenciais. Além disso, interferem na homeostase celular, inibem enzimas-chave e induzem o stress oxidativo, resultando em disfunção e morte celular (WU *et al.*, 2024). No caso do óleo essencial de casca de laranja, o D-limoneno, o seu principal composto, é amplamente encontrado em cascas de citrinos e outros frutos como um composto volátil e é responsável pela sua atividade antifúngica (LIN *et al.*, 2024). Além disso, o óleo essencial de casca de laranja incorporado nos filmes de amido de feijão apresentou inibição do crescimento fúngico, confirmando a sua atividade antifúngica principalmente através dos seus compostos voláteis, tornando-o promissor para aplicações na indústria alimentícia na formação de embalagem de alimentos.

Tabela 5. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de casca de laranja avaliada por difusão em ágar e microatmosfera.

OECL (µL)*	Difusão em ágar						Microatmosfera	
	<i>Penicillium crustosum</i>			<i>Aspergillus flavus</i>			<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
	Zonas de inibição (mm)						Inibição (%)	
	Tempo de armazenamento (dias)							
	3 dias	5 dias	8 dias	3 dias	5 dias	8 dias		
2,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	19,9 ± 7,5 ^b	26,9 ± 8,7 ^a
5,0	nd	nd	nd	14,4 ± 3,4 ^a	16,1 ± 3,8 ^a	13,8 ± 1,1 ^a	40,3 ± 9,8 ^b	57,5 ± 11,3 ^a
10,0	15,8 ± 4,4 ^a	13,2 ± 0,7 ^a	14,0 ± 3,3 ^a	22,1 ± 4,6 ^a	18,6 ± 2,1 ^a	17,2 ± 2,4 ^a	67,2 ± 5,9 ^b	81,2 ± 5,2 ^a
20,0	20,1 ± 4,2 ^b	17,4 ± 2,6 ^b	16,1 ± 4,6 ^b	33,0 ± 4,7 ^a	28,3 ± 1,0 ^a	26,1 ± 2,2 ^a	76,0 ± 2,8 ^b	95,6 ± 4,1 ^a

Os resultados são expressos como média (n = 3) $\pm$ desvio padrão.

^{a,b} Valores com letras diferentes na mesma linha para inibição significativamente (p > 0,05).

nd: Não detectado (sem efeito de inibição sobre fungos).

*OECL: óleo essencial de casca de laranja.

Tabela 6. Atividade antifúngica *in vitro* de filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja avaliada por difusão em ágar e microatmosfera.

Difusão em ágar								Microatmosfera	
Amido de feijão *	OECL %	<i>Penicillium crustosum</i>			<i>Aspergillus flavus</i>			<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
		Zonas de inibição (mm)						Inibição (%)	
		Tempo de armazenamento (dias)							
			3	5	8	3	5	8	
Nativo	5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	35,9 ± 10,4 ^{b,C}	51,2 ± 6,6 ^{b,B}
Nativo	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	84,1 ± 15,8 ^{b,A}	100,0 ± 0,0 ^{a,A}
OSA-modificado	5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23,1 ± 4,5 ^{b,C}	41,4 ± 13,6 ^{a,B}
OSA-modificado	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	71,4 ± 4,6 ^{b,B}	100,0 ± 0,0 ^{a,A}

Os resultados são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.

^{a,b} Valores com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente (p > 0,05).

^{A, B, C} Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p > 0,05)

nd: Não detectado (sem efeito de inibição sobre fungos).

* Filmes de amido de feijão nativo ou modificado por OSA com 0% ou 10% (v/p) de óleo essencial de casca de laranja OECL

6.6 Atividade antifúngica *in situ* dos filmes biodegradáveis ativos em bolos

Considerando os resultados das análises *in vitro*, filmes de amido nativo e modificado com OSA contendo 10% de óleo essencial de casca de laranja foram aplicados na formação de embalagens biodegradáveis ativas para conservação de bolos e avaliados quanto à sua atividade antifúngica nos dias 0, 3, 6 e 9 de armazenamento (Tabela 7). Filmes de amido nativo e modificado com OSA sem óleo essencial de casca de laranja foram utilizados como controle.

