

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

**CHAIANE REGINA RECH**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA INCORPORAÇÃO DE  
ÓLEOS ESSENCIAIS NAS PROPRIEDADES DE FILMES DE  
POLIHIDROXIBUTIRATO**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**DOURADOS -MS**

**2018**

**CHAIANE REGINA RECH**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Silvia Maria Martelli

CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA INCORPORAÇÃO DE  
ÓLEOS ESSENCIAIS NAS PROPRIEDADES DE FILMES DE  
POLIHIDROXIBUTIRATO**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia Ambiental na Área de Concentração em Ciência Ambiental.

**DOURADOS -MS**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R296e Rech, Chaiane Regina  
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NAS  
PROPRIEDADES DE FILMES DE POLIHIDROXIBUTIRATO [recurso eletrônico] /  
Chaiane Regina Rech. -- 2019.  
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Silvia Maria Martelli.  
Coorientador: Kelly Cristina da Silva Brabes.  
Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da  
Grande Dourados, 2018.  
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. polihidroxibutirato. 2. atividade antimicrobiana. 3. óleos essenciais. 4. biodegradação em  
solo. 5. polímero. I. Martelli, Silvia Maria. II. Brabes, Kelly Cristina Da Silva. III. Título.

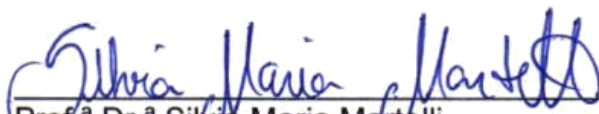
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

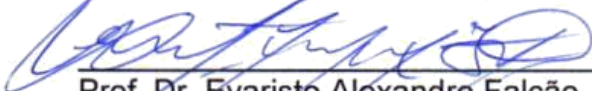


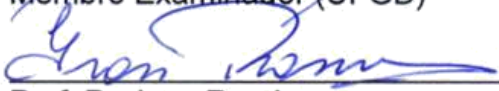
## Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: **“Estudo da influência da incorporação de óleos essenciais nas propriedades de filmes de polihidroxibutirato”**, de autoria de **Chaiane Regina Rech**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

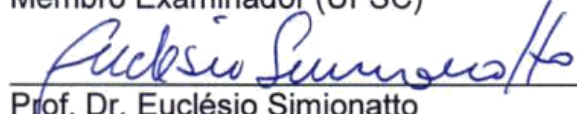
  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Maria Martelli  
Presidente da banca examinadora

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo José de Arruda  
Membro Examinador (UFGD)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Evaristo Alexandre Falcão  
Membro Examinador (UFGD)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ivan Ramires  
Membro Examinador (UFGD)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Thiago Caon - (Participação Remota)  
Membro Examinador (UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Euclésio Simionatto  
Membro Examinador (UEMS)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA AMBIENTAL LINHA DE PESQUISA: Potencial Tecnológico De  
Matérias Primas e Resíduos Agroindustriais

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA - SÍNCRONA - EM BANCA DE DEFESA DE  
DOUTORADO/ UFGD**

Às 14h30min do dia 14/11/2018, participei de forma síncrona com os demais membros que assinam a ata física deste ato público, da banca de Defesa da Tese de Doutorado da candidata **Chaiane Regina Rech**, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Considerando o trabalho avaliado, as arguições de todos os membros da banca e as respostas dadas pela candidata, formalizo para fins de registro, por meio desta, minha decisão de que a candidata pode ser considerada: APROVADA.

Atenciosamente,

**THIAGO CAON**

Thiago Caon

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Universidade Federal de Santa Catarina

*A Deus, presença insubstituível em todos os momentos da minha vida.*

***Dedico.***

*A minha filha, Laura, anjo abençoado que ilumina minha vida. Meu esposo, Gustavo, por todo apoio e amor em todos os momentos. Aos meus pais, Selito e Maria Carmen, pelo amor incondicional.*

***Ofereço.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu melhor amigo, com quem dividi todos os meus medos e dificuldades. Sem Ele eu não chegaria aonde cheguei.

Aos meus pais, Selito e Maria Carmen, pelos ensinamentos, pela força e amor dedicados por toda minha vida. Hoje, como mãe, posso compreender o esforço que dedicam na educação de seus filhos. E como o amor de vocês é imenso... Amo vocês.

Ao meu esposo, Gustavo, que me encorajou e me amparou todos os dias para que finalizasse mais esta etapa. Obrigada pela paciência e amor dedicados. Você também é merecedor desse título por toda a ajuda. Eu te amo.

Ao pequeno anjo que Deus me enviou, Laura, minha filha adorada que faz todos os dias serem coloridos. Obrigada por compreender minhas ausências. Você é o meu melhor presente, eu te amo infinitamente e cada dia mais.

Ao meu irmão, Claudinei, que ajudou na confecção das caixas para a avaliação de biodegradação, e aos meus irmãos Fabinho e Josiane por acreditarem em minha vitória.

Ao meu sogro Randal e sua esposa Marli, pelo estímulo e ajuda, muito obrigada.

Ao compadre Fábio Borges, por me encorajar a fazer o doutorado e por toda ajuda em conseguir as madeiras para a confecção das caixas.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade da realização deste curso e pelo aprendizado.

À Prof. Dra. Silvia Maria Martelli, foi uma grande alegria tê-la conhecido, obrigada pela orientação, amizade e dedicação para o desenvolvimento deste trabalho.

Á Prof. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes, meus sinceros agradecimentos por todo direcionamento, conselhos e dicas para a realização deste trabalho e por sua amizade.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, pelos ensinamentos.

Á Bárbara, Marivane e Maycon, que me ajudaram em muitas análises, pela amizade e incentivo.

Às técnicas de laboratório, Flora Martinez, por conseguir materiais para a realização das análises, Lujan Sanabria pelo empréstimo dos termômetros, Débora Brait pelas placas de petri e Anália pela guilhotina.

Ao funcionário da fazenda experimental da UFGD, Jesus, por ajudar na coleta de solo.

A técnica Camila da FCA e a professora Marlene pelo empréstimo da peneira e análise de solo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de doutorado.

A PHB Industrial S/A por ceder o PHB para as análises.

Ao querido amigo e compadre Luiz Gabriel Bettoni, pelo transporte do PHB de São Paulo até Dourados.

A empresa OCA Ambiental por ceder solo de aterro sanitário.

A todas as pessoas que, de alguma forma, nos momentos serenos e apreensivos, fizeram parte dessa trajetória. Agradeço de coração. Que sejam recompensados a altura.



## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

$\Delta H_c$  – Entalpia de cristalização

$\Delta H_m$  – Entalpia de fusão

ANOVA – Análise de variância

ATCC - American Type Culture Collection

CFU - Unidade Formadora de Colônia

CICA – Citronela + canela

CIM – Concentração inibitória mínima

CNC - Nanofibras de celulose

CSLI – Instituto de Normas Clínicas e de Laboratório

DRX - Difração de raios-X

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

DTG – Derivada termogravimétrica

EO – Essential oil

FTIR - Espectroscopia de infravermelho

IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas

MCA – Melaleuca + canela

MCI – Melaleuca + citronela

Mn - Molar numérica média (Mn)

MPa – Mega Pascal

Mw – Massa molecular

OE – Óleo essencial

PCA – Plate Count Agar

PDA – Potato Dextrose Agar

pH – Potencial hidrogeniônico

PHA - Poli-hidroxicanoatos

PHB - Poli-hidroxi-butirato

PHB0 – PHB puro

PHB20 – PHB contendo 20% de eugenol

PHB40 - PHB contendo 40% de eugenol

PHBV - Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

PLA - Poli (ácido láctico)

Poli-3-HB/3HV - Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

Tg - Transição vítrea

TGA - Termogravimetria

Tm - Temperatura de fusão

Tmax – Temperatura máxima de decomposição

Tonset – Temperatura de início

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

UV – Radiação ultravioleta

UV-vis - Espectroscopia na região do ultravioleta e visível

Xc – Grau de cristalinidade

XRD – X-ray diffraction

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de Literatura

<b>Tabela 1.</b> Componentes majoritários dos óleos essenciais e sua ação antimicrobiana.....	38
---	----

### Capítulo I

<b>Tabela 1.</b> Atividade antimicrobiana de filmes de PHB incorporados com óleos essenciais.....	49
---	----

### Capítulo II

<b>Tabela 1.</b> Atividade antimicrobiana de filmes de PHB/eugenol.....	71
<b>Tabela 2.</b> Propriedades dos solos.....	72
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros termodinâmicos para PHB puro e filmes de PHB contendo eugenol.....	73

### Capítulo III

<b>Tabela 1.</b> Composição de filmes de PHB incorporados com OE.....	97
<b>Tabela 2.</b> Atividade antimicrobiana de filmes de PHB.....	97
<b>Tabela 3.</b> Propriedades térmicas obtidas de curvas de aquecimento TGA e DSC para filmes de PHB contendo blendas de OE.....	97
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros mecânicos obtidos a partir de ensaios de tração de filmes de blendas de PHB/OE.....	97

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de Literatura

<b>Figura 1:</b> Fórmula estrutural do PHA.....	22
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do PHB.....	24

### Capítulo I

<b>Figura 1.</b> Espectro de FTIR de filmes de PHB films incorporados com óleo de melaleuca.....	56
<b>Figura 2.</b> Espectro de FTIR de filmes de PHB films incorporados com óleo de canela.....	56
<b>Figura 3.</b> Espectro de FTIR de filmes de PHB films incorporados com óleo de citronela.....	56

### Capítulo II

<b>Figura 1.</b> Parâmetros climáticos durante o estudo de biodegradação.....	72
<b>Figura 2.</b> Filmes de PHB puro e contendo eugenol após 60 dias de biodegradação. (a, b, c) representam filmes de PHB puro em solos agrícolas, arenosos e de aterro, respectivamente; (d, e, f) representam filmes de PHB preparados com 20% de eugenol e enterrados em solo agrícola, arenoso e aterro, respectivamente; (g, h, i) representam filmes de PHB preparados com 40% de eugenol e enterrados em solos agrícolas, arenosos e de aterro, respectivamente.....	72
<b>Figura 3.</b> Crescimento microbiano em diferentes tipos de solo após tratamento com filmes de PHB/eugenol.....	73
<b>Figura 4.</b> Curvas TGA de PHB puro e filmes contendo eugenol durante o estudo de biodegradação do solo. (a, d, g) solo agrícola; (b, e, h) solo arenoso e (c, f, i) solo de aterro sanitário.....	74

<b>Figura 5.</b> Curvas DTG de filmes puros de PHB e eugenol durante o estudo de biodegradação do solo. (a, d, g) solo agrícola; (b, e, h) solo arenoso e (c, f, i) solo de aterro sanitário.....	75
<b>Figura 6.</b> Análise de DRX de filmes puros de PHB e eugenol durante o estudo de biodegradação do solo. (a, d, g) solo agrícola; (b, e, h) solo arenoso e (c, f, i) solo de aterro sanitário.....	76
<b>Figura 7.</b> Teste de tração (a, b, c) e módulo de elasticidade (d) para filmes PHB puro e carregado com eugenol durante o estudo de biodegradação.....	77

### Capítulo III

<b>Figura 1.</b> Filmes de PHB incorporados com misturas OE. a) Melaleuca e canela (MCA); b) Melaleuca e citronela (MCI); c) Citronela e canela (CICA); d) PHB puro.....	99
<b>Figura 2.</b> Espectro de UV-vis das blendas de PHB/OE.....	99
<b>Figura 3.</b> Transmitância de filmes incorporados com misturas de OEs em faixas de comprimentos de onda característicos de antocianinas e carotenóides.....	100
<b>Figura 4.</b> Atividade antimicrobiana de filmes de PHB incorporados com misturas de OE. a) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19093; b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853; c) <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275.....	100
<b>Figura 5.</b> Difração de raios-X de blendas de OE incorporadas em PHB.....	100
<b>Figura 6.</b> Influência da adição de misturas OE no grau de cristalinidade dos filmes de PHB.....	101
<b>Figura 7.</b> Curvas DSC obtidas para filmes de PHB incorporados com blendas de OE.....	102
<b>Figura 8.</b> Curva TGA de filmes de PHB incorporados com blendas de OE.....	102
<b>Figura 9.</b> A) Curva DTG de filmes de PHB incorporados com blendas de OE. B) Primeiro estágio de degradação.....	103

## RESUMO

Os polímeros convencionais são responsáveis por inúmeros resíduos que se acumulam no meio ambiente causando um grande impacto ambiental. Neste contexto, estudos e pesquisas tem sido realizados no sentido de desenvolver materiais biodegradáveis para a substituição dos polímeros petroquímicos. O presente estudo teve por objetivo desenvolver filmes biodegradáveis de polihidroxibutirato (PHB) com antimicrobianos naturais com potencial para aplicação em embalagens de alimentos. Os filmes foram desenvolvidos incorporando-se óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e canela (*Cinnamomum cassia*) em duas concentrações, avaliando microbiologicamente sua capacidade de inibição microbiana. A segunda etapa caracterizou-se pela incorporação de eugenol, submetendo as amostras à biodegradação em solo agrícola, arenoso e de aterro sanitário por um período de 60 dias. Na terceira etapa, foram desenvolvidas blendas de óleos essenciais de melaleuca, canela e citronela, analisando as possíveis alterações nas propriedades dos filmes em função da adição dos antimicrobianos. No primeiro capítulo, os filmes contendo canela apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos e a incorporação pode ser confirmada com o espectro de FTIR. No segundo capítulo, conclui-se que as amostras com maior concentração de eugenol apresentaram melhor atividade antimicrobiana. A adição de óleo essencial foi responsável pelo aumento da estabilidade térmica e diminuição da resistência à tração. Além disso, o percentual de cristalinidade alterou com o processo de biodegradação. Os filmes enterrados em solo agrícola apresentaram degradação maior que nos demais solos. Por fim, no terceiro capítulo, observou-se que somente os filmes contendo blendas de melaleuca e citronela (MCI) não apresentaram atividade antimicrobiana. Os filmes que continham blendas de citronela e canela (CICA) e melaleuca e canela (MCA) apresentaram atividade antimicrobiana e maior transparência do que o PHB puro, demonstrando potencial para aplicação como embalagem de alimentos. A adição de óleo essencial contribuiu para a diminuição da resistência a tração e diminuição da elasticidade dos filmes.

**Palavras-chave:** polihidroxibutirato; atividade antimicrobiana; óleos essenciais; embalagem; biomaterial; biodegradação em solo.

## ABSTRACT

The polymers are generated by viruses that accumulate the environment with great environmental impact. In this context, studies and research were carried out in order to follow the biodegradable materials for the substitution of petrochemical polymers. The present study had the effect of developing the biodegradable effects of polyhydroxybutyrate (PHB) with natural antimicrobials with potential for applications in food packaging. The films were developed incorporating essential oil of melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), citronella (*Cymbopogon winterianus*) and cinnamon (*Cinnamomum cassia*) in two buckets, microbiologically evaluating their capacity of microbial inhibition. A second stage was characterized by the incorporation of eugenol, submitted to biodegradation on agricultural soil, and one year of sanitation for a period of 60 days. In the third step, the blends of essential oils of melaleuca, cinnamon and citronella were analyzed, analyzing the changes in the properties of the films due to the addition of antimicrobials. In the first chapter, the films containing the antimicrobial series against bacteria and fungi and an incorporation can be confirmed with the FTIR spectrum. In the second chapter, it was concluded that the concentrations with higher concentration of eugenol are better antimicrobial activity. Comments and data on traction surveys. In addition, the percentage of crystallinity altered the biodegradation process. The films buried in soils are degraded larger than in the other soils. Finally, in the third chapter, it was observed that only the films containing melaleuca and citronella blends (MCI) are not of the antimicrobial activity. The films that accompany the varieties of citronella and cinnamon (CICA) and melaleuca and cinnamon (MCA), the antimicrobial activity and the greater transparency of the pure PHB, demonstrate potential for the application as food packaging. The oil order is essential to decrease the strength and elasticity of the films.

**Keywords:** polyhydroxybutyrate; antimicrobial activity; essential oils; packing; biomaterial; biodegradation in soil.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	20
3.1 PROBLEMÁTICA RELACIONADA AOS POLÍMEROS CONVENCIONAIS ...	20
3.2.1 Polihidroxicanoatos (PHA's).....	22
3.2.2 Polihidroxibutirato (PHB).....	24
3.3 MATERIAIS POLIMÉRICOS E O MEIO AMBIENTE.....	28
3.4 BIODEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS.....	30
3.4.1 Biodegradação de PHB .....	31
3.5 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO .....	32
3.5.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	32
3.5.2 Análise termogravimétrica (TGA).....	33
3.5.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	33
3.5.4 Difração de raios-x (DRX).....	34
3.5.5 Ensaio mecânico .....	34
3.5.6 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-vis).....	35
3.6 MICRO-ORGANISMOS DO SOLO .....	35
3.7 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	36
3.8 EMBALAGENS ATIVAS.....	37
REFERÊNCIAS .....	43
CAPÍTULO I .....	54
CAPÍTULO II .....	58
CAPÍTULO III.....	80
4. CONCLUSÃO GERAL.....	105



## 1 INTRODUÇÃO

Polímeros derivados de petróleo são consumidos e, conseqüentemente, produzidos em quantidade excessiva. Apresentam boa propriedade mecânica, baixo custo, durabilidade e versatilidade na aplicação. Entretanto, tem se tornado um problema ambiental devido ao uso e descarte inadequado e alta resistência a degradação.

Para minimizar estes problemas, algumas alternativas têm sido propostas, como a substituição destes materiais por polímeros biodegradáveis. Uma opção viável é à possibilidade de se misturar diversos polímeros ou substâncias para melhorar a aplicabilidade e biodegradação do novo material.

Os poli-hidroxicanoatos (PHA's) são polímeros naturais e biodegradáveis, divididos em mais de 150 polímeros já identificados. O primeiro deles foi o poli-hidroxi-butirato (PHB), um termoplástico duro, quebradiço e pouco permeável a O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>, além de que ao ser descartado não causa impacto ao meio ambiente.

Cabe salientar que novas tecnologias de embalagens, além das biodegradáveis, tem se desenvolvido como resposta às vantagens que os diferenciam das embalagens convencionais. Dentre essa inovação cita-se a antimicrobiana, capaz de diminuir ou inibir o desenvolvimento microbiano no alimento, promovendo melhoria na segurança e vida de prateleira do produto.

Os óleos essenciais são agentes antimicrobianos naturais que tem se destacado quando associados a embalagens de alimentos, através da incorporação direta à matriz polimérica. Diversos condimentos e especiarias são ricos em óleos essenciais e conhecidos por seu poder bactericida, entre os quais destacam-se: eugenol, melaleuca, canela e citronela. As blendas de óleos essenciais também caracterizam-se por uma linha promissora, visto que podem ampliar o espectro de ação frente a micro-organismos, pois alguns óleos essenciais atingem apenas fungos ou apenas bactérias.

Entretanto, cabe analisar se a incorporação de óleo essencial em um polímero biodegradável irá ou não alterar suas propriedades físicas, químicas e mecânicas e se influenciará em sua biodegradação. Considerando o conteúdo exposto, este trabalho está apresentado em três capítulos:

O Capítulo I refere-se aos três primeiros objetivos e aborda o desenvolvimento de filmes biodegradáveis e antimicrobianos à base de PHB incorporados com óleos essenciais de melaleuca, canela e citronela em concentração de 30% (m/m). A comprovação da incorporação de óleo em PHB foi sugerida através da técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e os filmes foram microbiologicamente testados pelo método de difusão em ágar frente a seis espécies de micro-organismos para avaliar sua atividade antimicrobiana.

O Capítulo II aborda o desenvolvimento de filmes de PHB aditivados com eugenol, composto majoritário do óleo de cravo. Os filmes foram produzidos em diferentes composições e expostos ao processo de biodegradação por 60 dias em solo agrícola, arenoso e de aterro sanitário, a fim de avaliar se a incorporação de óleo essencial pode interferir nas propriedades físicas, térmicas e mecânicas do material, bem como sua biodegradação após o descarte. Além disso, avaliar o potencial da junção de polímeros biodegradáveis e a adição de óleo essencial para embalagens de alimentos.

O Capítulo III aborda os últimos objetivos e explora a combinação de óleos essenciais de canela, melaleuca e citronela em diferentes concentrações e a incorporação em filmes de PHB. Os filmes foram caracterizados por TGA, DSC, UV-vis e ensaio mecânico e a atividade antimicrobiana foi avaliada frente a cinco micro-organismos.

Por fim, são apresentadas as conclusões gerais deste trabalho, em comparação aos objetivos específicos e são fornecidas sugestões para próximos trabalhos. Essa tese teve por objetivo principal a incorporação de eugenol e dos óleos essenciais de canela, melaleuca e citronela em filmes de PHB, avaliando suas propriedades físicas, químicas e mecânicas além do potencial antimicrobiano para aplicações mais abrangentes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver filmes de polihidroxibutirato incorporados com diferentes óleos essenciais e avaliar suas características térmicas, físicas e mecânicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver filmes a base de P(3HB) puro e incorporados com diferentes concentrações de óleo essencial;
- Determinar a ação antimicrobiana dos filmes pela técnica de disco-difusão em estirpes de referência, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella* sp. ATCC 13076; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aspergillus niger* ATCC 6275 e *Candida albicans* ATCC 90028;
- Sugerir a incorporação de óleos essenciais por espectroscopia de infravermelho (FTIR);
- Avaliar a biodegradação de filmes incorporados com eugenol em solo agrícola, arenoso e de aterro sanitário sofrendo influências ambientais;
- Verificar se a incorporação de eugenol influencia o tempo de biodegradação do PHB;
- Caracterizar os filmes quanto às propriedades mecânicas (resistência máxima a tração, alongação e módulo de elasticidade) após a biodegradação;
- Avaliar possíveis mudanças na estrutura cristalina e nas propriedades térmicas do polímero causadas pela biodegradação através de análises de termogravimetria (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difratometria de raios-X (DRX);
- Caracterizar os filmes incorporados com blendas de óleos essenciais quanto às propriedades físicas, térmicas e mecânicas.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 PROBLEMÁTICA RELACIONADA AOS POLÍMEROS CONVENCIONAIS**

O enorme desgaste sofrido pelo meio ambiente tem impulsionado a busca por soluções para que a natureza se recupere dos danos causados pela ação humana BARDI e ROSA (2007) como, por exemplo, controle de consumo e reciclagem do material, aterramento e incineração dos resíduos e biodegradação (PIATTI E RODRIGUES, 2005).