Durante os 9 dias de armazenamento, observou-se um controle significativamente maior do crescimento fúngico nos bolos embalados com filmes contendo óleo essencial de casca de laranja. Os resultados mostraram que, após 3 dias de armazenamento, os filmes com óleo essencial de casca de laranja impediram completamente o crescimento fúngico, enquanto os bolos embalados com filmes controle apresentaram crescimento fúngico de $3,43 \pm 0,25$ Log UFC/g para o filme controle de amido nativo e $3,64 \pm 0,56$ Log UFC/g para o filme controle de amido modificado OSA, a legislação brasileira (ANVISA –IN nº 60/2019) estabelece que o limite máximo aceitável para bolores e leveduras em produtos de panificação estáveis à temperatura ambiente é de 4 Log UFC/g. Além disso, apesar da alta volatilidade dos óleos essenciais, o crescimento fúngico foi estatisticamente menor em todos os períodos avaliados, nos bolos embalados com filmes contendo 10% de óleo essencial de casca de laranja, sugerindo que sua ação foi mantida ao longo do período de armazenamento. Esse achado indica que a incorporação do óleo essencial de casca de laranja na matriz polimérica dos filmes de amido resulta em materiais com atividade antifúngica, capazes de inibir o crescimento de fungos em bolos quando utilizados como embalagem para alimentos.

O uso de óleos essenciais em filmes de embalagem oferece vantagens significativas, como a redução de interações químicas indesejadas com a matriz alimentar, a preservação das características sensoriais e a possibilidade de liberação controlada de compostos voláteis, aumentando, assim, sua eficácia (MAHANTA et al., 2021). Kringel et al. (2021) investigaram as propriedades conservantes e sensoriais do óleo essencial de laranja em sua forma encapsulada com β -ciclodextrina para aplicação direta em produtos de panificação. Os autores descobriram que o óleo essencial de casca de laranja encapsulado não apresentou atividade antifúngica. Embora o óleo essencial livre tenha demonstrado ação antimicrobiana quando

adicionado diretamente ao produto, essa aplicação resultou em mudanças sensoriais significativas, que nem sempre são desejáveis. Esses resultados ressaltam a importância do desenvolvimento de métodos de aplicação que equilibrem a eficácia antimicrobiana com a preservação da qualidade sensorial.

Mulla et al. (2024) desenvolveram filmes biodegradáveis à base de quitosana e pectina incorporados com óleo essencial de tomilho em concentrações de 10%, 15% e 20%, visando aumentar a conservação de bolos de leite por meio de um sistema de embalagem ativa. Os resultados mostraram que a formulação com 20% de óleo essencial de tomilho foi a mais eficaz, suprimindo completamente a *Salmonella Typhimurium* no sétimo dia de armazenamento. Além disso, esse filme prolongou a vida útil dos produtos em até 10 dias, superando as amostras controle armazenadas em temperatura ambiente.

Para garantir uma preservação eficiente, a escolha de um filme bioativo ideal deve alinhar com as características do alimento, as propriedades do filme e os objetivos de conservação. Nesse contexto, além da atividade antifúngica demonstrada neste estudo, pesquisas sugerem o uso de filmes com óleo essencial de casca de laranja como agentes antibacterianos. Li et al. (2021) obtiveram resultados satisfatórios ao testar filmes compostos de quitosana e gelatina de pele de peixe com óleo essencial de casca de laranja frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Ainda, filmes de amido de milho contendo óleo essencial de laranja em concentrações de 0,3, 0,5 e 0,7 $\mu\text{L/g}$ reduziram o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em 68%, 80% e 83%, e o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em 40%, 51% e 66%, respectivamente (EVANGELHO et al., 2019).

Tabela 7. Atividade antifúngica *in situ* de filmes de amido de feijão com óleo essencial de casca de laranja utilizados como embalagem contra fungos viáveis durante o armazenamento de bolos.