Pesquisas envolvendo o emprego de polímeros biodegradáveis nos últimos anos, como substitutos aos polímeros convencionais, aumentaram, visto que os polímeros petroquímicos não são biodegradáveis e são um problema para o gerenciamento de resíduos (KAI et al., 2018) e se acumulam no meio ambiente a uma taxa de 28 milhões de toneladas por ano (KALAIVANI E SUKUMARAN, 2013), devido a elevada resistência, tempo de degradação (BRITO et al., 2011) e rápida descartabilidade.

Os resíduos plásticos aumentaram de menos de 1% em 1960 para mais de 10% em 2005 em países de renda média e alta. Além disso, foram encontrados em todas as principais bacias oceânicas, com uma estimativa de 4 a 12 milhões de toneladas métricas (Mt) de resíduos plásticos gerados em terra que entra no ambiente marinho somente em 2010 (JAMBECK et al., 2015)

De acordo com GEYER et al. (2017) a partir de 2015, aproximadamente 6300 Mt de resíduos plásticos foram gerados, cerca de 9% dos quais foram reciclados, 12% foram incinerados e 79% foram acumulados em aterros ou no ambiente natural. Se as tendências atuais de produção e gestão de resíduos continuarem, cerca de 12.000 Mt resíduos plásticos estarão em aterros sanitários ou no ambiente natural até 2050.

#### **3.2 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS**

O desenvolvimento de polímeros biodegradáveis se deu a partir de esforços em diminuir a quantidade de produtos derivados de petróleo e aumentar a proteção ambiental (IGGUI et al., 2015b), visto a excessiva produção de plásticos e a inadequada disposição final, como incineração, aterramento e até mesmo a reciclagem (DA SILVA

et al., 2007).

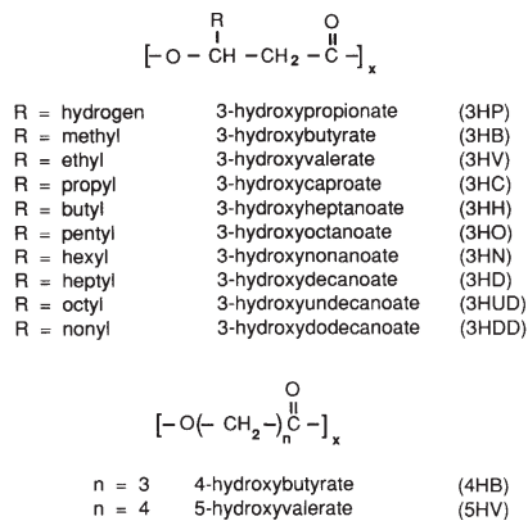
Plásticos biodegradáveis são, por definição, polímeros que se degradam por ação microbiana gerando CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, componentes celulares e outros produtos intermediários (ROSA et al., 2002; FRANCHETTI E MARCONATO, 2006b). Isso ocorre em curto espaço de tempo e sob condições ambientais adequadas (SQUIO E ARAGAO, 2004). Apesar disso, os polímeros biodegradáveis possuem elevado custo de produção em relação aos plásticos petroquímicos, além de um processamento complexo (ROSA et al., 2002; COELHO et al., 2008; CHANASIT et al., 2014). Além disso estes polímeros, caracterizam-se como macromoléculas, sintetizados por organismos vivos, formadas por moléculas idênticas ou muito similares ligadas covalentemente formando uma extensa cadeia (STEINBÜCHEL, 2001). De acordo com FLIEGER et al. (2003) os plásticos biodegradáveis são polímeros obtidos a partir de fontes renováveis, geralmente, biodegradáveis e não tóxicos. Podem ser classificados, em naturais e sintéticos. Os naturais são formados durante o ciclo de crescimento de organismos vivos, com destaque aos polissacarídeos, ácidos algínicos, polipeptídeos naturais e poliésteres bacterianos. E os sintéticos são ésteres alifáticos biodegradáveis, por possuírem cadeias carbônicas hidrolisáveis e tem sido comumente empregados em usos biomédicos, como cápsulas de liberação controlada de droga em organismos vivos, fixadores em cirurgias (suturas, clips, pinos para ossos) e para embalagens especiais (FRANCHETTI E MARCONATO, 2006b).

Os plásticos biodegradáveis se dividem em: completamente biodegradáveis, foto-biodegradáveis e semi-biodegradáveis (REDDY et al., 2003). Os polímeros completamente biodegradáveis são divididos em quatro grupos de acordo com sua obtenção: a) agro-polímeros, obtidos a partir de agro-produtos; b) os poliésteres, sintetizados por micro-organismos a partir de fontes renováveis, como os PHA's; c) os sintetizados quimicamente a partir de monômeros derivados de processos biotecnológicos, como o poli (ácido láctico) (PLA) e por fim, d) os polímeros biodegradáveis provenientes de origem não renovável (AVEROUS E BOQUILLON, 2004).

Dentre os poliésteres bacterianos encontra-se a família dos PHA's produzidos a partir de açúcares e que podem ser biodegradados por micro-organismos do ambiente em curto intervalo de tempo.

### 3.2.1 Polihidroxialcanoatos (PHA's)

Os PHA's são uma classe de polímeros alifáticos amplamente estudados por serem totalmente renováveis, biodegradáveis (DA SILVA et al., 2007) e sintetizados por muitos micro-organismos (PARRA et al., 2011). São classificados de acordo com o número de carbonos que compõe o grupo funcional R (Figura 1). Apresentam propriedades físicas e mecânicas semelhantes ao polipropileno e polietileno (DIN et al., 2008; IGGUI et al., 2015a).



**Figura 1:** Fórmula estrutural do PHA.

Fonte: POIRIER, NAWRATH E SOMERVILLE (1995)

A produção deste poliéster pode ocorrer em ciclo fechado de produção, ou seja, a fonte de carbono metabolizada pelo micro-organismo produz um polímero biodegradável a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Estes elementos serão absorvidos por plantas que fornecerão a fonte de carbono necessária para a produção dos PHA's, fechando o ciclo de produção (DALCANTON et al., 2010).

Os PHA's são degradados em meio biológico em condições aeróbias, formando CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e, em condições anaeróbias, formam CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O (KNOLL et al., 2009). Cabe salientar, que a degradação natural de PHA depende das propriedades do material, macro e microestrutura, forma e tamanho dos dispositivos de PHA, das condições físico-químicas do ambiente e clima em diferentes regiões (BOYANDIN et

al., 2013). O solo é o melhor ambiente natural para degradação do PHA, tendo as bactérias, actinomicetos e micromicetos como os principais micro-organismos degradadores (BELENEVA E ZHUKOVA, 2009).

Os micro-organismos capazes de produzir PHA's são, geralmente, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (STEINBÜCHEL, 1991), incluindo bactérias fototróficas, arqueobactérias, aeróbias e anaeróbias (YU, 2007). São divididos em dois grupos: os que necessitam de limitação de algum nutriente, com destaque para *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans*, e as que não necessitam limitação de nutriente e acumulam o polímero na fase de crescimento, como a *Escherichia coli* recombinante e *Alcaligenes latus* (LEE, 1996; POSADA et al., 2011).

Desde sua descoberta em 1926 por Lemoigne (LENZ E MARCHESSAULT, 2005), cerca de 300 micro-organismos foram identificados como produtores de PHA's (LEE et al., 1999), incluindo *Alcaligenes latus*, *Bacillus megaterium*, *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas oleovorans* (CHEE et al., 2010). A espécie *Ralstonia eutropha* (atualmente *Cupriavidus necator*) tem sido utilizada industrialmente por apresentar altas taxas de produção de polímeros e possibilitar a obtenção de maior rendimento (SQUIO E ARAGAO, 2004). O primeiro relato de poliéster PHA's foi isolado da bactéria *Bacillus megaterium* e caracterizou o PHB (FLICKINGER E DREW, 1999).

As bactérias utilizadas na produção de PHA podem ser classificadas em dois grupos: a) bactérias que requerem a limitação de nutrientes essenciais, como nitrogênio e oxigênio, e excesso de fonte de carbono e, b) bactérias que não necessitam de nutrientes para a síntese de PHA e acumulam o polímero durante a fase exponencial de crescimento (KHANNA E SRIVASTAVA, 2005).

Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para síntese de PHA, como águas residuais domésticas (CEYHAN E OZDEMIR, 2011), resíduos da indústria de alimentos (RODRIGUES, 2005), óleo de soja (ZORTÉA, 2012), amido de arroz suplementado com óleo de soja (DALCANTON et al., 2010), etc.

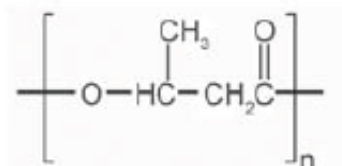
Os PHA's têm sido amplamente utilizados como matéria-prima em diversas aplicações, com destaque para embalagens de produtos de limpeza, higiene, cosméticos e alimentos (SQUIO E ARAGAO, 2004), produtos moldados, revestimento de papel, adesivos, películas, etc. (BUGNICOURT et al., 2014). Na área médica são utilizados para a fabricação de fios de sutura, próteses ósseas, suportes de culturas de tecidos para

implantes e composição de sistemas de liberação controlada (SQUIO, 2003), entre outros.

### 3.2.2 Polihidroxibutirato (PHB)

Dentre os PHA's, o mais difundido e estudado, é o PHB (Figura 2), sintetizado no interior de muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como reserva de carbono e energia (GRIGULL et al., 2008). O processo de produção do PHB é bacteriano, ou seja, os micro-organismos transformam os açúcares que ingerem, em poliéster. Em seguida, é realizada a extração e purificação do polímero acumulado em seu metabolismo (WENDLANDT et al., 1998).

O PHB é um poliéster linear de ácido D(IGGUI et al.)-3-hidroxibutírico, cuja massa molecular difere de um organismo para outro, das condições de crescimento e método de extração (BUGNICOURT et al., 2014).



**Figura 2:** Estrutura química do PHB.  
Fonte: BUGNICOURT et al. (2014) .

A produção comercial de PHB iniciou cinquenta anos depois de sua descoberta (URTUVIA et al., 2014). No Brasil, o desenvolvimento de tecnologia para obtenção deste polímero biodegradável iniciou em 1992, por meio de um acordo de cooperação entre o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) de São Paulo e a Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (Copersúcar). Neste mesmo período foi registrada a marca BIOCYCLE<sup>®</sup>. Em 1994, foram concluídos os estudos laboratoriais dos quais originaram cinco patentes, e iniciaram-se os estudos para a implantação de uma planta piloto com o intuito de testar a tecnologia desenvolvida em laboratório em equipamentos de escala industrial.

Em 1995, a instalação desta planta piloto na Usina da Pedra, em Serrana – SP, foi completada, quando foram realizados os primeiros testes para a produção do PHB e



do copolímero PHBV. A partir de 1996, os lotes obtidos foram enviados a Institutos de Pesquisa e empresas, no Brasil e no exterior e, em 2001, iniciaram-se os estudos para o desenvolvimento de blendas e compósitos a partir do PHB e seu copolímero PHBV (BIOCYCLE, 2017).

O PHB é um termoplástico renovável, biocompatível e linear (WELLEN et al., 2013) com baixa permeabilidade a oxigênio e água e propriedades de barreira atrativas em relação a outros poliésteres (CASARIN et al., 2013; CORREA et al., 2017). O grau de cristalinidade do PHB encontra-se na faixa de 55-80%, com temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de, aproximadamente, 5°C, temperatura de fusão ( $T_m$ ) em 175°C e diminuição da massa molar em temperatura acima de 170°C (MACHADO et al., 2010).

Entretanto, o PHB é muito cristalino e quebradiço (SAVENKOVA et al., 2000; BOYANDIN et al., 2013) e seu elevado custo de produção o impede de competir com os polímeros convencionais (SAVENKOVA et al., 2000). Por esses motivos, a combinação de PHB com outros polímeros (blendas) ou compósitos (com fibras) tem sido estudada, com o intuito de melhorar suas propriedades físicas e diminuir o custo da produção.

EL-HADI et al. (2002) avaliaram blendas de PHB e do copolímero poli(hidroxitirato-co-hidroxicvalerato) (PHBV) com outros polímeros biodegradáveis, plastificantes, lubrificantes e agentes de nucleação. A adição de plastificantes e agentes de nucleação diminuiu a temperatura de transição vítrea e a cristalinidade, além de aumentar a resistência ao impacto e o alongamento a ruptura.

### 3.2.3 Uso de PHA's como embalagens

Os PHAs têm sido amplamente utilizados como matéria-prima em diversas aplicações devido à sua biocompatibilidade (DA SILVA et al., 2007), com ênfase especial na limpeza, higiene, cosméticos e embalagens de alimentos (SQUIO E ARAGAO, 2004), produtos moldados, revestimentos de papel, adesivos, filmes, etc. Polímeros biodegradáveis são usados em vários tipos de itens de contato com alimentos, incluindo talheres descartáveis, copos, saladeiras, pratos, embalagens e filmes de laminação, tampas e recipientes para alimentos distribuídos em delicatessens e

restaurantes *fast-food* (VINHAS et al., 2007). Além disso, novos sistemas de embalagem utilizando polímeros biodegradáveis com atividade antimicrobiana despertaram interesse em estudos utilizando PHA's.

Vinhas, Almeida e Lima (2007) avaliaram as propriedades e a biodegradabilidade das misturas P(3HB)/amido e PHBV/amido. Embora a adição de amido diminua as propriedades mecânicas dos filmes, a sua incorporação nos polímeros permitiu um aumento significativo da biodegradabilidade, possivelmente devido à facilidade deste carboidrato ser consumido como fonte alternativa de carbono pelos fungos. Concluíram que as misturas de P(3HB)/amido e PHBV/amido são uma boa alternativa para aplicação em embalagens, uma vez que a presença de amido oferece um custo acessível ao mercado.

O ácido tânico é um aditivo natural e pode ser extraído de plantas e vegetais. O uso de ácido tânico em P (3HB) aumentou a estabilidade térmica do polímero, tornando sua aplicabilidade mais atraente (AURIEMMA et al., 2015).

Plasmas de PLA, PCL e P(3HB) com amônio quaternário foram desenvolvidos e avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*. Foi demonstrado que a eficácia da atividade antibacteriana desses polímeros é devida ao grupo do amônio quaternário e, em todos os casos, não foi observada liberação dos agentes ativos, o que oferece inúmeras vantagens para aplicações antimicrobianas em que a liberação de agentes ativos é proibida (BELKHIR et al., 2017).

Materiais biopaniméricos de PHBV revestidos com nanopartículas de prata (AgNP) foram desenvolvidos para uso em superfícies de contato com alimentos e superfícies médicas. A adição de cargas muito baixas de AgNP forneceu atividade virucida contra o norovírus humano, a principal causa de gastroenterite, e não modificou significativamente as propriedades ópticas dos filmes (CASTRO-MAYORGA et al., 2017). Em outro estudo, os mesmos autores demonstraram que o empacotamento de PHBV com AgNP apresentou atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* em quantidade muito baixa (0,4 g/kg AgNP), com potencial para aplicação em filmes e revestimentos, como embalagem de alimentos ativos (CASTRO-MAYORGA et al., 2016).

Filmes de PHBV com óxido de zinco (ZnO) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de níveis de

migração de nanocompósitos abaixo do limite permitido, demonstrando aplicação promissora em embalagens de alimentos e bebidas (DÍEZ-PASCUAL E DIEZ-VICENTE, 2014).

Filmes P(3HB) foram produzidos com a adição de óxido de zinco nanoestruturado (ZnOnano) em diferentes concentrações e avaliados sua atividade antimicrobiana na presença de *E. coli*. O filme de óxido de 5% inibiu o crescimento de *E. coli*, mostrando assim uma aplicação promissora no empacotamento de alimentos (de Lima Júnior, 2016).

Requena, Jiménez, Vargas e Chiralt (2016), avaliaram a atividade antimicrobiana de filmes de PHBV com quatro componentes ativos: óleo essencial de orégano, carvacrol, óleo essencial de cravo e eugenol contra *Escherichia coli* e *Listeria innocua*, com maior eficácia do óleo de orégano e carvacrol.

Nanocompósitos de PHBV e nanocristais de celulose com prata (CNC-Ag) em várias concentrações foram avaliados microbiologicamente, contra *E. coli* e *S. aureus* utilizando o método de disco-difusão, apresentando forte atividade antibacteriana. Além disso, apresentaram alta resistência mecânica com potencial para aplicação em embalagens de alimentos (YU, 2014).

Foi realizada a modificação do PHBV com três monômeros com potencial antibacteriano: cloreto de 2-[(metacrilóiloxi)-etil] trimetilamônio (META), 2-[(metacrilóiletil)]-dimetil-(3-sulfopropil) amônio (MESA) e 2-Metacrilato de hidroxietilo (HEMA). Ambos mostraram inibição completa da adesão de *S. aureus* e 99% de adesão de *E. coli* (MANECKA et al., 2014).

P(3HB)/PCL (Polihidroxiбутирато/Policaprolactona) e misturas organo-argilas (Cloisite® 30B e 10A) foram estudadas quanto às propriedades mecânicas e térmicas, barreira ao vapor de água e ativação da nisina. Além disso, a adsorção de nisina na matriz P(3HB)/PCL com e sem argila foi estudada e comparada para encontrar possíveis efeitos antimicrobianos sinérgicos. Os filmes de P(3HB)/PCL ativados por nisina foram eficazes contra o *Lactobacillus plantarum* CRL691 (usado como modelo de bactéria de decomposição de carne processada) inoculada em presunto cozido, prolongando a vida útil deste alimento. Dessa forma, a mistura de P(3HB)/PCL e seus nanocompósitos ativados com nisina mostrou potencial para aplicação em embalagens de carnes processadas (CORREA et al., 2017).

O sistema multicamadas também merece destaque no uso de PHAs e na incorporação de aditivos antimicrobianos. O cinamaldeído, composto ativo da canela com atividade virucida, foi utilizado em conjunto com uma camada de eletrospun à base de zeína em P(3HB) em forma multicamada. A 25°C, os resultados demonstraram uma melhor atividade antiviral, bem como o potencial deste sistema multicamada para aplicações em contato com alimentos, e para tecnologias de embalagem ativa, a fim de manter ou aumentar a qualidade e segurança dos alimentos (FABRA et al., 2016).

RAMACHANDRAN et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e metanólico da *Clitoria ternatea* pura e incorporada no PHB. Os discos embutidos no extrato etanólico apresentaram halo de inibição contra os dez micro-organismos testados, enquanto o extrato metanólico não foi eficiente contra três deles. Os extratos incorporados na matriz PHB não foram efetivos, mas não houve crescimento sob os filmes como ocorreu com o controle (PHB puro).

Filmes de P(3HB) foram preparados com a incorporação de vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) em concentrações de 10 a 200 µg/g de PHB e avaliadas quanto atividade antimicrobiana na presença de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ocamusus*, *Penicillium viridicatum* e *Penicillium clavigerum*. A concentração mínima de vanilina requerida para exibir atividade antimicrobiana foi  $\geq 80$  µg/g PHB para bactérias e  $\geq 50$  µg/g PHB para fungos (XAVIER et al., 2015).

O ácido acrílico foi enxertado em membranas PHB e PHBV tratadas com ozônio. As membranas resultantes foram ainda enxertadas com quitosana ou quitooligossacarídeo via esterificação. Estas membranas enxertadas com quitosana ou quitooligossacarídeo apresentaram atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *S. aureus*. A atividade antibacteriana para *E. coli* foi a mais alta, onde a atividade antibacteriana do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina foi a menor entre as quatro bactérias testadas (HU et al., 2003).

### 3.3 MATERIAIS POLIMÉRICOS E O MEIO AMBIENTE

Polímeros sintéticos apresentam aplicações em embalagens, fabricação de automóveis, na indústria de alimentos e farmacêutica. Entretanto, são dispostos em aterros sanitários com resíduos domésticos e dificultam a circulação de líquidos e gases, retardando a decomposição da matéria orgânica (ROSA et al., 2002), acumulação em habitats naturais, ingestão por animais selvagens, lixiviação de produtos químicos de plásticos e transferência de produtos químicos para animais e seres humanos (THOMPSON, SWAN, et al., 2009).

THOMPSON, SWAN, et al. (2009) , destacam, que a principal desvantagem em relação aos plásticos petroquímicos, é a utilização de fonte não renovável, além de que a maior parte dos polímeros produzidos são para embalagens, que rapidamente são descartadas.

Cabe acrescentar que os plásticos são transportados a longas distâncias, principalmente, nos oceanos, onde eles têm uma variedade de impactos ambientais e econômicos (THOMPSON, MOORE, et al., 2009; THOMPSON, SWAN, et al., 2009). Esta disponibilidade no ambiente afeta, sistemas terrestres e de água doce, incluindo a ingestão e o emaranhamento dos animais, os sistemas de drenagem bloqueados e os impactos estéticos (RYAN et al., 2009).

A maioria dos plásticos se degrada lentamente através da fotodegradação, oxidação e abrasão mecânica (ANDRADY, 2003), no entanto, fragmentos maiores e espessos persistem por décadas, principalmente, quando protegidos de radiação UV (RYAN et al., 2009) e em temperaturas mais baixas, como por exemplo quando dispostos na água (GREGORY E ANDRADY, 2003).

Progressos significativos quanto ao desenvolvimento de plásticos biodegradáveis têm sido registrados. Em grande parte com o objetivo de criar materiais biodegradáveis com função similar aos polímeros convencionais e essa expansão tem tido vários benefícios potenciais para os equilíbrios de gases de efeito estufa e outros impactos ambientais ao longo de ciclos de vida inteiros e no uso de recursos renováveis (SONG et al., 2009).

O custo destes polímeros, entretanto, é ainda muito alto em comparação aos plásticos petroquímicos. No entanto, nas últimas décadas tem apresentado taxas de crescimento significativas e assim, espera-se que os bioplásticos se tornem mais valorizados com o passar dos anos, pelo aumento do preço do petróleo, maior conscientização ambiental e legislação associada a seu uso (SONG et al., 2009).

### 3.4 BIODEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS

Apesar da importância dos plásticos em diversas aplicações, principalmente, na indústria de embalagens, seu descarte tem influência considerável no meio ambiente em função de sua degradação. Por isso, há uma tendência significativa em sua substituição por polímeros biodegradáveis.

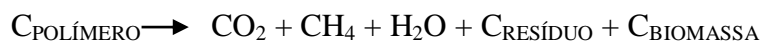
A biodegradação dos polímeros, normalmente, é provocada pela ação microbiana de fungos, bactérias e algas. Os materiais biodegradáveis degradam-se em biomassa, dióxido de carbono e metano, enquanto que os polímeros sintéticos a degradação ocorre devido à utilização de carbono, de sua estrutura, pelos microorganismos (JAYASEKARA et al., 2005).

De acordo com BASTIOLI (1995) e LEJA e LEWANDOWICZ (2010) a biodegradação pode ocorrer tanto na presença como na ausência de oxigênio, conforme as reações abaixo.

Biodegradação Aeróbica:



Biodegradação Anaeróbica:



Se houver a presença de oxigênio, é produzido o dióxido de carbono. Se não há oxigênio, uma degradação anaeróbia ocorre e o metano é produzido em vez de dióxido de carbono. Enquanto que, quando há conversão de materiais biodegradáveis ou de biomassa em gases (como dióxido de carbono, metano e compostos de nitrogênio), água, sais, minerais e biomassa residual, esse processo é chamado de mineralização. A mineralização é completa quando todos os materiais biodegradáveis ou biomassa são consumidos e todo o carbono é convertido em dióxido de carbono (KYRIKOU E BRIASSOULIS, 2007).

O processo mais importante para iniciar a biodegradação de polímeros sintéticos é a hidrólise e ocorre, geralmente, pela ação de enzimas da classe das hidrolases. A degradação completa de uma longa cadeia polimérica se dá em etapas, com a formação

de oligômeros nas etapas iniciais, que podem ser hidrolisados a unidades monoméricas do polímero (SHAH et al., 2014), que no caso dos poliésteres são, em sua maioria, ácidos carboxílicos, álcoois e hidroxiácidos (ALBUQUERQUE et al., 2014).

A biodegradação dos polímeros envolve três etapas: 1. Biodeterioração: com modificação mecânica, química e das propriedades físicas em função do crescimento microbiano sobre o filme ou dentro; 2. Biofragmentação: transformação dos polímeros em oligômeros e monômeros pela ação microbiana; 3. Assimilação: os microorganismos são supridos pelas fontes de carbono, energia e nutrientes da fragmentação de polímeros e ocorre a conversão do carbono em CO<sub>2</sub>, água e biomassa (LUCAS et al., 2008).

Algumas propriedades dos polímeros, como a composição química, a estrutura química, a massa molar, a cristalinidade e a temperatura de fusão exercem influência sobre os rendimentos das degradações biológicas (COSTA et al., 2015; EMADIAN et al., 2017). A estrutura química é o fator mais importante que afeta a biodegradabilidade dos materiais poliméricos (ACEMOGLU, 2004), pois é ela que conduz as propriedades físico-químicas do material, sua interação com o ambiente físico (PLATT, 2006) e sua aplicabilidade.

Entretanto, o processo de biodegradação de polímeros é lento, apresentando uma fase lag de cerca de 5 dias (ZHAO et al., 2005) e até 120 dias para se observar uma redução significativa na massa molar numérica média (Mn) da macromolécula (WU, 2011).

#### 3.4.1 Biodegradação de PHB

Estudos tem investigado a biodegradabilidade dos bioplásticos em diferentes condições ambientais, como no solo, em compostagem, água do mar e outros ambientes aquáticos (EMADIAN et al., 2017).

O PHB pode ser completamente degradado em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O por microorganismos, sendo esta uma de suas propriedades mais importantes (BONARTSEV et al., 2007). Este pode ser degradado em ácido 3-hidroxi-butírico por hidrolase de oligômero e despolimerase de PHB. O ácido 3-hidroxi-butírico produzido pode então ser

oxidado a acetato de acetila por uma enzima desidrogenase. A reação do acetato de acetila com  $\beta$ -cetotiolase gera acetil coenzima A que pode ser utilizada para a regeneração celular (KOBAYASHI et al., 2005).

ROSA et al. (2003) avaliaram a biodegradação de PHB em composto derivado de resíduos sólidos municipais e observaram que a biodegradação deste polímero ocorreu em três fases: 1. envolveu hidrólise do polímero, com ataque por moléculas de água e consequente cisão polimérica, e a formação de fragmentos de polímero. 2. envolveu a ação de micro-organismos, com ataque enzimático aos fragmentos gerados na primeira etapa e; 3. caracterizada por estabilização dos valores, indicando a biodegradação total.

ALTAEE et al. (2016b) avaliaram a biodegradação de filmes de PHB puro, filmes de PHB com  $\text{TiO}_2$  (Dióxido de Titânio), expostos e não a UV por 24h, nanofibras de PHB e nanofibras de PHB com  $\text{TiO}_2$ . Todos os filmes apresentaram degradação, sendo que as nanofibras degradaram-se mais rapidamente e os filmes com  $\text{TiO}_2$  influenciaram na degradação em comparação aos filmes puros. Ainda, os autores observaram que todos os filmes poliméricos foram degradados em monômeros e oligômeros de *R*-3-hidroxitirato, que são assimilados por micro-organismos e suas atividades enzimáticas.

### 3.5 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO

#### 3.5.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de FTIR é uma técnica que permite a análise qualitativa de compostos orgânicos porque as ligações químicas das substâncias possuem frequências específicas de de vibração e, assim, provocam o aparecimento de bandas no espectro infravermelho que também são influenciadas pela presença de grupos funcionais próximos (acoplamentos). A espectroscopia FTIR atua também como uma ferramenta para análise quantitativa porque as intensidades de absorção das bandas no espectro são proporcionais à concentração (SOUZA E POPPI, 2012).

Neste trabalho, o FTIR foi empregado, para examinar as interações químicas entre o PHB e os óleos essenciais. A mistura de duas ou mais substâncias refletem em



mudanças características nas bandas dos espectros devido as combinações físicas *versus* as interações químicas (YIN et al., 1999).

O princípio de funcionamento desta análise consiste na energia da fonte de infravermelho, que atravessa um divisor de feixes, separando-a em dois feixes perpendiculares: um segue na direção original e o outro é desviado por um ângulo de 90°. O feixe desviado vai para o espelho fixo e é refletido de volta para o divisor de feixes. O feixe que não sofreu desvio vai para um espelho móvel e também é refletido de volta para o divisor de feixes, porém o movimento do espelho faz variar a trajetória do segundo feixe. Quando os dois feixes se encontram no divisor de feixes, esses se recombinam e causam interferências, tanto construtivas como destrutivas. O feixe combinado atravessa a amostra e dá origem ao interferograma. O computador compara o interferograma modificado com o interferograma padrão produzido por um feixe de laser de referência. O interferograma final está no domínio tempo, então o computador realiza um processo matemático chamado transformada de Fourier, a fim de extrair as frequências individuais que foram absorvidas e reconstruir o gráfico conhecido como espectro infravermelho (PAVIA et al., 2010).

### 3.5.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é o estudo da mudança na massa em função da temperatura, tempo e/ou atmosfera. Para medir a mudança de massa, o equipamento dispõe de uma balança muito sensível. O TGA fornece as temperaturas de início de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{max}}$ ), obtida a partir da primeira derivada, tornando possível avaliar a degradação térmica e a porcentagem de perda de massa dos polímeros (SPIER, 2005).

### 3.5.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) tem por objetivo medir a diferença na taxa de fluxo de calor entre a amostra e uma amostra de referência, enquanto estão sendo submetidas a uma variação de temperatura controlada. Desta forma, as medidas de DSC fornecem informações de efeito térmico, como temperatura e entalpia de fusão ( $T_m$ ), temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), além de permitir o cálculo do grau de cristalinidade (IGGUI et al.) do polímero (BARRA et al., 2003; MACHADO, 2004; HÖHNE et al., 2013). Um sinal é produzido e é plotado um gráfico a cada momento em que a amostra passa por uma transição de estado térmico (BILLMEYER, 1984).

A técnica de DSC auxilia na avaliação da influência de aditivos sobre as propriedades dos materiais resultantes (cargas, plastificantes, entre outros), medir o calor específico, estudar reações de polimerização e de cura e também avaliar a degradação térmica e oxidativa (SPIER, 2005).

#### 3.5.4 Difração de raios-x (DRX)

A difração de raios-x (DRX) é um método utilizado para investigar o arranjo ordenado de átomos ou moléculas através da interação da radiação eletromagnética que fornece efeitos de interferência com estruturas compatíveis em tamanho com o comprimento de onda da radiação (BILLMEYER, 1984). Ou seja, uma ferramenta para determinação da estrutura cristalográfica em polímeros cristalinos.

#### 3.5.5 Ensaio mecânico

As propriedades mecânicas dos polímeros são de grande importância em função dos requisitos que os polímeros devem atender na maior parte das aplicações. O ensaio de tração é usado para o levantamento de informações sobre a resistência dos materiais.

Este teste se caracteriza pela aplicação de uma carga crescente em função do tempo a um corpo de prova ao mesmo tempo em que são medidas as variações no

comprimento. Em seguida, um gráfico é gerado e através desse gráfico, pode-se confrontar como se dá a deformação do corpo de prova (eixo X), em função do crescente aumento de tensão (eixo Y) (DE OLIVEIRA GOMES, 2014).

O PHB forma estruturas esferulíticas compostas por uma fase amorfa e outra cristalina. A degradação do polímero ocorre primeiramente na fase amorfa e depois na fase cristalina. E sua taxa de degradação e morfologia são influenciados pelo grau de cristalinidade do material. O tamanho dos esferulitos influencia diretamente às propriedades mecânicas do polímero: quanto maior essas estruturas mais quebradiças é o material (ALMEIDA, 2005).

### 3.5.6 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-vis)

Essa técnica é utilizada para obter informações sobre o comportamento eletrônico de determinados materiais (MATTOSO et al., 1994), além de ser utilizado para avaliar a transmitância ou absorbância de luz de filmes poliméricos.

O processo de absorção se inicia quando a luz passa pela amostra. A quantidade de luz absorvida é a diferença entre a intensidade da radiação incidente ( $I_0$ ) e a radiação transmitida ( $I$ ). A quantidade de luz transmitida é expressa tanto em transmitância como absorbância (SKOOG E LEARY, 1992).

## 3.6 MICRO-ORGANISMOS DO SOLO

Além de ser habitat para as plantas, o solo é um microssistema rico em bactérias, fungos, protozoários e animais invertebrados (GILLER et al., 1997). Os microorganismos desempenham diversas funções no solo, como decomposição de matéria orgânica, ciclagem dos nutrientes e interações como micorrizas e rizóbio-leguminosas (KENNEDY E GEWIN, 1997). A atividade microbiana em solos é regulada por condições nutricionais, temperatura e disponibilidade de água e outros fatores (SCHLOTTER et al., 2003).

Os fungos atuam, principalmente, na degradação de material vegetal morto (BRIDGE E SPOONER, 2001) e estão relacionados a umidade do solo, quantidade de carbono orgânico e de fósforo disponível (VIJAYAKUMAR E NARASIMHAM, 1995). No entanto, as bactérias constituem o maior número, com funções como processos de síntese e influência sobre a fertilidade do solo (GALLI, 1964).

### 3.7 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de material vegetal, como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes (BURT, 2004), além de apresentarem forte odor, muitos óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana e antioxidante.

A atividade antimicrobiana é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo, conhecida como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (OSTROSKY et al., 2008) ou pelo método de disco-difusão, que consiste na difusão do antimicrobiano na superfície do ágar com micro-organismo.

Neste trabalho, foram utilizados para incorporação em filmes de PHB de eugenol e dos óleos essenciais de melaleuca, canela e citronela. Na Tabela 1, apresenta-se os principais componentes desses óleos e referências de suas atividades antimicrobianas. Entretanto, os óleos essenciais de plantas da mesma espécie podem apresentar substâncias químicas diferentes em função das condições de cultivo, genética, clima, tipo de solo e quantidade de chuva (GOBBO-NETO E LOPES, 2007).

Os óleos essenciais são preferencialmente apolares, bem como o PHB, desta forma ocorrem interações físicas como interações fracas de hidrogênio, dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido, que não geram modificações químicas nas moléculas. Essas forças de atração são fracas, visto que o óleo é liberado da matriz polimérica, se ocorresse reação química o princípio ativo não seria liberado e não apresentaria atividade antimicrobiana.

### 3.8 EMBALAGENS ATIVAS

A embalagem é usada para proteger os alimentos contra alterações ou contaminação por agentes físicos, químicos e biológicos. Ou seja, mantendo a qualidade do alimento após o processamento, mantendo-o saudável para consumo mesmo após o transporte (PRASAD E KOCHHAR, 2014). A embalagem ativa é uma inovação em relação a este conceito, pois se baseia na incorporação de aditivos nas embalagens que liberam ou absorvem substâncias do alimento ou do ambiente externo, a fim de prolongar a vida útil e manter a qualidade, segurança e características. aspectos da alimentação (CAMO et al., 2008). Além disso, eles podem ser usados para aumentar o prazo de validade, minimizar a deterioração microbiológica e inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos, aumentando a qualidade e a segurança dos alimentos (PEREZ ESPITIA et al., 2012).

Esse tipo de embalagem desempenha um papel dinâmico na preservação de alimentos e permite que os pacotes "interajam" com alimentos e meio ambiente, pois permitem a regulação de vários fatores que podem influenciar a vida de prateleira dos alimentos, como fatores fisiológicos (por exemplo, respiração frutas e vegetais frescos), produtos químicos (por exemplo, oxidação lipídica), físicos (por exemplo, desidratação) e microbiológicos (PULIGUNDLA et al., 2012).

No entanto, esses pacotes devem atender a determinadas condições para uso pelo setor, como: a. os materiais devem ser adequados e eficazes para o uso pretendido. b. materiais e artigos, incluindo o ativo e inteligente, devem ser fabricados de acordo com as boas práticas de fabricação. c. os materiais devem exibir informações sobre o uso ou usos permitidos e outras informações relevantes, como o nome e a quantidade de substâncias liberadas pelo componente ativo. d. rotulagem obrigatória com as palavras "não comer" deve ser fornecida (PRASAD E KOCHHAR, 2014).

Os tipos de embalagens ativas descritas são: sequestradores de oxigênio, sistema gerador de dióxido de carbono, sequestrantes de etileno, absorvedor / liberador de sabor e odor, antimicrobianos e antioxidantes (VÉRONIQUE, 2008; PRASAD E KOCHHAR, 2014).

A presença de oxigênio nas embalagens permite o crescimento de vários microrganismos aeróbicos e, conseqüentemente, a deterioração dos alimentos. Além

disso, prejudica a alimentação em função de reações catalisadas por enzimas, oxidação lipídica e outras reações oxidativas (MILLS, 2005). Em relação às embalagens oxigenadas, é uma prática comum desenvolver materiais contendo uma dispersão de substâncias ativas para reduzir a concentração de oxigênio na embalagem. Isso acontece porque esses compostos reagem por aprisionamento ou conversão de oxigênio em produtos menos reativos (JOVEN et al., 2015).

Da mesma forma, o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) formado em alguns alimentos deve ser removido para evitar o colapso da embalagem ou deterioração dos alimentos (AL-NEHLAWI et al., 2013). No entanto, em certos alimentos, altos níveis de CO<sub>2</sub> são necessários para inibir o crescimento microbiano nas superfícies e, por sua vez, prolongar a vida útil dos alimentos embalados (DANIELS et al., 1985; PRASAD E KOCHHAR, 2014).

A presença de etileno acelera a respiração de frutas e verduras e, conseqüentemente, a senescência e encurta a vida útil desses alimentos. Os sistemas de absorção de etileno incluem o uso de materiais oxidantes de etileno, como o permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) (TERRY et al., 2007), comumente usado na forma de sachês colocados dentro da embalagem (TAS et al., 2017).

Outro método é a adição de essências e odores, que podem aumentar a demanda por alimentos, melhorar o aroma ou aumentar o sabor dos alimentos quando o pacote é aberto. A liberação pode ser lenta durante a vida útil do produto ou controlada para ocorrer quando o pacote é aberto (ALMENAR et al., 2009). A interação de embalagens com aromatizantes tem sido reconhecida há muito tempo, no entanto, comercialmente, poucas técnicas de empacotamento ativo têm sido usadas para remover seletivamente aromas e manchas indesejáveis, apesar de seu potencial (COLES et al., 2003). Os aromas podem ser adicionados para compensar a degradação no armazenamento ou um sabor desejável pode ser gerado por uma camada externa de um pacote em vez de ser libertado de uma camada interna para compensar as perdas de escarpelamento ou processamento (ROONEY, 1995).

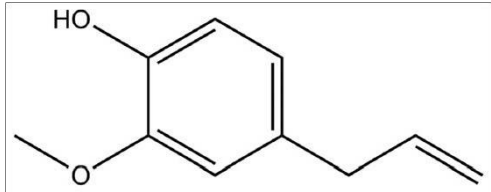
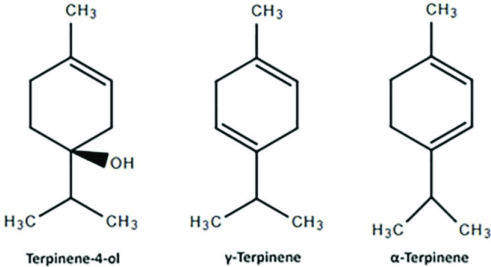
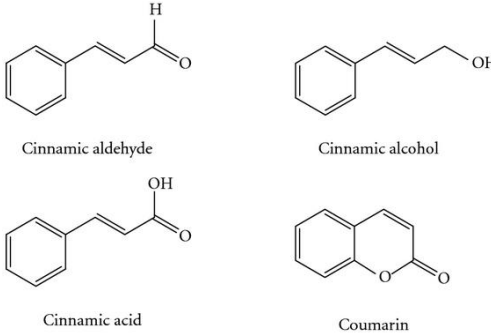
Uma ampla variedade de agentes pode ser adicionada e atuar em alimentos, como antioxidantes e antimicrobianos.

O empacotamento antimicrobiano consiste no uso de compostos ativos para estender o prazo de validade dos alimentos (NAIRETTI et al., 2014), inibindo o crescimento microbiano. PRASAD e KOCHHAR (2014) citam alguns exemplos desses

compostos: etanol, dióxido de carbono, íons de prata, dióxido de cloro, antibióticos, ácidos orgânicos, óleos essenciais e temperos, etc. Além disso, eles podem ser de várias formas, incluindo: 1. Adicionando saquetas/almofadas com agentes antimicrobianos voláteis em embalagens; 2. Incorporação de agentes antimicrobianos voláteis e não voláteis diretamente em polímeros; 3. Revestimento antimicrobiano ou adsorção em superfícies poliméricas; 4. Imobilização de agentes antimicrobianos em polímeros por ligações iônicas ou covalentes; e 5. Uso de polímeros antimicrobianos (APPENDINI E HOTCHKISS, 2002).

Como o crescimento microbiano, a oxidação lipídica também é responsável pela deterioração de muitos alimentos. Portanto, uma alternativa é a adição de antioxidantes ao pacote, cuja principal vantagem é fornecer uma liberação prolongada de antioxidantes durante o armazenamento de alimentos (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014).

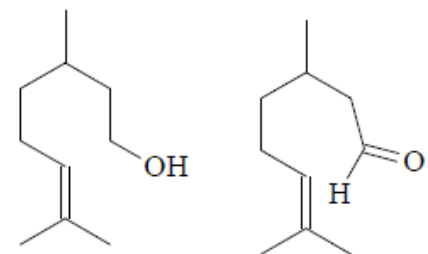
**Tabela 1.** Componentes marjoritários dos óleos essenciais e sua ação antimicrobiana.