Amido de feijão*	OECL (%)	Atividade antifúngica (Log.UFC/g)			
		Tempo de armazenamento (dias)			
		0	3	6	9
Nativo	0	nd	$3,43 \pm 0,25^a$	$4,34 \pm 0,28^a$	$5,47 \pm 0,44^a$
Nativo	10	nd	nd	$3,41 \pm 0,14^b$	$4,00 \pm 0,43^b$
OSA-modificado	0	nd	$3,64 \pm 0,56^a$	$4,55 \pm 0,20^a$	$5,42 \pm 0,36^a$
OSA-modificado	10	nd	nd	$3,03 \pm 0,26^b$	$3,75 \pm 0,16^b$

Os resultados são expressos como a média ($n = 3$) $\pm$ desvio padrão.

^{a, b} Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p > 0,05$).

nd: Não detectado (sem contagem de mofo ou levedura).

*Filmes de amido de feijão nativo ou modificado por OSA com 0% ou 10% (v/p) de óleo

essencial de casca de laranja (OECL).

7 Considerações finais

O amido de feijão carioca nativo ou modificado com OSA possibilitou a formação de filmes íntegros que incorporaram com sucesso o óleo essencial de casca de laranja com atividade antifúngica. O principal composto volátil no óleo essencial de casca de laranja foi o D-limoneno (94,25%). Todos os filmes desenvolvidos apresentaram morfologia homogênea e alta luminosidade. No geral, ao incorporar o óleo essencial de casca de laranja, nenhuma diferença foi encontrada em sua opacidade. A solubilidade em água e a permeabilidade ao vapor de água foram baixas, atingindo valores de 38,0% e 4,97 g.mm/m².dia.KPa, respectivamente. As propriedades mecânicas de resistência à tração (aproximadamente 5,44 MPa) e alongação (máximo de 52,0%) foram satisfatórias para aplicações em embalagens de alimentos.

O óleo essencial de laranja e os filmes apresentaram atividade antifúngica *in vitro* frente aos fungos *Penicillium crustosum* e *Aspergillus flavus* quando avaliados por difusão em disco e por microatmosfera. Em ambos os testes aplicados, o óleo essencial de casca de laranja apresentou maior atividade antifúngica contra *A. flavus* do que *P. crustosum*, atingindo 33,0 mm de zonas de inibição e 95,6% de inibição para o teste de difusão em ágar e microatmosfera, respectivamente. Os filmes também apresentaram maior atividade antifúngica para *A. Flavus*, com inibição completa para os filmes de amido de feijão nativo e modificado com OSA com 10% de óleo essencial de casca de laranja. Assim, essa concentração de óleo essencial foi escolhida para sua aplicação na conservação de bolos. Os filmes foram eficazes na inibição do crescimento de fungos e provaram ser excelentes materiais para a formação de embalagens biodegradáveis e ativas de alimentos. A modificação do amido com OSA aprimorou as propriedades morfológicas dos filmes. Por outro lado, não afetou as outras propriedades como cor, opacidade, teor de umidade, solubilidade em água, espessura, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água. Para estudos futuros, sugerimos a avaliação dos filmes em diferentes matrizes alimentares.

Referências bibliográficas

AACC. American association of cereal chemists. **Approved methods of the american association of cereal chemists**, v. 1, 1995.

Abd Elghani, E. M., El Sayed, A. M., Abdel-Aziz Emam, M. M., Al-Mahallawi, A. M., Tadros, S. H., Soliman, F. M., & Youssef, F. S. Seasonal metabolic profiling of Valencia orange leaf essential oil using GC coupled with chemometrics, nano-formulation, and insecticidal evaluation: in vivo and in silico. **RSC Advances**, v.13, p. 1659–1671, 2023.

Almeida, D. M., Woiciechowski, A. L., Wosiacki, G., Prestes, R. A., & Pinheiro, L. A. Physical, chemical and barrier properties in films made with bacterial cellulose and potato starch blend. **Polímeros**, v. 23, p. 538-546, 2013.