Planta	Composto utilizado	Estrutura Química (componentes marjoritários)	Componentes	Atividade Antimicrobiana
<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	 <p>(DALAI et al., 2014)</p>	<p>Eugenol (85 a 95%); Iso-eugenol e metileugenol (AMIRI et al., 2008); Eugenol (76,8%), <math>\beta</math>-cariofileno (17,4%), <math>\alpha</math>-humuleno (2,1%) (CHAIEB et al., 2007); Eugenol (85,3%) (PINTO et al., 2009); Eugenol (70-80%) (JU et al., 2018).</p>	<p><i>Candida</i> spp. e <i>Aspergillus</i> spp.(PINTO et al., 2009); <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella enteritidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> (ORTIZ et al., 2018); <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>(GUL et al., 2018); <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (HEREDIA-GUERRERO et al., 2018); <i>Listeria monocytogenes</i> (KHALEQUE et al., 2016).</p>
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Melaleuca	 <p>(RAHMAN et al., 2018)</p>	<p>Terpineno, <math>\gamma</math>-terpineno, <math>\alpha</math>-terpineno e <math>\beta</math>-fenchol (SADEKUZZAMAN et al., 2018); 1,8-cineole, terpinen-4-ol e <math>\alpha</math>-terpineol (CARSON et al., 2002); Terpinen-4-ol, <math>\gamma</math>-terpineno, <math>\alpha</math>-terpineno, p-cimeno, terpinoleno, <math>\alpha</math>-terpineol e <math>\alpha</math>-pineno (BROPHY et al., 1989).</p>	<p><i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp (SADEKUZZAMAN et al., 2018); <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i> (COX et al., 2000).</p>
<i>Cinnamomum cassia</i>	Canela	 <p>(LIAO et al., 2012)</p>	<p>Cinamaldeído (50-60%) e eugenol (4-7%) (JU et al., 2018); <i>trans</i>-cinamaldeído (68,52%), copaeno (4,66%), benzenopropanal (3,67%), <math>\gamma</math>-cadineno (3,41%), <i>cis</i>-cinamaldeído (2,15%), <math>\alpha</math>-cadinol (1,85%), álcool cinâmico (1,24%) (HUANG et al., 2014); Cinamaldeído (92,40%), <i>trans</i>-cinamaldeído (2,73%), benzaldeído (1,52%), estireno, álcool diacetona, benzilcarboxaldeido, fenol, ácido <i>trans</i>-cinâmico e ácido octadecadienóico.</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Salmonella typhimurium</i> (HUANG et al., 2014); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> (KASKATEPE et al., 2016).</p>



**Tabela 1.** Componentes marjoritários dos óleos essenciais e sua ação antimicrobiana.

*Cymbopogon winterianus*  
Citronela



**Citronelol**  
adaptado de (MACIEL et al., 2010)

**Citronelal**

Citronelol, citronelal e geraniol (principais)  
(AHMAD E VILJOEN, 2015);

Citronelal, *trans*-geraniol e citronelol (principais)  
(SIMIC et al., 2008).

*Phomosis helianthi*, *Phoma macdonaldii*, *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus* (SIMIC et al., 2008);  
*Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (AHMAD E VILJOEN, 2015).

XU et al. (2008) avaliaram a composição, propriedade antimicrobiana e mecanismo de ação do óleo de cravo. O eugenol (76,23%) foi o principal componente encontrado e o óleo de cravo apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, entretanto, o efeito antimicrobiano contra este micro-organismo dependia da concentração e tempo de exposição do micro-organismo frente ao antimicrobiano. O mecanismo de ação do óleo de cravo está relacionado a interação do óleo com a parede celular e com as membranas, causando a perda de material intracelular e a morte bacteriana, respectivamente. Em estudo realizado por SANLA-EAD et al. (2012), filmes a base de celulose incorporados com eugenol e cinamaldeído apresentaram inibição moderada para *E. coli* e *S. aureus* e inibição leve frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

A canela é obtida a partir da casca interna de árvores do gênero *Cinnamomum* da família Lauraceae e é uma planta muito utilizada por diferentes culturas em todo o mundo. Dentre as quase 300 variedades existentes as que possuem maior destaque são a canela verdadeira ou canela da Índia (*Cinnamomum zeylanicum*) e a falsa canela ou canela da China (*Cinnamomum cassia*) (RANASINGHE et al., 2013). O principal componente do óleo da casca e folha da canela da China é o cinamaldeído, que exibe atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de micro-organismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus niger*.

O óleo essencial das folhas da *Melaleuca alternifolia* é rico em terpinen-4-ol (29,4 – 44,9%) eficaz contra bactérias, fungos e vírus. Este óleo tem se destacado como antimicrobiano principal ou como conservante natural em produtos farmacêuticos e cosméticos. Além disso, pode ser bactericida ou bacteriostático, quando usado em baixas concentrações (COX et al., 2000; GARVIL et al., 2013). Experimento realizado por COX et al. (2000) mostrou que *E. coli* é mais suscetível a ação do óleo de melaleuca do que *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

*Cymbopogon winterianus*, conhecida por citronela, é uma planta da família Poaceae, cultivada na Índia e no Brasil. Apresenta atividade antibacteriana e antifúngica, principalmente, frente à *Candida albicans* (OLIVEIRA et al., 2011). Tem sido utilizada em cosméticos e como aromatizante na indústria de alimentos (SIMIC et al., 2008).

## REFERÊNCIAS

- 2017, BIOCYCLE. Empresa. Disponível em: <http://www.biocycle.com.br/site.htm>. Acesso em: mai. "Empresa." In, <http://www.biocycle.com.br/site.htm>.
- Acemoglu, M. 2004. 'Chemistry of polymer biodegradation and implications on parenteral drug delivery', *International journal of pharmaceutics*, 277: 133-39.
- Ahmad, Aijaz, and Alvaro Viljoen. 2015. 'The in vitro antimicrobial activity of Cymbopogon essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions', *Phytomedicine*, 22: 657-65.
- Al-Nehlawi, A, J Saldo, LF Vega, and S Guri. 2013. 'Effect of high carbon dioxide atmosphere packaging and soluble gas stabilization pre-treatment on the shelf-life and quality of chicken drumsticks', *Meat Science*, 94: 1-8.
- Albuquerque, Marcos de Campos Cavalcanti de, Claudia Maria Soares Ribeiro, Carlos René Klotz Rabelo, Bernardo Galvão Siqueira, Ana Beatriz Abreu Santa Marinha, and Aline Machado de Castro. 2014. 'Applications of enzymes in synthesis and modification of polymers', *Química Nova*, 37: 699-708.
- ALMEIDA, CMS. 2005. 'Análise por XPS e AFM da superfície de blendas de PVC/PHB', Dissertação de Mestrado apresentada a Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Física, Departamento de Física, Rio de Janeiro.
- Almenar, Eva, Ramón Catala, Pilar Hernandez-Muñoz, and Rafael Gavara. 2009. 'Optimization of an active package for wild strawberries based on the release of 2-nonanone', *LWT-Food Science and Technology*, 42: 587-93.
- Alori, Elizabeth T, Bernard R Glick, and Olubukola O Babalola. 2017. 'Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture', *Frontiers in microbiology*, 8: 971.
- Altaee, Nadia, Gamal A El-Hiti, Ayad Fahdil, Kumar Sudesh, and Emad Yousif. 2016a. 'Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil', *SpringerPlus*, 5: 762.
- Altaee, Nadia, Gamal El-Hiti, Ayad Fahdil, Kumar Sudesh, and Emad Yousif. 2016b. *Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil*.
- Amiri, Achour, Robert Dugas, Anne L Pichot, and Gilbert Bompeix. 2008. 'In vitro and in vitro activity of eugenol oil (Eugenia caryophyllata) against four important postharvest apple pathogens', *International Journal of Food Microbiology*, 126: 13-19.
- Andrady, Anthony L. 2003. *Plastics and the Environment* (John Wiley & Sons).
- Appendini, P.; Hotchkiss, J.H. Review of antimicrobial food packaging. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2002, 3(2), 113-26.
- Armentano, Ilaria, Elena Fortunati, Nuria Burgos, Franco Dominici, Francesca Luzi, Stefano Fiori, Alfonso Jiménez, Kicheol Yoon, Jisoo Ahn, and Sangmi Kang. 2015. 'Processing and characterization of plasticized PLA/PHB blends for biodegradable multiphase systems', *Express Polymer Letters*, 9.
- Auriemma, Maria, Amodio Piscitelli, Rossana Pasquino, Pierfrancesco Cerruti, Mario Malinconico, and Nino Grizzuti. 2015. 'Blending poly (3-hydroxybutyrate) with tannic acid: influence of a polyphenolic natural additive on the rheological and thermal behavior', *European Polymer Journal*, 63: 123-31.
- Averous, L, and N Boquillon. 2004. 'Bicomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours', *Carbohydrate Polymers*, 56: 111-22.
- Bardi, MAG, and DS Rosa. 2007. 'AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO EM SOLO SIMULADO DE POLI (?-CAPROLACTONA), ACETATO DE CELULOSE E SUAS BLENDA', *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*, 26: 43-47.

- Barra, Guilherme MO, Jerusa Roeder, Valdir Soldi, Alfredo TN Pires, and José AM Agnelli. 2003. 'Polyamide 6/elastomer blends: properties and compatibilizer influence', *Polímeros*, 13: 95-101.
- Bastioli, C. 1995. 'Degradable polymers, principles and applications', *Chapman & Hall, London*: 112-37.
- Bazzo, Giovana Carolina, E Lemos-Senna, MC Gonçalves, and Alfredo Tiburcio Nunes Pires. 2008. 'Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly (hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam', *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19: 914-21.
- Beleneva, IA, and NV Zhukova. 2009. 'Seasonal dynamics of cell numbers and biodiversity of marine heterotrophic bacteria inhabiting invertebrates and water ecosystems of the Peter the Great Bay, Sea of Japan', *Microbiology*, 78: 369-75.
- Belkhir, Kedafi, Monique Lacroix, Majid Jamshidian, Stéphane Salmieri, Corinne Jegat, and Mohamed Taha. 2017. 'Evaluation of antibacterial activity of branched quaternary ammonium grafted green polymers', *Food Packaging and Shelf Life*, 12: 28-41.
- Billmeyer, Fred W. 1984. 'Textbook of Polymer Science, John Wiley & Sons', *Inc. New York*.
- Bittmann, Birgit, Rebeca Bouza, Luis Barral, Javier Diez, and Carmen Ramirez. 2013. 'Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/clay nanocomposites for replacement of mineral oil based materials', *Polymer Composites*, 34: 1033-40.
- Bonartsev, AP, VL Myshkina, DA Nikolaeva, EK Furina, TA Makhina, VA Livshits, AP Boskhomdzhiyev, EA Ivanov, AL Iordanskii, and GA Bonartseva. 2007. 'Biosynthesis, biodegradation, and application of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymers-natural polyesters produced by diazotrophic bacteria', *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1: 295-307.
- Boyandin, Anatoly N, Svetlana V Prudnikova, Valery A Karpov, Vladimir N Ivonin, Ngọc Lanh Đỗ, Thị Hoài Nguyễn, Thị Mỹ Hiệp Lê, Nikolay L Filichev, Alexander L Levin, and Maxim L Filipenko. 2013. 'Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils', *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83: 77-84.
- Bridge, Paul, and Brian Spooner. 2001. 'Soil fungi: diversity and detection', *Plant and soil*, 232: 147-54.
- Brito, GF, P Agrawal, EM Araújo, and TJA Mélo. 2011. 'Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes', *Revista eletrônica de Materiais e processos*, 6: 127-39.
- Brophy, Joseph J, Noel W Davies, Ian A Southwell, Ian A Stiff, and Lyall R Williams. 1989. 'Gas chromatographic quality control for oil of Melaleuca terpinen-4-ol type (Australian tea tree)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37: 1330-35.
- Bugnicourt, Elodie, Patrizia Cinelli, Andrea Lazzeri, and Vera Alejandra Alvarez. 2014. 'Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging'.
- Burt, Sara. 2004. 'Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review', *International journal of food microbiology*, 94: 223-53.
- Camo, Javier, José Antonio Beltrán, and Pedro Roncalés. 2008. 'Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging', *Meat Science*, 80: 1086-91.
- Canetti, M, M Urso, and P Sadocco. 1999. 'Influence of the morphology and of the supermolecular structure on the enzymatic degradation of bacterial poly (3-hydroxybutyrate)', *Polymer*, 40: 2587-94.
- Carson, Christine F, Brian J Mee, and Thomas V Riley. 2002. 'Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46: 1914-20.
- Casarin, Suzan A, José AM Agnelli, Sônia M Malmonge, and Francisco Rosário. 2013. 'Blendas PHB/copolíesteres biodegradáveis: biodegradação em solo', *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 23: 115-22.

- Castro-Mayorga, Jinneth Lorena, Walter Randazzo, María José Fabra, JM Lagaron, Rosa Aznar, and G Sánchez. 2017. 'Antiviral properties of silver nanoparticles against norovirus surrogates and their efficacy in coated polyhydroxyalkanoates systems', *LWT-Food Science and Technology*, 79: 503-10.
- Castro-Mayorga, JL, MJ Fabra, and JM Lagaron. 2016. 'Stabilized nanosilver based antimicrobial poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanocomposites of interest in active food packaging', *Innovative food science & emerging technologies*, 33: 524-33.
- Catherine, Ann A, Hanumanthiah Deepika, and Pradeep S Negi. 2012. 'Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems', *Journal of Essential Oil Research*, 24: 481-86.
- Ceccorulli, Giuseppina, Maria Pizzoli, and Mariastella Scandola. 1992. 'Plasticization of bacterial poly (3-hydroxybutyrate)', *Macromolecules*, 25: 3304-06.
- Ceyhan, Nur, and Guven Ozdemir. 2011. 'Poly--hydroxybutyrate (PHB) production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes* 12Bi strain', *African Journal of Microbiology Research*, 5: 690-702.
- Chaieb, Kamel, Hafedh Hajlaoui, Tarek Zmantar, Amel Ben Kahla-Nakbi, Mahmoud Rouabhia, Kacem Mahdouani, and Amina Bakhrouf. 2007. 'The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (Syzgium aromaticum L. Myrtaceae): a short review', *Phytotherapy research*, 21: 501-06.
- Chanasit, Wankuson, Lukman Sueree, Brian Hodgson, and Kamontam Umsakul. 2014. 'The production of poly (3-hydroxybutyrate)[P (3HB)] by a newly isolated *Bacillus* sp. ST1C using liquid waste from biodiesel production', *Annals of Microbiology*, 64: 1157-66.
- Chee, Jiun-Yee, Sugama-Salim Yoga, Nyok-Sean Lau, Siew-Chen Ling, Raeid MM Abed, and Kumar Sudesh. 2010. 'Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics', *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2: 1395-404.
- Chen, Guo-Qiang. 2009. 'A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry', *Chemical Society Reviews*, 38: 2434-46.
- Coelho, Nadjane S, Yêda Almeida, and Glória M Vinhas. 2008. 'A Biodegradabilidade da Blenda de Poli (b-Hidroxibutirato-co-Valerato)/Amido Anfótero na Presença de Microrganismos', *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 18.
- Coles, Richard, Derek McDowell, and Mark J Kirwan. 2003. *Food packaging technology* (CRC Press).
- Correa, Juan Pablo, Vanesa Molina, Mariana Sanchez, Cecilia Kainz, Patricia Eisenberg, and Mariana Blanco Massani. 2017. 'Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin', *Food Packaging and Shelf Life*, 11: 31-39.
- Costa, CZ, MCC Albuquerque, MC Brum, and AM Castro. 2015. 'Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão', *Quim. Nova*, 38: 259-67.
- Cox, SD, CM Mann, JL Markham, HC Bell, JE Gustafson, JR Warmington, and SG Wyllie. 2000. 'The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)', *Journal of applied microbiology*, 88: 170-75.
- da Silva, Luiziana Ferreira, José Gregório Cabrera Gomez, Rafael Costa Santos Rocha, Marilda Keico Taciro, and JG da C. Pradella. 2007. 'Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil', *Química nova*, 30: 1732.
- Dalai, Manoj K, Santanu Bhadra, Sushil K Chaudhary, Arun Bandyopadhyay, and Pulok K Mukherjee. 2014. 'Anti-cholinesterase activity of the standardized extract of *Syzygium aromaticum* L', *Pharmacognosy magazine*, 10: S276.
- Dalcanton, Francieli, Jaciane Lutz Ienczak, Mônica Lady Fiorese, and GMF Aragão. 2010. 'Produção de poli (3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de

- amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas', *Quím Nova*, 33: 552-56.
- Daniels, James A, RAJAGOPALAN KRISHNAMURTHI, and Syed SH Rizvi. 1985. 'A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality', *Journal of food protection*, 48: 532-37.
- de Oliveira Gomes, Raphael. 2014. 'CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES MECÂNICAS DE PLÁSTICOS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE AMIDO', Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Díez-Pascual, Ana M, and Angel L Díez-Vicente. 2014. 'ZnO-reinforced poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) bionanocomposites with antimicrobial function for food packaging', *ACS applied materials & interfaces*, 6: 9822-34.
- Din, MF Md, ZAINI Ujang, MV Loosdrecht, and MA Ahmad. 2008. 'Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from saponified sunflower oil in mixed cultures under aerobic condition', *Jurnal Teknologi*, 48: 1-19.
- dos Santos Rosa, Derval, Maria Regina Calil, Cristina das Gracas Fassina Guedes, and Túlio César Rodrigues. 2004. 'Biodegradability of thermally aged PHB, PHB-V, and PCL in soil compostage', *Journal of Polymers and the Environment*, 12: 239-45.
- El-Hadi, A, R Schnabel, E Straube, G Müller, and S Henning. 2002. 'Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends', *Polymer Testing*, 21: 665-74.
- Emadian, S Mehdi, Turgut T Onay, and Burak Demirel. 2017. 'Biodegradation of bioplastics in natural environments', *Waste Manag*, 59: 526-36.
- Fabra, María José, Jinneth Lorena Castro-Mayorga, Walter Randazzo, JM Lagarón, Amparo López-Rubio, Rosa Aznar, and G Sánchez. 2016. 'Efficacy of cinnamaldehyde against enteric viruses and its activity after incorporation into biodegradable multilayer systems of interest in food packaging', *Food and environmental virology*, 8: 125-32.
- Faria, Adriano Uemura de, and Sandra Mara Martins-Franchetti. 2010. 'Biodegradação de filmes de polipropileno (PP), poli (3-hidroxibutirato)(PHB) e blenda de PP/PHB por microrganismos das águas do Rio Atibaia', *Polímeros*, 20: 141-47.
- Flickinger, MC, and SW Drew. 1999. 'Enzyme, immobilization methods', *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*, John Wiley & Sons, New York: 1062-63.
- Flieger, M, M Kantorova, A Prell, T Řezanka, and J Votruba. 2003. 'Biodegradable plastics from renewable sources', *Folia microbiologica*, 48: 27.
- Franchetti, Sandra Mara Martins, and José Carlos Marconato. 2006a. 'Biodegradable polymers-a partial way for decreasing the amount of plastic waste', *Química Nova*, 29: 811-16.
- . 2006b. 'Polímeros biodegradáveis-uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos', *Química Nova*: 811-16.
- Galli, Ferdinando. 1964. 'Microrganismos do solo', *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, 21: 247-52.
- GARVIL, Mariana Pacífico, Gisele Araújo Alvarenga ROSA, Rayane Borges da SILVA, and Aline Pacheco SILVEIRA. 2013. 'AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE MELALEUCA (*Melaleuca alternifolia*)', *e-RAC*, 3.
- Geyer, Roland, Jenna R Jambeck, and Kara Lavender Law. 2017. 'Production, use, and fate of all plastics ever made', *Science advances*, 3: e1700782.
- Giaquinto, Cláudia Daniela Melo, Grasielly Karine Martins de Souza, Viviane Fonseca Caetano, and Glória Maria Vinhas. 2017. 'Evaluation of the mechanical and thermal properties of PHB/canola oil films', *Polímeros*, 27: 201-07.
- Giller, KE, MH Beare, P Lavelle, A-MN Izac, and MJ Swift. 1997. 'Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function', *Applied soil ecology*, 6: 3-16.
- Gobbo-Neto, Leonardo, and Norberto P Lopes. 2007. 'Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários', *Química nova*, 30: 374.

- Gómez-Estaca, Joaquín, Carol Lopez-de-Dicastillo, Pilar Hernández-Muñoz, Ramón Catalá, and Rafael Gavara. 2014. 'Advances in antioxidant active food packaging', *Trends in Food Science & Technology*, 35: 42-51.
- Gregory, Murray R, and Anthony L Andrady. 2003. 'Plastics in the marine environment', *Plastics and the Environment*, 379: 389-90.
- Grigull, Vitor Henrique, Delne Domingos Da Silva, Michele Cristina Formolo Garcia, Sandra Aparecida Furlan, Ana Paula Testa Pezzin, Andréa Lima dos Santos Schneider, and Gláucia Falcão Aragão. 2008. 'Production and Characterization of Poly (3-Hydroxybutyrate) from Oleic Acid by *Ralstonia eutropha*', *Food Technology & Biotechnology*, 46.
- Gul, Osman, Furkan Turker Saricaoglu, Aysegul Besir, Ilyas Atalar, and Fehmi Yazici. 2018. 'Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil', *Ultrasonics sonochemistry*, 41: 466-74.
- Heredia-Guerrero, José A, Luca Ceseracciu, Susana Guzman-Puyol, Uttam C Paul, Alejandro Alfaro-Pulido, Chiara Grande, Luigi Vezzulli, Tiziano Bandiera, Rosalia Bertorelli, and Debora Russo. 2018. 'Antimicrobial, Antioxidant, and Waterproof RTV Silicone-Ethyl Cellulose Composites Containing Clove Essential Oil', *Carbohydrate Polymers*.
- Höhne, Günther, Wolfgang F Hemminger, and H-J Flammersheim. 2013. *Differential scanning calorimetry* (Springer Science & Business Media).
- Hu, S-G, C-H Jou, and M-C Yang. 2003. 'Antibacterial and biodegradable properties of polyhydroxyalkanoates grafted with chitosan and chitoooligosaccharides via ozone treatment', *Journal of Applied Polymer Science*, 88: 2797-803.
- Huang, DF, J-G Xu, J-X Liu, H Zhang, and QP Hu. 2014. 'Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria', *Microbiology*, 83: 357-65.
- Iggui, Kahina, Nicolas Le Moigne, Mustapha Kaci, Simon Cambe, Jean-Régis Degorce-Dumas, and Anne Bergeret. 2015a. 'A biodegradation study of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/organoclay nanocomposites in various environmental conditions', *Polymer Degradation and Stability*, 119: 77-86.
- . 2015b. 'A biodegradation study of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/organoclay nanocomposites in various environmental conditions', *Polymer Degradation and Stability*, 119: 77-86.
- Jambeck, Jenna R, Roland Geyer, Chris Wilcox, Theodore R Siegler, Miriam Perryman, Anthony Andrady, Ramani Narayan, and Kara Lavender Law. 2015. 'Plastic waste inputs from land into the ocean', *Science*, 347: 768-71.
- Jayasekara, Ranjith, Ian Harding, Ian Bowater, and Greg Lonergan. 2005. 'Biodegradability of a selected range of polymers and polymer blends and standard methods for assessment of biodegradation', *Journal of Polymers and the Environment*, 13: 231-51.
- Joven, Ronald, Angela Garcia, Andrea Arias, and Jorge Medina. 2015. 'Development of an active thermoplastic film with oxygen scavengers made of activated carbon and sodium erythorbate', *Packaging Technology and Science*, 28: 113-21.
- Ju, Jian, Xiaomiao Xu, Yunfei Xie, Yahui Guo, Yuliang Cheng, He Qian, and Weirong Yao. 2018. 'Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods', *Food chemistry*, 240: 850-55.
- Kai, Dan, Hui Moon Chong, Li Ping Chow, Lu Jiang, Qianyu Lin, Kangyi Zhang, Huijie Zhang, Zheng Zhang, and Xian Jun Loh. 2018. 'Strong and biocompatible lignin/poly (3-hydroxybutyrate) composite nanofibers', *Composites Science and Technology*, 158: 26-33.
- Kalaivani, R, and V Sukumaran. 2013. 'Isolation and identification of new strains to enhance the production of biopolymers from marine sample in Karankura, Tamil Nadu', *Eur J Exp Biol*, 3: 56-64.
- Kaskatepe, Banu, Merve Eylul Kiyimaci, Serap Suzuk, Sinem Aslan Erdem, Salih Cesur, and Sulhiye Yildiz. 2016. 'Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem

- resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates', *Industrial Crops and Products*, 81: 191-94.
- Kennedy, Ann C, and Virginia L Gewin. 1997. 'Soil microbial diversity: present and future considerations', *Soil Science*, 162: 607-17.
- Khaleque, MA, CA Keya, KN Hasan, MM Hoque, Y Inatsu, and ML Bari. 2016. 'Use of cloves and cinnamon essential oil to inactivate *Listeria monocytogenes* in ground beef at freezing and refrigeration temperatures', *LWT-Food Science and Technology*, 74: 219-23.
- Khanna, Shilpi, and Ashok K Srivastava. 2005. 'Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates', *Process Biochemistry*, 40: 607-19.
- Knoll, Michael, Thomas M Hamm, Florian Wagner, Virginia Martinez, and Jürgen Pleiss. 2009. 'The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases', *BMC bioinformatics*, 10: 89.
- Kobayashi, Teruyuki, Keiichi Uchino, Tomoko Abe, Yuya Yamazaki, and Terumi Saito. 2005. 'Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16', *Journal of bacteriology*, 187: 5129-35.
- Kumagai, Yoshiharu, Youko Kanesawa, and Yoshiharu Doi. 1992. 'Enzymatic degradation of microbial poly (3-hydroxybutyrate) films', *Die Makromolekulare Chemie*, 193: 53-57.
- Kyrikou, Ioanna, and Demetres Briassoulis. 2007. 'Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review', *Journal of Polymers and the Environment*, 15: 125-50.
- Lauber, Christian L, Michael S Strickland, Mark A Bradford, and Noah Fierer. 2008. 'The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types', *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2407-15.
- Lee, Sang Yup. 1996. 'Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria', *Trends in Biotechnology*, 14: 431-38.
- Lee, Sang Yup, Jong-il Choi, and Heng Ho Wong. 1999. 'Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review', *Int J Biol Macromol*, 25: 31-36.
- Leja, Katarzyna, and Grażyna Lewandowicz. 2010. 'Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers-a Review', *Polish Journal of Environmental Studies*, 19.
- Lenz, Robert W, and Robert H Marchessault. 2005. 'Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology', *Biomacromolecules*, 6: 1-8.
- Liao, Jung-Chun, Jeng-Shyan Deng, Chuan-Sung Chiu, Wen-Chi Hou, Shyh-Shyun Huang, Pei-Hsin Shie, and Guang-Jhong Huang. 2012. 'Anti-inflammatory activities of *Cinnamomum cassia* constituents in vitro and in vivo', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Lucas, Nathalie, Christophe Bienaime, Christian Belloy, Michèle Queneudec, Françoise Silvestre, and José-Edmundo Nava-Saucedo. 2008. 'Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques—A review', *Chemosphere*, 73: 429-42.
- Machado, Gilmara de Oliveira. 2004. 'Preparação e caracterização de eletrólitos sólidos poliméricos a partir dos derivados de celulose-hidroxietilcelulose e hidroxipropilcelulose', Universidade de São Paulo.
- Machado, Miriam LC, Nilson C Pereira, Leila F de Miranda, Mauro C Terence, and José GC Pradella. 2010. 'Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira', *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 20.
- Maciel, MV, SM Morais, CML Bevilaqua, and SSA Amóra. 2010. 'Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses Plant extracts used in the control of dipteran vectors of zoonosis', *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12: 105-12.
- Maisanaba, S., M. Llana-Ruiz-Cabello, D. Gutiérrez-Praena, S. Pichardo, M. Puerto, A. I. Prieto, A. Jos, and A. M. Cameán. 2017. 'New advances in active packaging



- incorporated with essential oils or their main components for food preservation', *Food Reviews International*, 33: 447-515.
- Manecka, GM, J Labrash, O Rouxel, P Dubot, J Lalevée, S Abbad Andaloussi, E Renard, V Langlois, and DL Versace. 2014. 'Green photoinduced modification of natural poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) surface for antibacterial applications', *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2: 996-1006.
- Marchese, Anna, Ramona Barbieri, Erika Coppo, Ilkay Erdogan Orhan, Maria Daglia, Seyed Fazel Nabavi, Morteza Izadi, Mohammad Abdollahi, Seyed Mohammad Nabavi, and Marjan Ajami. 2017. 'Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint', *Critical reviews in microbiology*, 43: 668-89.
- Marsac, Patrick J, Alfred CF Rumondor, David E Nivens, Umesh S Kestur, Lia Stanciu, and Lynne S Taylor. 2010. 'Effect of temperature and moisture on the miscibility of amorphous dispersions of felodipine and poly (vinyl pyrrolidone)', *Journal of pharmaceutical sciences*, 99: 169-85.
- Matson, Pamela A, William J Parton, AG Power, and MJ Swift. 1997. 'Agricultural intensification and ecosystem properties', *Science*, 277: 504-09.
- Matthies, Carola, Hans-Peter Erhard, and Harold L Drake. 1997. 'Effects of pH on the comparative culturability of fungi and bacteria from acidic and less acidic forest soils', *Journal of Basic Microbiology*, 37: 335-43.
- Mattoso, Luiz HC, Osvaldo N Oliveira, Roberto M Faria, Sanjeev K Manohar, Arthur J Epstein, and Alan G Macdiarmid. 1994. 'Synthesis of polyaniline/polytoluidine block copolymer via the pernigraniline oxidation state', *Polymer International*, 35: 89-93.
- Mead, Paul S, Laurence Slutsker, Vance Dietz, Linda F McCaig, Joseph S Bresee, Craig Shapiro, Patricia M Griffin, and Robert V Tauxe. 1999. 'Food-related illness and death in the United States', *Emerging infectious diseases*, 5: 607.
- Mille-Lindblom, Cecilia, Helmut Fischer, and Lars J. Tranvik. 2006. 'Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria', *Oikos*, 113: 233-42.
- Mills, Andrew. 2005. 'Oxygen indicators and intelligent inks for packaging food', *Chemical Society Reviews*, 34: 1003-11.
- Mishra, Raghvendra Kumar, Sung Kyu Ha, Kartikey Verma, and Santosh K. Tiwari. 2018. 'Recent progress in selected bio-nanomaterials and their engineering applications: An overview', *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*.
- Mottin, Artur Caron, Eliane Ayres, Rodrigo Lambert Oréfice, and Jairo José Drummond Câmara. 2016. 'What changes in poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) when processed as electrospun nanofibers or thermo-compression molded film?', *Materials Research*, 19: 57-66.
- Nairetti, D, M Mironescu, and O Tita. 2014. 'Antimicrobial activity of active biodegradable starch films on pathogenic microorganisms', *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 19: 75.
- Narayanan, Aarthi, and Karna Venkata Ramana. 2013. 'Synergized antimicrobial activity of eugenol incorporated polyhydroxybutyrate films against food spoilage microorganisms in conjunction with pediocin', *Applied biochemistry and biotechnology*, 170: 1379-88.
- NCCLS. 2012. 'Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eleventh Edition. '.
- Nishida, Haruo, and Yutaka Tokiwa. 1993. 'Effects of higher-order structure of poly (3-hydroxybutyrate) on its biodegradation. II. Effects of crystal structure on microbial degradation', *Journal of environmental polymer degradation*, 1: 65-80.
- Oliveira, Wylly Araújo de, Fillipe de Oliveira Pereira, Giliara Carol Diniz Gomes de Luna, Igara Oliveira Lima, Paulo Alves Wanderley, Rita Baltazar de Lima, and Edeltrudes de Oliveira Lima. 2011. 'Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*', *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 433-41.

- Ortiz, Cristian Matías, Pablo Rodrigo Salgado, Alain Dufresne, and Adriana Noemí Mauri. 2018. 'Microfibrillated cellulose addition improved the physicochemical and bioactive properties of biodegradable films based on soy protein and clove essential oil', *Food Hydrocolloids*.
- Ostatek-Boczynski, Zofia A, and Peimaneh Lee-Steere. 2012. 'Evaluation of Mehlich 3 as a universal nutrient extractant for Australian sugarcane soils', *Communications in soil science and plant analysis*, 43: 623-30.
- Ostrosky, Elissa A, Miriam K Mizumoto, Marcos EL Lima, Telma M Kaneko, Suzana O Nishikawa, and Beatriz R Freitas. 2008. 'Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais', *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 301-07.
- Parra, DF, DS Rosa, J Rezende, P Ponce, and AB Lugao. 2011. 'Biodegradation of  $\gamma$  Irradiated Poly 3-hydroxybutyrate (PHB) Films Blended with Poly (Ethyleneglycol)', *Journal of Polymers and the Environment*, 19: 918-25.
- Pavia, Donald L, Gary M Lampman, George S Kriz, and James R Vyvyan. 2010. *Introdução à espectroscopia* (Cengage Learning).
- Perez Espitia, Paula Judith, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Jane Sélia dos Reis Coimbra, Nélio José de Andrade, Renato Souza Cruz, and Eber Antonio Alves Medeiros. 2012. 'Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 187-204.
- Piatti, Tania Maria, and Reinaldo Augusto Ferreira Rodrigues. 2005. 'Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais', *Alagoas: Editora da Universidade Federal de Alagoas*.
- Pinto, Eugenia, Luis Vale-Silva, Carlos Cavaleiro, and Lígia Salgueiro. 2009. 'Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species', *Journal of medical microbiology*, 58: 1454-62.
- Platt, David K. 2006. *Biodegradable polymers: market report* (iSmithers Rapra Publishing).
- Posada, John A, Javier M Naranjo, Jimmy A López, Juan C Higueta, and Carlos A Cardona. 2011. 'Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol', *Process Biochemistry*, 46: 310-17.
- Prasad, Priyanka, and Anita Kochhar. 2014. 'Active packaging in food industry: a review', *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8: 1-7.
- Puligundla, Pradeep, Junho Jung, and Sanghoon Ko. 2012. 'Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications', *Food Control*, 25: 328-33.
- Rahman, SM, Md Nurun Nabi, Thuy Chu Van, Kabir Suara, Mohammad Jafari, Ashley Dowell, Md Aminul Islam, Anthony J Marchese, Jessica Tryner, and Md Farhad Hossain. 2018. 'Performance and Combustion Characteristics Analysis of Multi-Cylinder CI Engine Using Essential Oil Blends', *Energies*, 11: 738.
- Ramachandran, D, RR Latha, and GR Gowri. 2013. 'Incorporation of clitoria ternatea seed extract into bioplastic sheets having induced plasticity and their antimicrobial activity against multi-drug resistant clinical pathogens', *Int J Pharm Pharm Sci*, 5: 543-50.
- Ranasinghe, Priyanga, Shehani Pigeera, GA Sirimal Premakumara, Priyadarshani Galappaththy, Godwin R Constantine, and Prasad Katulanda. 2013. 'Medicinal properties of 'true'cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review', *BMC complementary and alternative medicine*, 13: 275.
- Reddy, CSK, Rashmi Ghai, and V\_C Kalia. 2003. 'Polyhydroxyalkanoates: an overview', *Bioresour Technol*, 87: 137-46.
- Rodrigues, Rafael Costa. 2005. 'Condições de cultura para a produção de poli (3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos'.
- Rooney, ML. 1995. 'Overview of active food packaging.' in, *Active food packaging* (Springer).
- Rosa, Derval dos Santos, Túlio César Rodrigues, Cristina das Graças Fassina Guedes, and Maria Regina Calil. 2003. 'Effect of thermal aging on the biodegradation of PCL, PHB-

- V, and their blends with starch in soil compost', *Journal of applied polymer science*, 89: 3539-46.
- Rosa, Derval S, Queenie Siu Hang Chui, Rubens Filho Pantano, and José Augusto M Agnelli. 2002. 'Avaliação da Biodegradação de Poli- $\beta$ -(Hidroxitirato), Poli- $\beta$ -(Hidroxitirato-co-valerato) e Poli- $\epsilon$ -(caprolactona) em Solo Compostado', *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 12.
- Ryan, Peter G, Charles J Moore, Jan A van Franeker, and Coleen L Moloney. 2009. 'Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364: 1999-2012.
- Sadekuzzaman, Mohammad, Md Furkanur Rahaman Mizan, Hyung-Suk Kim, Sungdae Yang, and Sang-Do Ha. 2018. 'Activity of thyme and tea tree essential oils against selected foodborne pathogens in biofilms on abiotic surfaces', *LWT-Food Science and Technology*, 89: 134-39.
- Sang, B-I, K Hori, Y Tanji, and H Unno. 2002. 'Fungal contribution to in situ biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film in soil', *Applied microbiology and biotechnology*, 58: 241-47.
- Sanla-Ead, Nutch, Anuvat Jangchud, Vane Chonhenchob, and Panuwat Suppakul. 2012. 'Antimicrobial Activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films', *Packaging Technology and Science*, 25: 7-17.
- Savenkova, L, Z Gerberga, V Nikolaeva, A Dzene, I Bibers, and M Kalnin. 2000. 'Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films', *Process Biochemistry*, 35: 573-79.
- Schlöter, M, O Dilly, and JC Munch. 2003. 'Indicators for evaluating soil quality', *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98: 255-62.
- Shah, Aamer Ali, Satoshi Kato, Noboru Shintani, Numbi Ramudu Kamini, and Toshiaki Nakajima-Kambe. 2014. 'Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic copolyesters', *Applied microbiology and biotechnology*, 98: 3437-47.
- Simic, A, A Rančić, MD Sokovic, M Ristic, S Grujic-Jovanovic, J Vukojevic, and PD Marin. 2008. 'Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. and *Carum carvi*. and their antimicrobial activities', *Pharmaceutical Biology*, 46: 437-41.
- Siracusa, Valentina, Pietro Rocculi, Santina Romani, and Marco Dalla Rosa. 2008. 'Biodegradable polymers for food packaging: a review', *Trends in Food Science & Technology*, 19: 634-43.
- Skoog, DA, and JJ Leary. 1992. "Principles of Instrumental Analysis." In.: Saunders: Fort Worth.
- Song, JH, RJ Murphy, R Narayan, and GBH Davies. 2009. 'Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364: 2127-39.
- Souza, André Marcelo de, and Ronei Jesus Poppi. 2012. 'Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I', *Química nova*.
- Spier, Vivian Cristina. 2005. 'Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copolíesteres biodegradáveis'.
- Squio, Cláudia Regina. 2003. 'Estratégias de alimentação e utilização de suplementos nutricionais na produção de poli (3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato) por *Ralstonia eutropha*'.
- Squio, Cláudia Regina, and GMF de Arago. 2004. 'Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli (3-hidroxitirato) e poli (3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato) por bactérias', *Química nova*, 27: 615-22.
- Steinbüchel, Alexander. 1991. 'Polyhydroxyalkanoic acids.' in, *Biomaterials* (Springer).

- . 2001. 'Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example', *Macromolecular bioscience*, 1: 1-24.
- Stevenson, Bryan A, David WF Hunter, and Philippa L Rhodes. 2014. 'Temporal and seasonal change in microbial community structure of an undisturbed, disturbed, and carbon-amended pasture soil', *Soil Biology and Biochemistry*, 75: 175-85.
- Subha, Ganguly. 2014. 'Role of soil microfauna and microflora in agriculture', *International Journal of Agricultural Sciences*, 10: 477-78.
- Tas, C Erdinc, Saman Hendessi, Mustafa Baysal, Serkan Unal, Fevzi C Cebeci, Yusuf Z Menciloglu, and Hayriye Unal. 2017. 'Halloysite nanotubes/polyethylene nanocomposites for active food packaging materials with ethylene scavenging and gas barrier properties', *Food and Bioprocess Technology*, 10: 789-98.
- Terry, Leon A, Thomas Ilkenhans, Stephen Poulston, Liz Rowsell, and Andrew WJ Smith. 2007. 'Development of new palladium-promoted ethylene scavenger', *Postharvest Biology and Technology*, 45: 214-20.
- Thakur, Sourbh, Jyoti Chaudhary, Bhawna Sharma, Ankit Verma, Sigita Tamulevicius, and Vijay Kumar Thakur. 2018. 'Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges', *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 13: 68-75.
- Thompson, Richard C, Charles J Moore, Frederick S Vom Saal, and Shanna H Swan. 2009. 'Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364: 2153-66.
- Thompson, Richard C, Shanna H Swan, Charles J Moore, and Frederick S Vom Saal. 2009. "Our plastic age." In.: The Royal Society.
- Tokiwa, Yutaka, and Buenaventurada P Calabia. 2004. 'Review degradation of microbial polyesters', *Biotechnology letters*, 26: 1181-89.
- Tokiwa, Yutaka, Buenaventurada Calabia, Charles Ugwu, and Seiichi Aiba. 2009. 'Biodegradability of plastics', *International journal of molecular sciences*, 10: 3722-42.
- Torres-Tello, Erika V, Jorge R Robledo-Ortíz, Yolanda González-García, Aida A Pérez-Fonseca, Carlos F Jasso-Gastinel, and Eduardo Mendizábal. 2017. 'Effect of agave fiber content in the thermal and mechanical properties of green composites based on polyhydroxybutyrate or poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)', *Industrial Crops and Products*, 99: 117-25.
- Tsuji, Hideto, and Kaori Suzuyoshi. 2002. 'Environmental degradation of biodegradable polyesters 1. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone), poly [(R)-3-hydroxybutyrate], and poly (L-lactide) films in controlled static seawater', *Polymer Degradation and Stability*, 75: 347-55.
- Urtuvia, Viviana, Pamela Villegas, Myriam González, and Michael Seeger. 2014. 'Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates', *Int J Biol Macromol*, 70: 208-13.
- Véronique, COMA. 2008. 'Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products', *Meat Science*, 78: 90-103.
- Vijayakumar, BS, and AVL Narasimham. 1995. 'Microbial Ecology of Groundnut Soil in Anantpur District', *JOURNAL-MAHARASHTRA AGRICULTURAL UNIVERSITIES*, 20: 339-40.
- Vinhas, Glória M, Yêda MB de Almeida, MAG de A. Lima, and Livia Almeida Santos. 2007. 'Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano', *Química nova*, 30: 1584.
- Wellen, Renate MR, Marcelo S Rabello, Guilhermino JM Fachine, and Eduardo L Canedo. 2013. 'The melting behaviour of poly (3-hydroxybutyrate) by DSC. Reproducibility study', *Polymer Testing*, 32: 215-20.
- Wendlandt, K-D, M Jechorek, J Helm, and U Stottmeister. 1998. 'Production of PHB with a high molecular mass from methane', *Polymer Degradation and Stability*, 59: 191-94.

- Wu, Chin-San. 2011. 'Performance and biodegradability of a maleated polyester bioplastic/recycled sugarcane bagasse system', *Journal of applied polymer science*, 121: 427-35.
- Xavier, Janifer Raj, Sudalaimuthu Thangaraj Babusha, Johnsy George, and Karna Venkata Ramana. 2015. 'Material properties and antimicrobial activity of polyhydroxybutyrate (PHB) films incorporated with vanillin', *Applied biochemistry and biotechnology*, 176: 1498-510.
- Xu, J, F Zhou, B-P Ji, R-S Pei, and N Xu. 2008. 'The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli', *Lett Appl Microbiol*, 47: 174-79.
- Yin, Y J, K D Yao, G X Cheng, and J B Ma. 1999. 'Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin', *Polymer international*, 48: 429-32.
- Yu, J. 2007. 'Microbial production of bioplastics from renewable resources', *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*: 585-610.
- Zhang, Qian, Junjun Wu, Fan Yang, Yao Lei, Quanfa Zhang, and Xiaoli Cheng. 2016. 'Alterations in soil microbial community composition and biomass following agricultural land use change', *Scientific reports*, 6: 36587.
- Zhao, Jian-Hao, Xiao-Qing Wang, Jun Zeng, Guang Yang, Feng-Hui Shi, and Qing Yan. 2005. 'Biodegradation of poly (butylene succinate) in compost', *Journal of applied polymer science*, 97: 2273-78.
- Zortéa, Manoela Estefânea Boff. 2012. 'Estratégias de cultivo utilizando resíduos das indústrias processadoras de alimentos e óleo de soja para produção de Poli (3-Hidroxi-butirato)'.