Altuna, L., Herrera, M. L., & Foresti, M. L. Synthesis and characterization of octenyl succinic anhydride modified starches for food applications. **Food Hydrocolloids**, v. 80, p. 97–110, 2018.

Andrade, M. F., Silva, I. D. de L., Silva, G. A., Cavalcante, P. V. D., Silva, F. T., Almeida, Y. M. B., Vinhas, G. M., & Carvalho, L. H. A study of poly (butylene adipate-co-terephthalate)/orange essential oil films for application in active antimicrobial packaging. **Lwt**, v. 125, p. 109-148, 2020.

Arora, D. S., & Kaur, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 3, p. 257–262, 1999.

ASTM, Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. **American Society for Testing and Materials**. E. 95, 1995.

Azevêdo, L. C., Cordeiro de Sá, A. S., Rovani, S., & Fungaro, D. A. Propriedades do amido e suas aplicações em biopolímeros. **Cadernos de prospecção**, v. 11, p. 351-358, 2018.

Aziz, z. a.; Ahmad, a.; Aetapar, shm.; Karakucuk, a.; Azim, m. m.; Lokhat, d.; Ashraf,

G. M. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. **Current drug metabolism**, v. 19, p. 1100-1110, 2018.

Bai, Y., & Shi, Y. C. Structure and preparation of octenyl succinic esters of granular starch, microporous starch and soluble maltodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 520–527, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União: Brasília, DF, 26 dez. 2019.

Bruni, G. P., de Oliveira, J. P., Fonseca, L. M., da Silva, F. T., Dias, A. R. G., & da Rosa Zavareze, E. Biocomposite films based on phosphorylated wheat starch and cellulose nanocrystals from rice, oat, and eucalyptus husks. **Starch/Staerke**, v. 7n 3–4, p.1–8, 2020.

Cai, C., Ma, R., Duan, M., Deng, Y., Liu, T., & Lu, D. Effect of starch film containing thyme essential oil microcapsules on physicochemical activity of mango. **Lwt**, v. 131, p. 109-700, 2020.

Cagri, A.; Ustunol, Z.; Ryser, E.T. Antimicrobial Edible Films and Coatings. **J. Food Prot**, v. 67, p.833–848, 2004

CLSI. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 35(M02-A12), 73, 2015.

D-882-91, A. American Society for Testing and Materials (ASTM), Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, Standards. Annual Book of ASTM, Philadelphia, 1995.

Debonne E , Bockstaele FV , Samapundo S , Eeckhout M e Devlieghere F , O uso de óleos essenciais como conservantes antifúngicos naturais em produtos de panificação. **J Essent Oil**, v. 30, p. 309 – 3018, 2018.

Demiate, I. M., Figueroa, A. M., Guidolin, M. E. B. Z., dos Santos, T. P. R., Yangcheng, H., Chang, F., & Jane, J. L. Physicochemical characterization of starches from dry beans cultivated in Brazil. **Food Hydrocolloids**, v.61, p. 812-820, 2016.

Dewi, A. M. P., Santoso, U., Pranoto, Y., & Marseno, D. W. Dual modification of sago starch via heat moisture treatment and octenyl succinylation to improve starch hydrophobicity. **Polymers**, v. 14, n. 6, p. 1086, 2022.

Evangelho, J. A., Biduski, B., Silva, W. M. F., Mello El Halal, S. L., Lenhani, G. C., Zanella Pinto, V., Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. Carioca bean starch upon synergic modification: characteristics and films properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101(1), p. 253–261, 2021.

Evangelho, J. A., Dannenberg, G. S., Biduski, B., Halal, S. L. M., Kringel, D. H., Gularte, M. A., Fiorentini, A. M., & Zavareze, E. R. Antibacterial activity, optical, mechanical, and barrier properties of corn starch films containing orange essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 114981, 2019.

Esteve-Redondo, P., Heras-Mozos, R., Simó-Ramírez, E., López-Carballo, G., López-de-Dicastillo, C., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. Innovative Systems for the Delivery of Naturally Occurring Antimicrobial Volatiles in Active Food-Packaging Technologies for Fresh and Minimally Processed Produce: Stimuli-Responsive Materials. **Foods**, v. 13(6), p. 856, 2024.