## CAPÍTULO I

Artigo publicado em *Orbital – The Electronic Journal of Chemistry*, v. 10, n. 1, 2018.

A deterioração de alimentos por ação microbiana é uma das principais causas de perda da qualidade e segurança de alimentos. Neste contexto, o emprego de óleos essenciais, na produção de filmes antimicrobianos para alimentos, mostra-se uma tecnologia interessante.

O capítulo I refere-se a incorporação dos OEs de melaleuca, citronela e canela em matriz polimérica de PHB, avaliação de sua atividade antimicrobiana e avaliação da incorporação do OE através da técnica de FTIR.

Os OEs de melaleuca e citronela não apresentaram atividade antimicrobiana em nenhuma concentração avaliada. Pela técnica de FTIR observou-se que com o aumento de OE a intensidade dos picos, característicos do OE, aumentaram. No entanto, os picos característicos de melaleuca e citronela se sobrepuseram aos de PHB.

Full Paper

## Antimicrobial Analysis and Characterization of P(3HB) Films Containing Essential Oils

Chaiane Regina Rech<sup>a\*</sup>, Silvia Maria Martelli<sup>b</sup>, Bárbara Ellen Bagnara e Silva<sup>a</sup>, Kelly Cristina da Silva Brabes<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Federal University of Grande Dourados, Student of the Post-Graduate Program in Environmental Science and Technology, Faculty of Exact Sciences and Technology, CP 533, Dourados, MS, Brazil.

<sup>b</sup>Federal University of Grande Dourados, Faculty of Engineering, CP 533, Dourados, MS, Brazil.

Article history: Received: 02 June 2017; revised: 16 October 2017; accepted: 27 October 2017. Available online: 21 January

**Abstract:** Several studies have focused on the development of new materials for food packaging with the incorporation of antimicrobials such as essential oils. Thus, the present work aimed to develop biodegradable and antimicrobial films based on PHB incorporated with essential oils, named: melaleuca, cinnamon and citronella and also to characterize these films through the Fourier Transform Infrared Technique (FTIR). The films, containing 10, 20 and 30% (w/w) of essential oils, were microbiologically tested by agar-diffusion method against six species. The films containing melaleuca and citronella did not inhibit the microbial growth of any microorganisms tested. Unlike the films containing 20 and 30% of cinnamon that inhibited the growth of almost all microorganisms except *Salmonella* sp. The FTIR spectra of melaleuca and citronella overlap with those of PHB and it was not possible to observe the characteristic bands. The cinnamon spectrum shown characteristic bands of cinnamaldehyde, the main component of this oil. Through the FTIR technique the incorporation of the cinnamon oil into the polymer matrix can be verified. Microbiological analyzes showed that PHB film with 20 and 30% of cinnamon presented better antimicrobial activity.

**Keywords:** antimicrobial activity; essential oils; FTIR; PHB

### 1. INTRODUCTION

The polyhydroxyalkanoates (PHA's) are a class of aliphatic polymers widely studied once it is renewable, biodegradable [1] and synthesized by many microorganisms [2]. In addition, they have similar properties to polypropylene and polyethylene [3, 4].

Among the PHA's, the most widespread and currently studied, is polyhydroxybutyrate (PHB), synthesized within many Gram-positive and Gram-negative bacteria as a carbon and energy reserve [5]. PHB is a linear polyester of D(IGGUI et al.)-3-hydroxybutyric acid, whose molecular weight differs from one organism to another, the growth conditions and the extraction method [6]. In addition, PHB is a renewable, biocompatible and linear thermoplastic [7] with low oxygen and water permeability and attractive barrier properties compared [to other polyesters [8, 9]. The degree of crystallinity of PHB is in the range of 55-80%, with glass transition

temperature (T<sub>g</sub>) of approximately 5 °C, melting temperature (T<sub>m</sub>) at 175 °C and decrease of molar mass at temperature above 170 °C [10].

However, PHB is a highly crystalline and brittle polymer [11, 12] and its high cost of production prevents it from competing with conventional polymers [12]. For these reasons, the combination of PHB with other polymers (blends) or composites (with fibers) has been studied in order to improve its physical properties and decrease the cost of production.

Studies have also been devoted to the incorporation of natural antimicrobial agents into food packaging materials, due to increased consumer demands for natural foods, improved food safety, minimally processed products, "ready-to-eat" foods and longer shelf life [13]. Defined as a system incorporated in the packaging that releases or absorbs external or non-food or environmental substances, active packaging is intended to extend shelf life,

\*Corresponding author. E-mail: [chaiane.rech@hotmail.com](mailto:chaiane.rech@hotmail.com)

maintain or improve the condition of the packaged food [14]. Among these agents, the essential oils present a future promissory, however the studies of incorporation of essential oils in PHB films and evaluation of their antimicrobial action are scarce. The mode of action that causes the microbial inhibition by essential oils and their chemical compounds involves several mechanisms that depend on the components present in the essential oil.

Cinnamon is obtained from the inner bark of trees of the genus *Cinnamomum* of the family Lauraceae and is a plant widely used by different cultures around the world. Among the almost 300 varieties that exist the most prominent are the true cinnamon or cinnamon from India (*Cinnamomum zeylanicum*) and the fake cinnamon or cinnamon from China (*Cinnamomum cassia*) [15]. The main component of bark and cinnamon leaf oil is cinnamaldehyde, which exhibits antimicrobial activity against a wide range of microorganisms.

The essential oil of the leaves of *Melaleuca alternifolia* is rich in terpinen-4-ol (29.4 - 44.9%) effective against bacteria, fungi and viruses. This oil has stood out as the main antimicrobial or as a natural preservative in pharmaceuticals and cosmetics. In addition, it may be bactericidal or bacteriostatic, when used in low concentrations [16].

*Cymbopogon winterianus*, commonly known as citronella, is a plant of the family Poaceae, grown in India and Brazil. It presents antibacterial and antifungal activity, mainly, against *Candida albicans* [17].

Considering the above mentioned, the main objective of this study was to evaluate the incorporation of the essential oils of melaleuca, cinnamon and citronella into PHB films using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), which is used in the structural investigation of the polymer matrices and can detect small changes between amorphous and crystalline regions [18]. Moreover, the evaluation of the antimicrobial activity of the films using six pathogenic microorganisms important for the food industry was carried out.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### Materials

PHB was supplied by Copersucar (Cooperative of Sugar, Sugar and Alcohol Producers of the State of São Paulo) with molecular weight (Mw) of

approximately 221,000 g mol<sup>-1</sup> and 99% purity.

Essential oils with 99% purity were obtained from a local company (Ferquima). According to manufacturer's specifications, *Cinnamomum cassia* oil is composed of aldehyde (81%), coumarin (3%), benzaldehyde (3%), cinnamic alcohol (3%) and styrene (3%). While *Cymbopogon winterianus* presents 38% citronellal, 12% citronellol and 22% geraniol. *Melaleuca alternifolia* is composed of terpinene-4-ol (42%), gamma terpinene (23%), alpha terpinene (11%) and cineol (2%).

All reagents used were from analytical grade.

### Film Preparation

The PHB films were prepared by *casting*. The PHB polymer was dissolved in chloroform (Sigma-Aldrich) 5% (w/v) and left under stirring at medium speed on a magnetic stirrer until complete dissolution (about 24 h). Then this solution was filtered, and then the essential oils were added in different concentrations (10%, 20% and 30% w/w in relation to PHB), also pure PHB was elaborated as the control sample. After that, the solution was mixed for 15 minutes. After this period, the solutions were placed in Petri dishes and incubated under a saturated atmosphere of chloroform for 3 days, until the formation of a thin film.

### Determination of antimicrobial activity of films containing essential oils

The technique used to determine the antimicrobial activity of PHB films with melaleuca, cinnamon and citronella was based on the NCCLS [19], with adaptations. The films, in all the elaborated concentrations, were cut in circles approximately 1 cm in diameter and tested, microbiologically, by means of the disk-diffusion method in agar. The action of the films was evaluated against the following species: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Salmonella* sp. ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aspergillus niger* ATCC 6275 and *Candida albicans* ATCC 90028.

The film disks were placed on the Petri dish containing Mueller Hinton agar after seeding the bacterial inoculum adjusted on the McFarland 0.5 scale. The plates were then incubated in a bacteriological oven for 24 hours at 35 °C.



### Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The absorption spectra in the infrared (PIATTI E RODRIGUES) region were obtained in equipment of the Jasco brand, model FT-IR 4100 with ATR Pro 450-S accessory (Total Attenuated Reflectance) in the range of 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$ , with resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . Data acquisition was performed using Spectra Manager software.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### Antimicrobial activity of PHB films incorporated with essential oils

The antimicrobial activity of films containing the essential oils of melaleuca, cinnamon and citronella are presented in Table 1. The films containing the essential oils of melaleuca and citronella did not present antimicrobial activity in relation to any of the microorganisms evaluated. Unlike cinnamon oil that did not show antimicrobial activity only against *Salmonella* sp., and at 20% concentration was not effective for *Staphylococcus*

*aureus* and *Aspergillus niger*.

Due to the incorporation in the PHB film, the concentration of the essential oil components in the films can decrease and, consequently, minimize the antimicrobial efficacy of the films tested by the agar diffusion technique [20-22]. In this test, non-halo formation of inhibition characterizes that the film has no antimicrobial effect [23]. In this way, Sanla-Ead et al. [24] points out that it is more reliable to use vapor diffusion to evaluate the antimicrobial effect of lipophilic films.

The essential oils are part of the film structure and interacts with the polymer and the plasticizer, and thus the diffusion of the antimicrobial compounds into the product can be reduced [25]. The release of antimicrobial agents from edible films, for example, depends on many factors, such as electrostatic interactions between the antimicrobial agent and the polymer chains, osmosis, structural changes induced by the presence of the antimicrobial, and environmental conditions [26].

**Table 1.** Antimicrobial activity of PHB films incorporated with essential oils.

Microorganisms	Average size of inhibition halos (AURIEMMA et al.)									
	Melaleuca			Cinnamon			Citronella			
	10%	20%	30%	10%	20%	30%	10%	20%	30%	
<i>Salmonella</i> sp. ATCC 13076	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	2.00±0.00	2.00±0.00	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19093	-	-	-	-	-	6.67±2.88	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	1.00±0.00	3.00±1.40	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	-	-	-	-	-	3.00±0.00	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	-	-	-	-	3.00±0.00	10.00±0.00	-	-	-	-

### Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

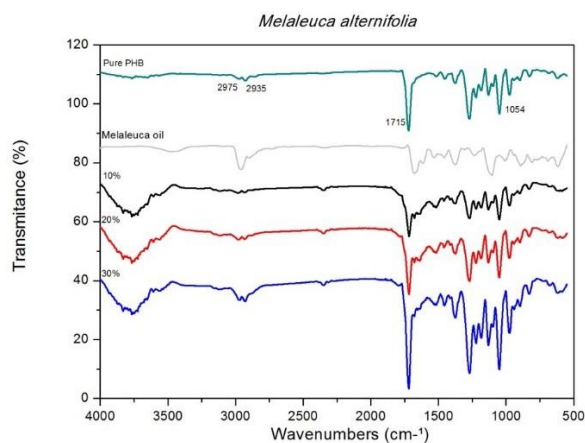
FTIR spectroscopy has been employed to examine how chemical interactions between PHB and essential oils, seen as two or more substances, are combined physically and how chemical interactions are reflected by characteristic changes in spectra bands [27, 28].

Pure PHB spectra are observed to have dominant peaks in the region of 2975  $\text{cm}^{-1}$  and 2935

$\text{cm}^{-1}$  corresponding to C-H bonds, the 1054  $\text{cm}^{-1}$  peak related to C-O bonds and the 1715 band indicating the C = O bonds. These values are very close to those reported by TĂNASE et al. (2015) [29] in which the main bands found in the PHB spectrum are attributed to C-C coupling with  $\text{CH}_3$  stretch vibration, C-O-C (978  $\text{cm}^{-1}$  and 895  $\text{cm}^{-1}$ ) vibration bands, C-O-C stretching (1182  $\text{cm}^{-1}$ ), elongation CO (1227  $\text{cm}^{-1}$  and 1277  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_3$  (1379  $\text{cm}^{-1}$ ), asymmetric  $\text{CH}_3$  (1456  $\text{cm}^{-1}$ ), crystalline C=O (1720  $\text{cm}^{-1}$ ) and elongation C-

H ( $2934\text{ cm}^{-1}$  and  $2995\text{ cm}^{-1}$ ).

The incorporation of essential oils into the PHB matrix was analyzed through the ATR. The spectra of films incorporated with melaleuca are shown in Figure 1.



**Figure 1.** FTIR spectra of PHB films incorporated with melaleuca oil.

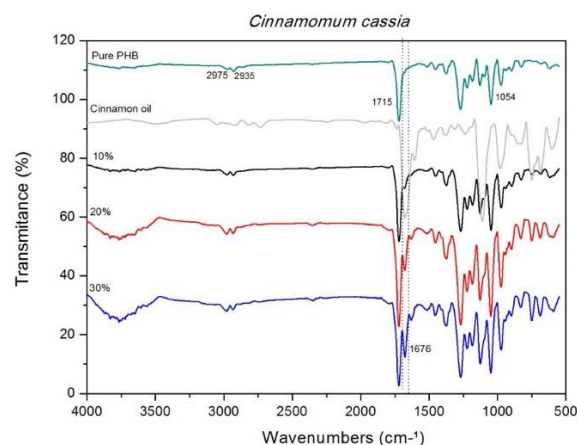
The absence of characteristic peaks of melaleuca oil may be related to the overlapping of these peaks by PHB characteristic peaks. However, it can be observed that films incorporated with melaleuca present a more intense band at  $2975$  and  $2935\text{ cm}^{-1}$ , as well as at  $1715\text{ cm}^{-1}$  as the concentration of the oil increases. This band is more intense because they appear in both melaleuca oil and PHB matrix. A similar result was found by Pires [30] when evaluating the incorporation of melaleuca in sodium alginate.

Figure 2 shows the FTIR spectrum of cinnamon PHB films. A characteristic peak for the identification of cinnamon oil incorporation in the polymer film is in the  $1676\text{ cm}^{-1}$  region and can be correlated to the C = O bonds of the cinnamaldehyde present in the cinnamon oil composition.

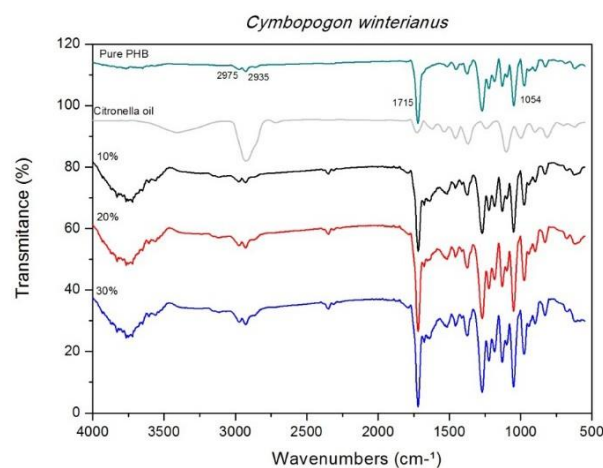
Similarly, to melaleuca oil, the spectrum of PHB/citronella films (Figure 3) did not show specific peaks for this oil, also characterized by the overlapping of peaks with PHB peaks.

However, the incorporation of essential oils caused the appearance of a new band in the spectra of the films in approximately  $2343\text{ cm}^{-1}$ . This peak is characteristic of several main components of essential oils, such as: limonene [31], main constituent of lemon oil [30], thymol, linalool, citral [32], terpinem-

4-ol, and diterpenes and sesquiterpenes, constituents of copaiba oil [30].



**Figure 2.** FTIR spectra of PHB films incorporated with cinnamon oil.



**Figure 3.** FTIR spectra of PHB films incorporated with citronella oil.

#### 4. CONCLUSION

It was possible to elaborate PHB films incorporated with essential oils of melaleuca, cinnamon and citronella. As the films incorporated with cinnamon presented antimicrobial activity against fungi and bacteria, different from the others that did not present any antimicrobial activity for the studied microorganisms.

The most visible changes in the FTIR spectra were in the films incorporated with cinnamon, whereas melaleuca and citronella the peaks of the oils overlapped those of PHB and it was not possible to observe significant changes. It is believed that in the same way the incorporation occurred, since the films

presented strong odor and characteristic smell of the incorporated oils.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Copersucar (Cooperative of Sugar, Sugar and Alcohol Producers of the State of São Paulo) for assigning the PHB.

## 6. REFERENCES AND NOTES

- [1] Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Rocha, R. C. S.; Taciro, M. K.; Pradella, J. G. C. *Quim. Nova*. **2007**, *30*, 1732. [[CrossRef](#)]
- [2] Parra, D. F.; Rosa, D. S.; Rezende, J.; Ponce, P.; Lugão, A. B. *J. Polym. Environ.* **2011**, *19*, 918. [[CrossRef](#)]
- [3] Din, M. F. M.; Ujang, Z.; Van Loosdrecht, M.; Ahmad, M. *Jurnal Teknologi*. **2008**, *48*, 1. [[CrossRef](#)]
- [4] Iggui, K.; Le Moigne, N.; Kaci, M.; Cambe, S.; Degorce-Dumas, J. R.; Bergeret, A. *Polym. Degrad. Stabil.* **2015**, *119*, 77. [[CrossRef](#)]
- [5] Grigull, V. H.; Silva, D. D.; Garcia, M. C. F.; Furlan, S. A. *Food Technol. Biotechnol.* **2008**, *46*, 223. [[CrossRef](#)]
- [6] Bugnicourt, E.; Cinelli, P.; Lazzeri, A.; Alvarez, V. *Express Polym. Lett.* **2014**, *8*, 791. [[CrossRef](#)]
- [7] Wellen, R. M. R.; Rabello, M. S.; Fechine, G. J. M.; Canedo, E. L. *Polym. Test.* **2013**, *32*, 215. [[CrossRef](#)]
- [8] Correa, J. P.; Molina, V.; Sanchez, M.; Kainz, C.; Eisenberg, P.; Massani, M. B. *Food Packag. Shelf Life* **2017**, *11*, 31. [[CrossRef](#)]
- [9] Casarin, S. A.; Agnelli, J. A. M.; Malmonge, S. M.; Rosário, F. *Polímeros* **2013**, *23*, 115. [[CrossRef](#)]
- [10] Machado, M. L. C.; Pereira, N. C.; Miranda, L. F.; Terence, M. C.; Pradella, J. G. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2010**, *20*, 65. [[CrossRef](#)]
- [11] Boyandin, A. N.; Prudnikova, S. V.; Karpov, V. A.; Ivonin, V. N.; Lanhdõ, N.; Nguyễn, T. H.; Lê, T. M. H.; Filichev, N. L.; Levin, A. L.; Filipenko, M. L.; Volova, T. G.; Gitelson, I. I. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2013**, *83*, 77. [[CrossRef](#)]
- [12] Savenkova, L.; Gercberga, Z.; Nikolaeva, V.; Dzene, A.; Bibers, I.; Kalnin, M. *Process Biochem.* **2000**, *35*, 573. [[CrossRef](#)]
- [13] Imran, H.; Revol-Junelles, A. M.; Martyn, A.; Tehrani, E. A.; Jacquot, M.; Linder, M. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 799. [[CrossRef](#)]
- [14] Ramos, M.; Valdés, A.; Mellinas, A. C.; Garrigós, M. C. *Beverages* **2015**, *1*, 248. [[CrossRef](#)]
- [15] Ranasinghe, P.; Pigera, S.; Premakumara, G. A. S.; Galappaththy, P.; Constantine G. R.; Katulanda, P. *BMC Complementary Altern. Med.* **2013**, *13*, 1. [[CrossRef](#)]
- [16] Silveira, A. P.; Garvil, M. P.; Silva, R. B.; Alvarenga, G. A. In: XVII Reunião Anual de Ciências, 2013.
- [17] Oliveira, W. A.; Pereira, F. O.; Luna, G. C. D. G.; Lima, I. O.; Wanderley, P. A.; De Lima, R. B.; Lima, E. O. *Braz. J. Microbiol.* **2011**, *42*, 433. [[CrossRef](#)]
- [18] Beltrán, M.; Garcia, J. C.; Marcilla, A. *Eur. Polym. J.* **1997**, *33*, 453. [[CrossRef](#)]
- [19] NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eleventh Edition. 2012.
- [20] Sivarooban, T.; Hettiarachchy, N. S.; Johnson, M. G. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 781. [[CrossRef](#)]
- [21] Du, W. X.; Olsen, C. W.; Bustillos, R. J. A.; McHugh, T. H.; Levin, C. E.; Friedman, M. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3082. [[CrossRef](#)]
- [22] Ponce, A. G.; Roura, S. I.; delValle, C. E.; Moreira, M. R. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *49*, 294. [[CrossRef](#)]
- [23] Rojas Graü, M. A.; Avena Bustillos, R. J.; Friedman, M.; Henika, P. R.; Martín-Belloso, O.; McHugh, T. H. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9262. [[CrossRef](#)]
- [24] Sanla-Ead, N.; Jangchud, A.; Chonhenchob, V.; Suppakul, P. *Packag. Technol. Sci.* **2012**, *25*, 7. [[CrossRef](#)]
- [25] Ruiz-Navajas, Y.; Viuda-Martos, M.; Sendra, E.; Perez- Alvarez, J. A.; Fernandez-López, J. *Food Control* **2013**, *30*, 386. [[CrossRef](#)]
- [26] Avila-Sosa, R.; Palou, E.; Munguía, M. T. J.; Nevárez- Moorillón, G. V.; Navarro, C. A. R.; Malo, A. L. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 66. [[CrossRef](#)]
- [27] Guan, Y.; Liu, X.; Zhang, Y.; Yao, K. (1998). *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *67*, 1965. [[CrossRef](#)]
- [28] Yin, Y. J.; Yao, K. D.; Cheng, G. X.; Ma, J. B. *Polym. Int.* **1999**, *48*, 429. [[CrossRef](#)]
- [29] Tănase, E. E.; Popa, M. E.; Râpă, M.; Popa, O. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2015**, *6*, 608. [[CrossRef](#)]
- [30] Pires, V. G. A. Incorporação de nanoemulsões de oleos essenciais de melaleuca, copaiba e limão em filmes de alginate de sódio para utilização como curativo. [Master's thesis.] Ilha Solteira, Brazil: Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2016. [[Link](#)]
- [31] Galvão, J. G.; Silva, V. F.; Ferreira, S. G.; França, F. R. M.; Santos, D. A.; Freitas, L. S.; Alves, P. B.; Araújo, A. S.; Cavalcanti, S. C. H.; Nunes, R. S. *Thermochim. Acta* **2015**, *608*, 14. [[CrossRef](#)]
- [32] Available from: <http://www.syntechinnovation.com/index.php/knowledge/classification-of-essential-oils-with-ft-ir-spectroscopy.html>. Access September, 2017.

## CAPÍTULO II

Artigo referente às análises de biodegradação - submetido à revista *Packaging Technology and Science*.

Apesar do papel fundamental que os plásticos convencionais representam, suas aplicações apresentam descartabilidade rápida e dificuldade de degradação no ambiente, despertando assim o interesse em substituí-los por polímeros biodegradáveis. A adição de agentes antimicrobianos pode interferir nas propriedades físicas, térmicas e mecânicas do material, bem como sua aumentar o tempo de degradação após o descarte.

Neste sentido, o capítulo II refere-se a filmes de PHB elaborados com diferentes concentrações de eugenol e expostos ao processo de biodegradação por 60 dias em solo agrícola, arenoso e de aterro sanitário, avaliando-se possíveis alterações nas propriedades desses filmes com a adição de eugenol.

Os filmes com maior concentração de eugenol foram mais ativos frente aos micro-organismos testados. A adição de eugenol não interferiu no processo de biodegradação, sendo que em solo agrícola a degradação foi maior que nos demais solos. Entretanto, a adição de eugenol diminuiu a resistência a tração e o módulo de elasticidade dos filmes devido a ação plastificante.

## **Biodegradation of polyhydroxybutyrate films incorporated with an antimicrobial agent in different soil types**

Chaiane Regina Rech<sup>a</sup>; Kelly Cristina da Silva Brabes<sup>b</sup>; Barbara Ellen Bagnara e Silva<sup>a</sup>; Paulo Rodrigo Stival Bittencourt<sup>c</sup>; Marivane Turim Koschevic<sup>a</sup>; Tayla Fernanda Serantoni da Silveira<sup>d</sup>; Marco Antonio Utrera Martines<sup>d</sup>; Thiago Caon<sup>e</sup>; Silvia Maria Martelli<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil. <sup>b</sup>Faculty of Engineering, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil.

<sup>c</sup>Faculty of Chemistry, Federal Technical University of Parana, Medianeira, PR, Brazil.

<sup>d</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

<sup>e</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

\*Corresponding author: smmartelli@gmail.com (S.M. Martelli).

Faculty of Engineering, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12 - Cidade Universitaria, 364, Zip Code 79804-970, Dourados, MS, Brazil. Tel.: +55 67 30327848.

## **ABSTRACT**

Polyhydroxybutyrate (PHB) has been considered as packaging material in many recent applications due to its high crystallinity, biodegradability, low interaction with food matrix and favorable barrier and mechanical properties. Although the incorporation of antimicrobial agents in its structure may control surface microbial contamination of foods, they can affect the film properties. In this study, eugenol-loaded PHB films were prepared using a solvent casting technique, which were subsequently exposed to a biodegradation study for 60 days in agricultural, sandy and landfill soil. Thermal analysis, X-ray diffraction, tensile tests and disk diffusion assay were performed to evaluate the physicochemical and microbiological changes. A concentration-dependent antimicrobial effect was observed. PHB films buried in agricultural soil presented a higher rate of biodegradation, which may be particularly associated with the high fungi load and higher soil-phosphorus availability. The soil acidity, phosphorus availability, moisture level and polymer crystallinity were key factors in explaining the differences in microbial growth and biodegradation rates. The addition of eugenol in PHB films enhanced the crystallinity of the polymer and reduced their mechanical properties. Overall, the incorporation of eugenol in PHB films was a successful approach to develop new active packaging for the food industry.

**Keywords:** Polyhydroxybutyrate (PHB) films; eugenol; soil biodegradation; active packaging

## 1. INTRODUCTION

Approximately 34 million tons of plastic wastes are produced annually and 93% of this material is dumped into oceans and landfills. The degradation process of petrochemical plastics is very difficult and slow, which increases CO<sub>2</sub> emissions and production of other toxic residues (THAKUR et al., 2018). For this reason, the focus of recent technologies is shifting towards the use of renewable resources for the development of eco-friendly materials. Unlike the petrochemical plastics, biodegradable polymers are more easily assimilated by the microbial metabolism, generating CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, cellular components and other non-toxic products and subproducts (ROSA et al., 2002; FRANCHETTI E MARCONATO, 2006a). The lack of fossil fuel energy sources and the raised costs of crude oil have also been other reasons to prioritize bio-based materials (MISHRA et al., 2018).

Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), which is synthesized by both Gram-positive and Gram-negative bacteria and acts as a carbon and energy reserve, has been one of these biopolymers most widespread and currently studied within this context (GRIGULL et al., 2008). It is a renewable, biocompatible and linear thermoplastic polymer (WELLEN et al., 2013). PHB is also characterized by improved gas and water barrier properties when compared to other polyesters (CASARIN et al., 2013; CORREA et al., 2017), a relevant characteristic for food packaging applications. Another advantage is that PHB may be produced on a large scale, which makes commercially viable its application in food packaging (CHEN, 2009).

The biodegradation process of this polymer may be affected by different factors such as microbial activity, polymer composition, molecular weight, surface area, crystallinity, temperature, moisture, pH, nutrient content and oxygen level (ALTAEE et al., 2016a). The soil represents an ideal ecosystem for PHB degradation in view of additional fungal biomass when compared to other environments (BELENEVA E ZHUKOVA, 2009).

Although the PHB is a biodegradable material and presents favorable mechanical properties for use in food packaging, the incorporation of active agents such as antimicrobials in its matrix can affect both biodegradation and physicochemical characteristics. Therefore, the impact of the incorporation of eugenol into PHB matrix was evaluated in this study. For the biodegradation studies, PHB films were buried in different soil types (agricultural, sandy and landfill soil) for up to 60 days.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

The PHB (MW = 221,000 g/mol; 99% purity) was obtained from PHB Industrial S.A. The eugenol (99% purity) was purchased from the Biodynamic Company. The other reagents used were of analytical grade and used as received.

### 2.2 Preparation of PHB films

The PHB films were prepared by the casting method. PHB was initially added to the chloroform (Vetec, Brazil) (5%, w/v) and stirred until complete solubilization at 60°C. This solution was filtered, partitioned, different concentrations eugenol were added and stirred for 15 min. After this period, 25 mL of the solution was placed in Petri dishes and incubated in an atmosphere saturated with chloroform for 3 days (time needed for the formation of a thin and dry film). Thus, films containing 20 and 40% w/w of

eugenol (PHBE20 and PHBE40) were obtained. Films prepared only with PHB (PHB0) were used as the control.

### 2.3 Evaluation of antimicrobial activity

The antimicrobial activity of films was evaluated by the agar disk diffusion method (NCCLS., 2012) against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Salmonella* sp. ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Aspergillus niger* ATCC 6275. For the bacterial inoculum preparation, the turbidity of the initial bacterial suspension was adjusted comparing with 0.5 McFarland standard. After seeding the bacterial inoculum, PHB films were cut into circles of approximately 6 mm diameter and placed on the Petri dish containing Mueller Hinton agar (Himedia, Mumbai, India). The plates were then maintained in a bacteriological incubator (Marconi, Brazil) for 24 h at 35°C.

### 2.4 Soil characterization and biodegradation studies

The agricultural soil was collected in an experimental farm of the Federal University of Grande Dourados (latitude 22°13'56.00"w "longitude 54°59'18.00"w). Sandy soil was collected in the Southern region of Mato Grosso do Sul state (latitude 22°11'47.00"w longitude 54°55'37.00"w) and the landfill soil was obtained from the local landfill of Dourados city. The initial moisture level of soils was corrected to 60%.

For the determination of soil moisture, 5 g of wet soil were initially weighed and left in an oven for 24 h at 105°C. After this period, a new weighing was performed. The calculation of moisture was performed through the equation:

$$U = \frac{W2-W3}{W3-W1} \times 100\% \text{ (Equation 1)}$$

Where: W1 = container weight; W2 = container and soil weight; W3 = container and dry soil weight

The pH of the soil was determined after dilution of 10 g of soil in 25 mL of deionized water or 0.01M CaCl<sub>2</sub>. The mixture was stirred for 15 min and left to fully decant for the pH measurement. Phosphorous and potassium were determined by using the traditional Mehlich 3 method (OSTATEK-BOCZYNSKI E LEE-STEERE, 2012).

For the biodegradation studies, PHB films were cut (1 x 10 cm) and added into wooden boxes (1 x 5 m) containing the different soil types. These films were buried 15 cm from the surface during 60 days (latitude 22°13'2.00"w and longitude 54°49'14.00"w). The boxes were arranged in an open environment covered by a shade screen. During this period, soil pH and precipitation were monitored. Samples were removed after 10, 25, 40 and 60 days, washed with distilled water and dried at room temperature. Microbiological, physicochemical and mechanical properties of PHB films were investigated.

### 2.5 Microbial counting

The *pour plate* technique was used to determine the number of microbes/mL in soil samples close to the films. Soil samples were taken before starting the biodegradation study and after 25 and 60 days. The media used for bacteria and fungi counting were plate count agar (PCA) (Himedia, Mumbai, India)(FARIA E MARTINS-FRANCHETTI, 2010) and potato dextrose agar (PDA) (Himedia, Mumbai, India), respectively. The soil sample (1 g) was diluted in saline (NaCl 0.9% w/v, Synth, Brazil), serially diluted and then added into Petri dishes. The plates were incubated for 48 h at



36°C for bacteria and for 72 h at 30°C for the fungal. The colony forming unit (CFU) for each sample was measured ( $\log_{10}$  CFU/mL).

### 2.6 Thermal analysis

Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric (TGA) analyses were performed by using the Perkin Elmer STA 6000 equipment (PerkinElmer, Buckinghamshire, UK). PHB film samples ( $\pm 6$  mg) were heated from 50 to 350°C at a heating rate of 10°C min<sup>-1</sup> under a nitrogen atmosphere (flow = 20 mL/min). The degree of crystallinity ( $X_c\%$ ) was calculated using the following equation:

$$X_c \% = (\Delta H_m \times \Delta H_0) / 100 \text{ (Equation 2)}$$

Where  $\Delta H_m$  is the enthalpy of fusion and  $\Delta H_0$  represents the melting enthalpy of the PHB (100% crystalline) (TORRES-TELLO et al., 2017; KAI et al., 2018).

### 2.7 X-Ray Diffraction (XRD)

Diffraction patterns were obtained using a  $\theta$ - $\theta$  D2 Phaser X-ray diffractometer (Bruker, Germany) with vertical goniometer of 282.2 mm in diameter and scintillator detector. The measurements were performed in the range of  $2\theta$  from 5 to 50°, using Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ), a tube current of 10 mA, a voltage of 30 kV, an integration time of 10 s and resolution of 0.01 degrees (acrylic holder). The degree of crystallinity was determined through the relationship between crystalline zones and amorphous zones.

### 2.8 Determination of mechanical properties

The mechanical properties were evaluated in a TA-HD Plus Texture Analyser (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK), which operated according to the ASTM method D882-12. For the modulus of elasticity determination, the initial grip separation and the crosshead speed were set at 250 mm and 25 mm/min, respectively. At least ten samples presenting an area of 100 × 10 mm were selected for the measurements.

### 2.9 Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used to compare different treatments. All statistical analysis was performed using the software Statistica<sup>®</sup> 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), with a significance level of  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS

### 3.1 Antimicrobial activity of PHB/eugenol films

Films containing 20% of eugenol (PHB20) presented lower antimicrobial activity than those films prepared with 40% of eugenol (PHB40), demonstrating a concentration-dependent effect (Table 1). PHB20 showed antimicrobial activity only against *Salmonella* sp. PHB40, in turn, was active against *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Aspergillus niger*. Films containing higher oil concentration presented a higher inhibition halo for the *Aspergillus niger*, followed by *Salmonella* sp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Bacteria showed to be less sensible than fungi, which may be associated with the antibacterial action mechanism of this agent. The clove oil interacts with the cell wall and membranes, causing loss of intracellular material and bacterial death (XU et al., 2008). Once the cell wall of fungi and bacteria present a different chemical composition, differences in terms of sensitivity are justifiable. In other study performed by SANLA-EAD et al. (2012) with cellulose films containing eugenol, a moderate inhibition for *E. coli* and *S. aureus* and slight inhibition against *Pseudomonas aeruginosa* was found.

### 3.2 Biodegradation study

When compared to other biodegradable polymers, an advantage of PHB is that its degradation occurs in both aerobic and anaerobic conditions (BITTMANN et al., 2013), which generates a rapid degradation rate and thus reduces the environmental impact.

During the biodegradation study, the environment temperature changed from 23 to 35°C (Figure 1). Precipitation was observed on day 5, 6, 15, 16, 28, 33, 35 and 58. The precipitation level was higher on the twenty-eighth day.

Factors such as soil temperature, nutrients, pH, oxygen and salinity affect the survival and activity of microorganisms and should be monitored. The agricultural soil temperature ranged from 18 to 37 °C. In the landfill, the soil temperature changed from 18 to 41°C. Finally, in the sandy soil, the temperature ranged from 19 to 34 °C. These temperatures are very close to optimal temperatures for the growing of mesophilic bacteria (25-40 °C) and fungi (22-30 °C). Soil properties such as pH, humidity, phosphorus and potassium content also were monitored during the biodegradation study (Table 2).

The PHB films buried in the agricultural soil presented a faster degradation rate than the other soil types (Figure 2). The number of microorganisms in soils was expressed in log<sub>10</sub> CFU/mL (Figure 3). In the landfill soil, the initial bacteria and fungi populations were 8.5 and 8.0 log<sub>10</sub> CFU/mL, respectively. The number of microorganisms reduced over time during the biodegradation study possibly due to the lower amount of available organic matter. In the agricultural soil, the bacterial growth reduced for all evaluated time periods whereas the fungi population presented a reduction and increase after 25 and 60 days, respectively. Intensive soil management can eliminate important species of bacteria and fungi (MATSON et al., 1997). The sandy soil, in turn, presented a lower initial microbial population than the other soils probably due to its lower ability to retain nutrients. Curiously, the bacterial population increased in the day 25th, presenting a reduction in the final step of the biodegradation study. An opposite effect was observed for the fungi population.

### 3.3 Thermal properties of PHB/eugenol films

PHB is brittle in nature and partially crystalline material, presenting a glass transition temperature ( $T_g$ ) and melting temperature ( $T_m$ ) of 5 and 175 °C, respectively. A reduction of molar mass is observed at temperatures above 170 °C (MACHADO et al., 2010). In the agricultural soil, PHB films presented an increased melting temperature (Table 3), suggesting greater thermal stability than in the other soils. A rearrangement in the polymer matrix could be observed in this solid type. In TGA analysis, two stages of thermal degradation for PHB films before starting the biodegradation studies were observed (Figures 4 and 5). A degradation range between 140 and 300° C was found for PHB0 films whereas the films containing eugenol presented a thermal degradation between 110 to 300°C (indicating a plasticizing effect). The  $T_{onset}$  of the PHB films increased over biodegradation process, which may be associated with increased assimilation of smaller molar mass whereas the larger molecules make more organized, modifying the crystallinity. Melting events associated to the eugenol were identified only in films prepared with 40 % of this compound at the initial time and after 10 days. After this period, eugenol is totally released in the soil and degradation events for this compound were no longer detected.

### 3.4 X-Ray diffraction analysis

The determination of the crystalline fraction is an important parameter to evaluate the physical and chemical properties of the polymer material (COELHO et al., 2008). For this particular polymer, an increased crystallinity reduces the enzymatic degradation rate (KUMAGAI et al., 1992; NISHIDA E TOKIWA, 1993; CANETTI et al., 1999; TOKIWA E CALABIA, 2004; TOKIWA et al., 2009). The PHB depolymerase firstly hydrolyzes the PHB chains in the amorphous zones on the film surface and subsequently erodes the PHB chains in crystalline zones (KUMAGAI et al., 1992). The diffractograms of all samples were analyzed and the degree of crystallinity was calculated considering the peak areas. The impact of both eugenol incorporation and biodegradation period on the polymer crystallinity was evaluated (Figure 6). The presence of eugenol contributed to increasing the crystallinity of PHB films. Characteristic peaks of PHB at diffraction angles ( $2\theta$ ) of 13.5 and 16.37° (BAZZO et al., 2008; ARMENTANO et al., 2015; MOTTIN et al., 2016) were observed for all samples. Both PHBE20 and PHBE40 films buried in the agricultural soil and landfill showed a reduction in the polymer crystallinity after 40 days. In the sandy soil, in turn, a significant reduction in PHB crystallinity was observed after 25 days, probably due to the higher moisture content when compared to other soil types. The pore spaces between the particles in sandy soils are quite large, which contribute to increasing the water accumulation after precipitation periods. Molecular mobility increases with temperature and moisture, which facilitate the polymer amorphization (MARSAC et al., 2010).

### *3.5 Determination of mechanical properties*

PHB0 presents greater stiffness than films containing eugenol. The film stiffness reduces over biodegradation period due to the formation of pores and cracks (Figure 7), as already reported in other studies (TSUJI E SUZUYOSHI, 2002; CASARIN et al., 2013). Films prepared with eugenol 40% were less resistant, which may be justified by the plasticizing effect of eugenol. PHB40 also presented greater specific deformation. The incorporation of eugenol reduced the Young modulus of PHB films in a dependent-concentration manner (Figure 7d). The reduction in tensile strength with increasing essential oil concentration had already been observed in a study incorporating cinnamon essential oil in PHB films (GIAQUINTO et al., 2017). The addition of plasticizing agents contributes to reducing the intramolecular bonds of polymer, which explains its lower mechanical resistance. Young modulus from agricultural soil was not analyzed after 25, 40 and 60 days due to high polymer degradation rates.

## **4. DISCUSSION**

In recent years, the food industry is developing new antimicrobial packaging systems (active packaging) through the incorporation of essential oils or their main compounds into the films. Food-related microorganisms can lead to deterioration of foodstuff, but also can produce several diseases in humans (MAISANABA et al., 2017). For this reason, in this study, an antimicrobial screening was initially performed to evaluate the performance of eugenol-loaded PHB films focusing on this application in the food industry. PHB films containing eugenol were more effective against Salmonella, even for films prepared with lower eugenol concentration, which has been the main pathogen causing food-related death (MEAD et al., 1999). Low fungi activity was found for eugenol-loaded PHB films, which may be associated with the resistance of the microorganism to degradation. The fungi cell wall is composed of polymers of chitin and melanin, making them very resistant to degradation (SUBHA, 2014).

The antimicrobial effect depended on the compound concentration and time of exposure of the microorganism to the antimicrobial agent. Although antimicrobial activity of free eugenol had not considered in this study, PHB films showed to be less active than the free compound when literature assays are considered (CATHERINE et al., 2012; MARCHESE et al., 2017). The slow diffusion and release of the antimicrobial agent from films may justify these findings. In a previous study with PHB films containing eugenol, a slow release rate was found in water (NARAYANAN E RAMANA, 2013); however, studies evaluating the migration of eugenol from films should be performed to confirm this hypothesis. Essential oils would interact with the polymer structure, reducing the compound amount available for the biological action.

Although the softness, lightness and transparency of polymers have been decisive features for the selection of the packaging material for many years, the occurrence of serious ecological problems has contributed to starting new discussions in this field. In contrast to natural polymer films, most synthetic packaging films are characterized by a very slow biodegradability (SIRACUSA et al., 2008). In this context, natural polymers such as the PHB have been often prioritized. Exhaustive studies showing a rapid biodegradation of this polymer may be found in the literature (DOS SANTOS ROSA et al., 2004; BOYANDIN et al., 2013; CASARIN et al., 2013; ALTAEE et al., 2016a), but the impact of the inclusion of new materials on its matrix is underexplored. For this reason, this study evaluated the effect of different soil types on the biodegradation of PHB films containing eugenol for 60 days. Fungi and mesophilic bacteria populations were monitored for different time periods. Bacteria and fungi often share a common substrate, and their spatial proximity in many environments has led to either synergistic or antagonistic interactions (MILLE-LINDBLOM et al., 2006).

For the sandy soil, a reduced microbial population was observed in this soil type at the initial time period (zero time; Figure 3), which may be associated with its lower ability to retain water and nutrients. Furthermore, a faster diffusion of eugenol from PHB films to the sandy soil would be expected given that this soil structure is more porous. As a consequence, the microbial population is initially reduced by both nutrient unavailability and eugenol action. The high soil moisture content (Table 2) also makes the PHB less crystalline (Figure 6) and contributes to increasing the bacteria population. As already observed in previous studies, the bacteria activity is higher in moister environments (ZHANG et al., 2016). A significant increase of fungi population was observed after 60 days (Figure 3), which could be justified by the soil acidity changes (Table 2). Fungi populations predominate on the aerobic microbial community in more acidic soils (MATTHIES et al., 1997; ZHANG et al., 2016).