Farahmandfar, R., Tirgarian, B., Dehghan, B., & Nemati, A. Comparison of different drying methods on bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel waste: changes in physical (density and color) and essential oil (yield, composition, antioxidant and antibacterial) properties of powders. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.14, p. 862–875, 2020.

Farouk, A., Hathout, A. S., Amer, M. M., & Hussain, O. A. The impact of nanoencapsulation on volatile constituents of *Citrus sinensis* L. essential oil and their antifungal activity. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 65(3), p. 527-538, 2022.

Fatima, S., Khan, M. R., Ahmad, I., & Sadiq, M. B. Recent advances in modified starch based biodegradable food packaging: A review. **Heliyon**, v.10(6), p. 27453, 2024.

Fattahi, R., Kalalagh, K. F., & Bahrami, A. Correlating the pre-emulsion conditions of film-making with the characteristics of active chitosan films containing orange essential oil (*Citrus sinensis* L.). **Progress in Organic Coatings**, v.174, p. 107-270, 2023.

Fakhouri, F. M., Martelli, S. M., Caon, T., Velasco, J. I., Buontempo, R. C., Bilck, A. P., & Mei, L. H. I. The effect of fatty acids on the physicochemical properties of edible films composed of gelatin and gluten proteins. **Lwt**, v. 87, p. 293-300, 2018.

Ferrer, V., Paymal, N., Quinton, C., Tomi, F., & Luro, F. Investigations of the Chemical Composition and Aromatic Properties of Peel Essential Oils throughout the Complete Phase of Fruit Development for Two Cultivars of Sweet Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.). **Plants**, v.11, p. 27-47, 2022.

Figueroa, A. M., Lacerda, L. G., Schnitzler, E., & Demiate, I. M. Caracterização das propriedades de pasta e térmicas de amidos de feijão Branco, Carioca, Fradinho e Preto. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v. 4(3), p. 12-16, 2015.

Freire, B. C. F. Aplicação de coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã na conservação de queijo tipo coalho. Mestrado em ambiente, tecnologia e sociedade, **Universidade federal rural do semi-árido, Mossoró**. 82p,2019.

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**, v. 66, p. 332–339, 2016.

Gurgel, L. A., Sidrim, J. J. C., Martins, D. T., Filho, V. C., & Rao, V. S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97(2), p. 409–412, 2005.

HAMED, Imen; JAKOBSEN, Anita Nordeng; LERFALL, Jorgen. Sistemas de embalagens comestíveis sustentáveis baseados em compostos ativos de subprodutos do processamento de alimentos: uma revisão. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, n. 1, p. 198-226, 2022.

Hasheminya, S. M., & Dehghannya, J. Development and characterization of kefir-agar gelatin bio-nanocomposites containing Zhumeria majdae essential oil nanoemulsion to use as active food packaging in sponge cakes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 279(P1), 135120, 2024.

He, X., Jin, Y., Tang, L., & Huang, R. A Brief Review and Perspective on the Functional Biodegradable Films for Food Packaging. **arXiv preprint arXiv:2311.16932**, 2023.

Hyltdgaard, M.; Mygdind, T.; Meyer, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3 (article 12), p.24, 2012.

Inglis, A., Parnell, A., Subramani, N., & Doohan, F. Machine Learning Applied to the Detection of Mycotoxin in Food: A Review. **arXiv preprint arXiv:2404.15387**, 2024.

Karanth, S., Feng, S., Patra, D., & Pradhan, A. K. Linking microbial contamination to food spoilage and food waste: The role of smart packaging, spoilage risk assessments, and date labeling. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1198124, 2023.

Khalid, K. A. Growth sites and their impacts on sour orange 'Citrus aurantium (Tournef.)' essential oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.31, p. 2–7, 2021.

Kringel, D. H., da Silva, W. M. F., Biduski, B., Waller, S. B., Lim, L. T., Dias, A. R. G., & Zavareze, E. D. R. Free and encapsulated orange essential oil into a β -cyclodextrin inclusion complex and zein to delay fungal spoilage in cakes. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 5, p. e14411, 2020.

khosravi-Darani, Kianoush; Bucci, D. Z. Application of poly (hydroxyalkanoate) in food packaging: Improvements by nanotechnology. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 275-285, 2015.

Kringel, D. H., Lang, G. H., Dias, A. R. G., Gandra, E. A., Gandra, T. K. V., & Zavareze, E. R. Impact of encapsulated orange essential oil with β -cyclodextrin on technological, digestibility, sensory properties of wheat cakes as well as *Aspergillus flavus* spoilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.101, p. 5599–5607, 2021.

Liu, Q. R., Wang, W., Qi, J., Huang, Q., & Xiao, J. Oregano essential oil loaded soybean polysaccharide films: Effect of Pickering type immobilization on physical and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 165-172, 2019.

Li, Y., Tang, C., & He, Q. Effect of orange (*Citrus sinensis* L.) peel essential oil on characteristics of blend films based on chitosan and fish skin gelatin. **Food Bioscience**, v. 41(399), p. 100-927, 2021.

Lima, K. O., Biduski, B., Silva, W. M. F., Ferreira, S. M., Montenegro, L. M. P., Montenegro, P., Dias, A. R. G., & Bianchini, D. Incorporation of tetraethylorthosilicate (TEOS) in biodegradable films based on bean starch (*Phaseolus vulgaris*). **European Polymer Journal**, v.89, p.162–173, 2017.

Lin, H., Li, Z., Sun, Y., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, Q., Cai, T., Xiang, W., Zeng, C., & Tang, J. D-Limonene: Promising and Sustainable Natural Bioactive Compound. **Applied Sciences (Switzerland)**, v.14(11), p. 4605, 2024.

LIU, C.; LI, K.; LI, X.; ZHANG, M.; Li, J. Formação e evolução estrutural de nanocristais de amido a partir de amido de milho ceroso e amido de batata cerosa. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.180, p. 625-632, 2021.

Liu, M., Wang, X., Li, Y., Jin, D., Jiang, Y., Fang, Y., ... & Ding, Y. Effects of OSA-starch-fatty acid interactions on the structural, digestibility and release characteristics of high amylose corn starch. **Food Chemistry**, v. 454, p.139 742 , 2024.

Lu, Y., Luo, Q., Chu, Y., Tao, N., Deng, S., Wang, L., & Li, L. Application of Gelatin in Food Packaging: A Review. **Polymers**, v.14(3), 2022.

Lv, F.; Liang, H.; Yuan, Q.; Li, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Res. Int.**, v. 44, p. 3057–3064, 2011.

MARCET, Ismael. The Characterization of Biodegradable Films and Food Packaging. **Membranes**, v. 13, n. 10, p. 826, 2023.

Mahanta, B. P., Bora, P. K., Kemprai, P., Borah, G., Lal, M., & Haldar, S. Thermolabile essential oils, aromas and flavours: Degradation pathways, effect of thermal processing and alteration of sensory quality. **Food Research International**, v.145, p. 110 404, 2021.

Maisanaba, S.; Llana-Ruiz-Cabello, M.; Gutiérrez-Praena, D.; Pichardo, S.; Puerto, M.; Prieto, A.I.; Cameán, A.M. New advances in active packaging incorporated with essential oils or their main components for food preservation. **Food Rev.** v. 33, p 447–515, 2017.

Mulla, M. F. Z., Ahmed, J., Vahora, A., Pathania, S., & Rashed, M. S. Characterization of biopolymers based antibacterial films enriched with thyme essential oil and their application for milk cake preservation. **Frontiers in Food Science and Technology**, v. 4, p. 1–13, 2024.

Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., Gardrat, C., Rezaei, M. R., Hashemi, M., Le Coz, C., & Coma, V. (2017). Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 36-45, 2017.

Olawoye, B., Popoola-Akinola, O. O., Oluwajuyitan, T. D., Adetola, D. B., Adeloye, A. E., & Ayodele, A. A. Octenyl succinic anhydride modification of starch. In: Starch: Advances in Modifications, Technologies and Applications. Cham: **Springer International Publishing**, p. 127-149, 2023.

Pacheco, C. de O., Pires, J. B., Fonseca, L. M., Jansen-Alves, C., Cruz, E. P. da, Santos, F. N. dos, Santana, L. R., Carreño, N. L. V., Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. Curcumin-loaded antioxidant oleogels based on native and modified bean starches. **Food Bioscience**, v. 61, p. 104994, 2024.

Razola-Díaz, M. del C., Guerra-Hernández, E. J., García-Villanova, B., & Verardo, V. Recent developments in extraction and encapsulation techniques of orange essential oil. **Food Chemistry**, v. 354, p. 129 575, 2021.

Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A. R., Ochoa-Velasco, C. E., Palou, E., López-Malo, A., & Ávila-Sosa, R. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60(10), p. 1641–1650, 2020.

Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., & Barat, J. M. Combination of different antifungal agents in oil-in-water emulsions to control strawberry jam spoilage. **Food Chemistry**, v. 239, p. 704–711, 2018.

Rupollo, G., Vanier, N. L., Zavareze, E. da R., Oliveira, M., Pereira, J. M., Paraginski, R. T., Dias, A. R. G., & Elias, M. C. Pasting, morphological, thermal and crystallinity properties of starch isolated from beans stored under different atmospheric conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1403–1409, 2011.

Saavedra, J. P., González, E. P., Benítez, T.T., Lavidá, H.C., Houbron, E. P., & Canul-Chan, M. Development, Soil Biodegradation, and Kinetics Evaluation of Starch-Based Bioplastic from *Sechium edule* and *Phaseolus vulgaris*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1-15, 2024.

Santos, F. N., Fonseca, L. M., Jansen-Alves, C., Crizel, R. L., Pires, J. B., Kroning, I. S., ... & da Rosa Zavareze, E. Antimicrobial activity of geranium (*Pelargonium graveolens*) essential oil and its encapsulation in carioca bean starch ultrafine fibers by electrospinning. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 265, p.

130 953, 2024.

Sánchez, A.A.; Espinosa, M.E.; Vásquez, E.N.O.; Camberos, E.P.; Vásquez, R.S.; carvantes, E.L. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 585-590, 2010.

Sánchez-González, L.; Vargas, M.; González-Martínez, C.; Chiralt, A.; Cháfer, M. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. **Food Eng**, v. 3, p. 1–16, 2011.

Sapper, M., Wilcaso, P., Santamarina, M. P., Roselló, J., & Chiralt, A. Antifungal and functional properties of starch-gellan films containing thyme (*Thymus zygis*) essential oil. **Food Control**, v. 92, p. 505-515, 2018.

Sharma, I., Sinhmar, A., Thory, R., Sandhu, K. S., Kaur, M., Nain, V., Pathera, A. K., & Chavan, P. Synthesis and characterization of nano starch-based composite films from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 2178–2185, 2021.

Silva, F. A. N., Silva, A. A., Fernandes, N. S., Rodrigues, T. H. S., Canuto, K. M., Nascimento, R. F., Brito, E. S., Aragão, F. A. S., Freitas, B. M., & Zocolo, G. J. Evaluation of Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Characterization of Volatile Organic Compounds from Melon (*Cucumis melo* L.) Flowers. **Chromatographia**, v. 81, p. 1231–1239, 2018.

Silva, F. T., Santos, F. N., Fonseca, L. M., Souza, E. J. D., Hackbart, H. C. dos S., Silva, K. G., Biduski, B., Gandra, E. A., Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. Oleogels based on germinated and non-germinated wheat starches and orange essential oil: Application as a hydrogenated vegetable fat replacement in bread. **International Journal of Biological Macromolecules**, 253, 2023.

Simona, J., Dani, D., Petr, S., Marcela, N., Jakub, T., & Bohuslava, T. Edible films from carrageenan/orange essential oil/trehalose—structure, optical properties, and

antimicrobial activity. **Polymers**, v, 13(3), p, 1–19, 2021.

Singh, N.; Singh, J.; Kaur, L. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, p. 219-231, 2003.

Siroha, A. K., Bangar, S. P., Sandhu, K. S., Lorenzo, J. M., & Trif, M. Octenyl succinic anhydride modified pearl millet starches: an approach for development of films/coatings. **Polymers**, v. 14(12), p. 24 78, 2022.

Song, X., Zuo, G., & Chen, F. Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p.1302–1309, 2018.

Souza, E. J. D., Kringel, D. H., Siebeneichler, T. J., Rombaldi, C. V., Gandra, E. A., Dias, A. R. G., & da Rosa Zavareze, E. Antifungal potential of clove and white thyme essential oils encapsulated in electrosprayed starch-OSA against *Penicillium digitatum*. **European Polymer Journal**, p. 113 192, 2024.

Souza, E. J. D. de, Kringel, D. H., Yurgel, V. C., Dora, C. L., Morais, M. G. de, Gandra, E. A., Cantillano, R. F. F., Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. Starch-octenyl succinic anhydride nanoemulsions with clove and white thyme essential oils: In vitro antifungal activity and application on orange (*Citrus sinensis* cv. Salustiana) preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 428, p. 110 994, 2025.

Torres-Alvarez, C., Núñez González, A., Rodríguez, J., Castillo, S., Leos-Rivas, C., & Báez-González, J. G. Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. **CyTA-Journal of Food**, v.15(1), p.129-135, 2017.

Tripathi, J., Ambolika, R., Gupta, S., & Variyar, P. S. Preparation and characterization of methylated guar gum based nano-composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 124, p. 107 312, 2022.

Serra Valdés, M. Á. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia

del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. **Revista Habanera de Ciencias Médicas**, v. 16(3), p. 402-419, 2017.

Vanier, N. L., Oliveira, J. P., Bruni, G. P., Halal, S. L. M., Villanova, F. A., Zavareze, E. da R., Dias, A. R. G., & Bassinello, P. Z. Characteristics of starch from different bean genotypes and its effect on biodegradable films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99(3), p. 1207–1214, 2019.

Vianna, T. C., Marinho, C. O., Marangoni Júnior, L., Ibrahim, S. A., & Vieira, R. P. Essential oils as additives in active starch-based food packaging films: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1803–1819, 2021.

Waraczewski, R., Muszyński, S., & Sołowiej, B. G. An analysis of the plant-and animal-based hydrocolloids as byproducts of the food industry. **Molecules**, v.27(24), p.86, 2022.

Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. Starch retrogradation: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, p. 568-585, 2015.

Won, C., Jin, Y. I., Chang, D. C., Kim, M., Lee, Y., Ganesan, P., ... & Chang, Y. H. Rheological, pasting, thermal and retrogradation properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. **Food Science and Technology** (Campinas), v. 37, n. 2, p. 321-327, 2017.

Wu, H., Zhao, F., Li, Q., Huang, J., & Ju, J. Antifungal mechanism of essential oil against foodborne fungi and its application in the preservation of baked food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, n. 9, p. 2695–2707, 2024.

Zhou, Y., Wu, X., Chen, J., & He, J. Effects of cinnamon essential oil on the physical, mechanical, structural and thermal properties of cassava starch-based edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.184, p. 574–583, 2021.

Apêndice A

Figure S1. Cromatograma de compostos voláteis do óleo essencial de casca de laranja. Os picos correspondem aos seguintes compostos: 1) α -Tujeno, 2) (-)- α -Pineno, 3) (+)- α -Pineno, 4) β -Felandreno, 5) β -Mirceno, 6) α -Felandreno, 7) δ -3-Careno, 8) α -Terpineno, 9) o-Cimeno, 10) D-Limoneno, 11) γ -Terpineno, 12) (+)-4-Careno, 13) α -Copaeno e 14) Limonen-6-ol, pivalato.