Overall, the greater the soil fertility, the greater the soil microbial biomass. In view of high microbial biomass in agriculture soil (Figure 3) and that both fungi and bacteria are able to degrade PHB, higher degradation rate was found in this soil type (Figure 2). The fungi biomass for all analysed time intervals and a ratio of fungi/bacteria was higher in agricultural soil than other soil types. In a comparative study of the degradation ability of different microbial strains isolated from soil, fungi showed a higher contribution to the degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) films than bacteria (SANG et al., 2002). Bacteria grow in a site-specific way on the polymer films whereas fungi present a much faster growth along the film surface, expanding their hyphae in a three-dimensional. As a consequence, they present higher degradation ability. Moreover, the phosphorus availability, which is more easily assimilated by fungi than bacteria (ALORI et al., 2017), is higher in agriculture soil than other soil types (Table 2). This constituent seems to be an important regulator of the

biogeographical patterns exhibited by fungal communities (LAUBER et al., 2008). As a consequence, an increased fungi population is observed in phosphorus-rich soil. Although high initial microbial biomass may be found in the landfill soil, both bacteria and fungi populations were significantly reduced over biodegradation study time, which explains a lower degradation rate of the polymer film when compared to the agricultural soil. Fungi biomass was more stable than bacteria biomass, which may be associated with differences in the moisture content. Unlike the agricultural and sandy soils, the water content significantly reduced over time for landfill soil (Table 2). Fungi are less sensitive to changes in moisture than bacteria because their chitinous cell walls make them more resilient to changes in moisture and temperature (STEVENSON et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

The addition of eugenol in the PHB films contributed to enhance the crystallinity of the polymer (Figure 6) and reduce their mechanical properties, particularly film stiffness (Figure 7). The presence of a new plasticizer agent may affect the polymer crystallization rate depending on the concentration. In a study with canola oil-loaded PHB films, polymer crystallization rate values were lower for the films prepared with a low concentration of this plasticizer whereas an opposite effect was observed at high oil concentrations (GIAQUINTO et al., 2017). As high eugenol concentration was used in our study, a greater crystallinity was expected. Polymer-polymer type interactions would be enhanced due to the presence of eugenol. This plasticizer would present a preferential interaction with amorphous zones of polymer, increasing the intensity of crystalline peaks in XRD analysis. Once the amorphous zones of PHB films would be more available for the interaction with depolymerase enzymes in the eugenol presence, the higher degradation rate of PHB films is observed. ALTAEE et al. (2016a) and CECCORULLI et al. (1992) also reported that PHB degradation rate could possibly be accelerated by the addition of plasticizers or polymers.

## **5. CONCLUSION**

Active packagings for the food industry were successfully obtained after incorporation of eugenol in PHB films given that a significant plasticizer and antimicrobial effect were found. PHB films buried in agricultural soil degraded more rapidly, which can be attributed to higher microbial population (especially fungal biomass) and phosphorous availability. Soil acidity and phosphorous availability were the main factor responsible to increase the fungi population. The film crystallinity was affected by the soil moisture level, which is reduced in high moisture conditions. As a consequence, hydrolysis rate of polymer may be changed depending on the degree of disorder of the polymer. Further studies are needed to understand if chemical or enzymatic degradation is more relevant for the biodegradation of PHB films.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to acknowledge CNPq/MCTI and CAPES/MEC for financial support and also PHB Industrial S.A. for the polymer donation.

## **REFERENCES**

1.Thakur S, Chaudhary J, Sharma B, Verma A, Tamulevicius S, Thakur VK. Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2018;13:68-75.

2. Franchetti SMM, Marconato JC. Biodegradable polymers-a partial way for decreasing the amount of plastic waste. *Quimica Nova*. 2006;29(4):811-6.
3. Rosa DS, Chui QSH, Filho Pantano R, Agnelli JAM. Avaliação da Biodegradação de Poli- $\beta$ -(Hidroxibutirato), Poli- $\beta$ -(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- $\epsilon$ -(caprolactona) em Solo Compostado. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2002;12(4).
4. Mishra RK, Ha SK, Verma K, Tiwari SK. Recent progress in selected bio-nanomaterials and their engineering applications: An overview. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2018.
5. Grigull VH, Da Silva DD, Formolo Garcia MC, Furlan SA, Testa Pezzin AP, Schneider ALdS, et al. Production and Characterization of Poly (3-Hydroxybutyrate) from Oleic Acid by *Ralstonia eutropha*. *Food Technology & Biotechnology*. 2008;46(2).
6. Wellen RM, Rabello MS, Fachine GJ, Canedo EL. The melting behaviour of poly (3-hydroxybutyrate) by DSC. Reproducibility study. *Polymer Testing*. 2013;32(2):215-20.
7. Correa JP, Molina V, Sanchez M, Kainz C, Eisenberg P, Massani MB. Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin. *Food Packaging and Shelf Life*. 2017;11:31-9.
8. Casarin SA, Agnelli JA, Malmonge SM, Rosário F. Blendas PHB/copolíesteres biodegradáveis: biodegradação em solo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2013;23(1):115-22.
9. Chen G-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*. 2009;38(8):2434-46.
10. Altaee N, El-Hiti GA, Fahdil A, Sudesh K, Yousif E. Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil. *SpringerPlus*. 2016;5(1):762.
11. Beleneva I, Zhukova N. Seasonal dynamics of cell numbers and biodiversity of marine heterotrophic bacteria inhabiting invertebrates and water ecosystems of the Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Microbiology*. 2009;78(3):369-75.
12. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eleventh Edition. . 2012.
13. Ostatek-Boczynski ZA, Lee-Steere P. Evaluation of Mehlich 3 as a universal nutrient extractant for Australian sugarcane soils. *Communications in soil science and plant analysis*. 2012;43(4):623-30.
14. Faria AUd, Martins-Franchetti SM. Biodegradação de filmes de polipropileno (PP), poli (3-hidroxibutirato)(PHB) e blenda de PP/PHB por microrganismos das águas do Rio Atibaia. *Polímeros*. 2010;20(2):141-7.
15. Torres-Tello EV, Robledo-Ortíz JR, González-García Y, Pérez-Fonseca AA, Jasso-Gastinel CF, Mendizábal E. Effect of agave fiber content in the thermal and mechanical properties of green composites based on polyhydroxybutyrate or poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate). *Industrial crops and products*. 2017;99:117-25.
16. Kai D, Chong HM, Chow LP, Jiang L, Lin Q, Zhang K, et al. Strong and biocompatible lignin/poly (3-hydroxybutyrate) composite nanofibers. *Composites Science and Technology*. 2018;158:26-33.
17. Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*. 2008;47(3):174-9.
18. Sanla-Ead N, Jangchud A, Chonhenchob V, Suppakul P. Antimicrobial Activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films. *Packaging Technology and Science*. 2012;25(1):7-17.
19. Bittmann B, Bouza R, Barral L, Diez J, Ramirez C. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/clay nanocomposites for replacement of mineral oil based materials. *Polymer Composites*. 2013;34(7):1033-40.
20. Matson PA, Parton WJ, Power A, Swift M. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*. 1997;277(5325):504-9.
21. Machado ML, Pereira NC, Miranda Lfd, Terence MC, Pradella JG. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2010;20(1).

- 22.Coelho NS, Almeida Y, Vinhas GM. A Biodegradabilidade da Blenda de Poli (b-Hidroxiubirato-co-Valerato)/Amido Anfótero na Presença de Microrganismos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2008;18(3).
- 23.Canetti M, Urso M, Sadocco P. Influence of the morphology and of the supermolecular structure on the enzymatic degradation of bacterial poly (3-hydroxybutyrate). *Polymer*. 1999;40(10):2587-94.
- 24.Kumagai Y, Kaneshawa Y, Doi Y. Enzymatic degradation of microbial poly (3-hydroxybutyrate) films. *Die Makromolekulare Chemie*. 1992;193(1):53-7.
- 25.Nishida H, Tokiwa Y. Effects of higher-order structure of poly (3-hydroxybutyrate) on its biodegradation. II. Effects of crystal structure on microbial degradation. *Journal of environmental polymer degradation*. 1993;1(1):65-80.
- 26.Tokiwa Y, Calabria B, Ugwu C, Aiba S. Biodegradability of plastics. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(9):3722-42.
- 27.Tokiwa Y, Calabria BP. Review degradation of microbial polyesters. *Biotechnology letters*. 2004;26(15):1181-9.
- 28.Armentano I, Fortunati E, Burgos N, Dominici F, Luzzi F, Fiori S, et al. Processing and characterization of plasticized PLA/PHB blends for biodegradable multiphase systems. *Express Polymer Letters*. 2015;9(7).
- 29.Mottin AC, Ayres E, Oréfice RL, Câmara JJD. What changes in poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) when processed as electrospun nanofibers or thermo-compression molded film? *Materials Research*. 2016;19(1):57-66.
- 30.Bazzo GC, Lemos-Senna E, Gonçalves M, Pires ATN. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly (hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2008;19(5):914-21.
- 31.Marsac PJ, Rumondor AC, Nivens DE, Kestur US, Stanciu L, Taylor LS. Effect of temperature and moisture on the miscibility of amorphous dispersions of felodipine and poly (vinyl pyrrolidone). *Journal of pharmaceutical sciences*. 2010;99(1):169-85.
- 32.Tsuji H, Suzuyoshi K. Environmental degradation of biodegradable polyesters 1. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone), poly [(R)-3-hydroxybutyrate], and poly (L-lactide) films in controlled static seawater. *Polymer Degradation and Stability*. 2002;75(2):347-55.
- 33.Giaquinto CDM, Souza GKMD, Caetano VF, Vinhas GM. Evaluation of the mechanical and thermal properties of PHB/canola oil films. *Polímeros*. 2017;27(3):201-7.
- 34.Maisanaba S, Llana-Ruiz-Cabello M, Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Puerto M, Prieto AI, et al. New advances in active packaging incorporated with essential oils or their main components for food preservation. *Food Reviews International*. 2017;33(5):447-515.
- 35.Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*. 1999;5(5):607.
- 36.Subha G. Role of soil microfauna and microflora in agriculture. *International Journal of Agricultural Sciences*. 2014;10(1):477-8.
- 37.Catherine AA, Deepika H, Negi PS. Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. *Journal of Essential Oil Research*. 2012;24(5):481-6.
- 38.Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical reviews in microbiology*. 2017;43(6):668-89.
- 39.Narayanan A, Ramana KV. Synergized antimicrobial activity of eugenol incorporated polyhydroxybutyrate films against food spoilage microorganisms in conjunction with pediocin. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2013;170(6):1379-88.
- 40.Siracusa V, Rocculi P, Romani S, Dalla Rosa M. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2008;19(12):634-43.
- 41.Boyandin AN, Prudnikova SV, Karpov VA, Ivonin VN, Đỗ NL, Nguyễn TH, et al. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013;83:77-84.

42. dos Santos Rosa D, Calil MR, Guedes CdGF, Rodrigues TC. Biodegradability of thermally aged PHB, PHB-V, and PCL in soil compostage. *Journal of Polymers and the Environment*. 2004;12(4):239-45.
43. Mille-Lindblom C, Fischer H, J. Tranvik L. Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. *Oikos*. 2006;113(2):233-42.
44. Zhang Q, Wu J, Yang F, Lei Y, Zhang Q, Cheng X. Alterations in soil microbial community composition and biomass following agricultural land use change. *Scientific reports*. 2016;6:36587.
45. Matthies C, Erhard HP, Drake HL. Effects of pH on the comparative culturability of fungi and bacteria from acidic and less acidic forest soils. *Journal of Basic Microbiology*. 1997;37(5):335-43.
46. Sang B-I, Hori K, Tanji Y, Unno H. Fungal contribution to in situ biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film in soil. *Applied microbiology and biotechnology*. 2002;58(2):241-7.
47. Alori ET, Glick BR, Babalola OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:971.
48. Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008;40(9):2407-15.
49. Stevenson BA, Hunter DW, Rhodes PL. Temporal and seasonal change in microbial community structure of an undisturbed, disturbed, and carbon-amended pasture soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 2014;75:175-85.
50. Ceccorulli G, Pizzoli M, Scandola M. Plasticization of bacterial poly (3-hydroxybutyrate). *Macromolecules*. 1992;25(12):3304-6.



## Figure captions

**Fig. 2.** Climatic parameters during the biodegradation study.

**Fig. 2.** Pure PHB films and containing eugenol after 60 days of biodegradation.

(a,b,c) represent pure PHB films in agricultural, sandy and landfill soil, respectively; (d,e,f) represent PHB films prepared with 20% of eugenol and buried in agricultural, sandy and landfill soil, respectively; (g,h,i) represent PHB films prepared with 40% of eugenol and buried in agricultural, sandy and landfill soil, respectively.

**Fig. 3.** Microbial growth in different soil types after treatment with PHB/eugenol films.

**Fig. 4.** TGA curves of pure PHB and eugenol-loaded films during the soil biodegradation study. (a,d,g) agricultural soil; (b,e,h) sandy soil and (c,f,i) landfill soil.

**Fig. 5.** DTG curves of pure PHB and eugenol-loaded films during the soil biodegradation study. (a,d,g) agricultural soil; (b,e,h) sandy soil and (c,f,i) landfill soil.

**Fig. 6.** DRX analysis of pure PHB and eugenol-loaded films during the soil biodegradation study. (a,d,g) agricultural soil; (b,e,h) sandy soil and (c,f,i) landfill soil.

**Fig. 7.** Tensile test (a,b,c) and modulus of elasticity (d) for pure PHB and eugenol-loaded films during the biodegradation study.

\*APHB: agricultural soil; SPHB: sandy soil; LPHB: landfill soil.

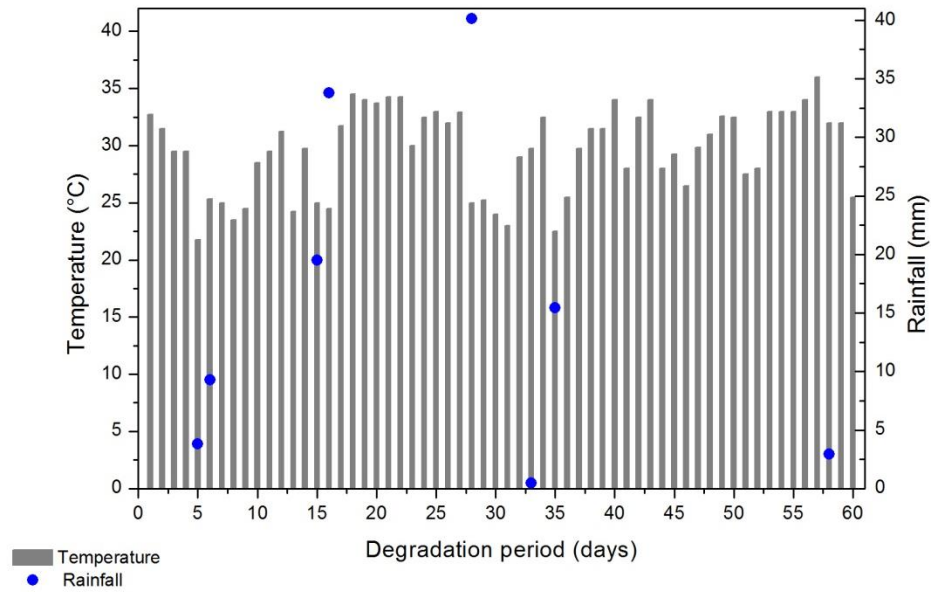
## Table Titles

**Table 1.** Antimicrobial activity of PHB/eugenol films.

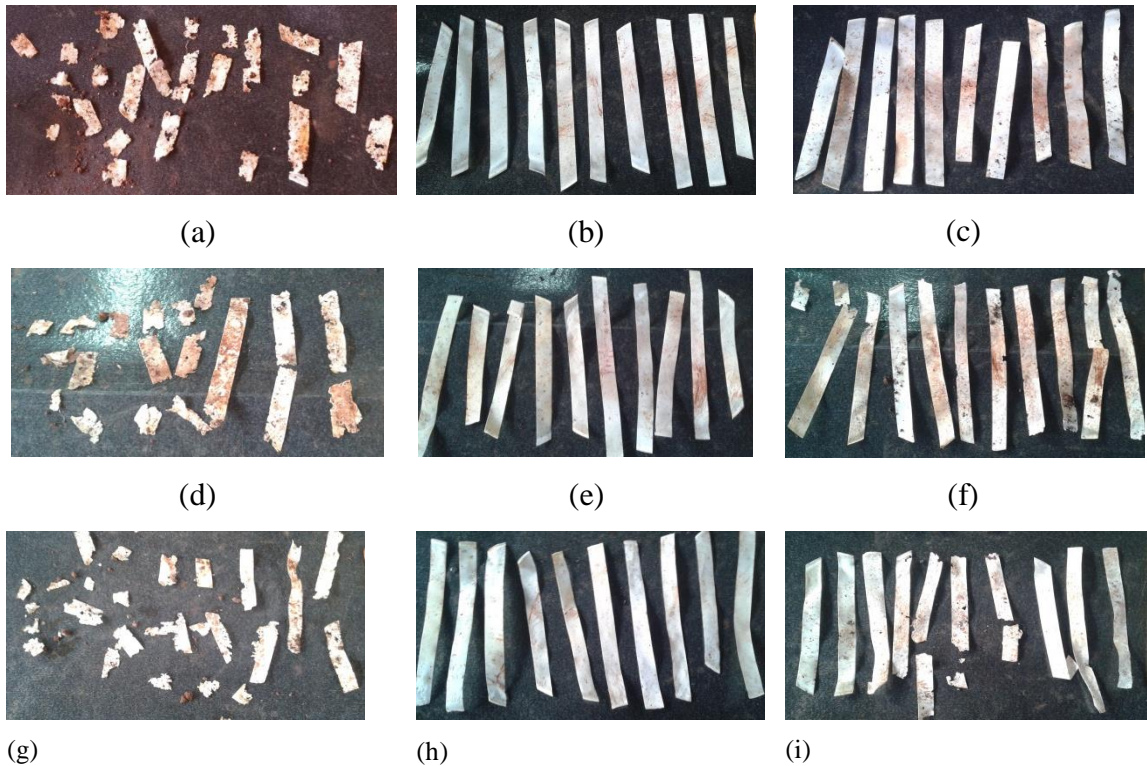
**Table 2.** Soil properties

**Table 3.** Thermodynamic parameters for pure PHB and PHB films containing eugenol.

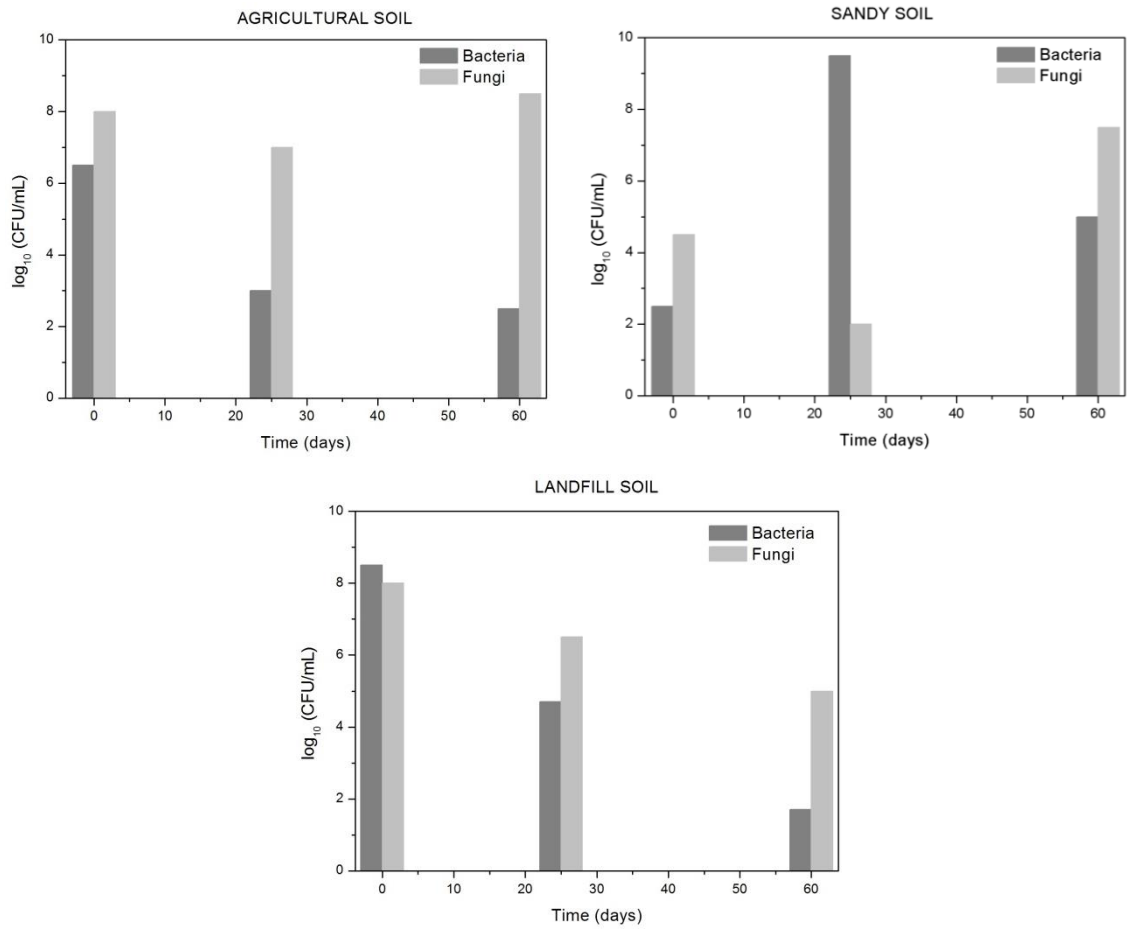
## List of Figures



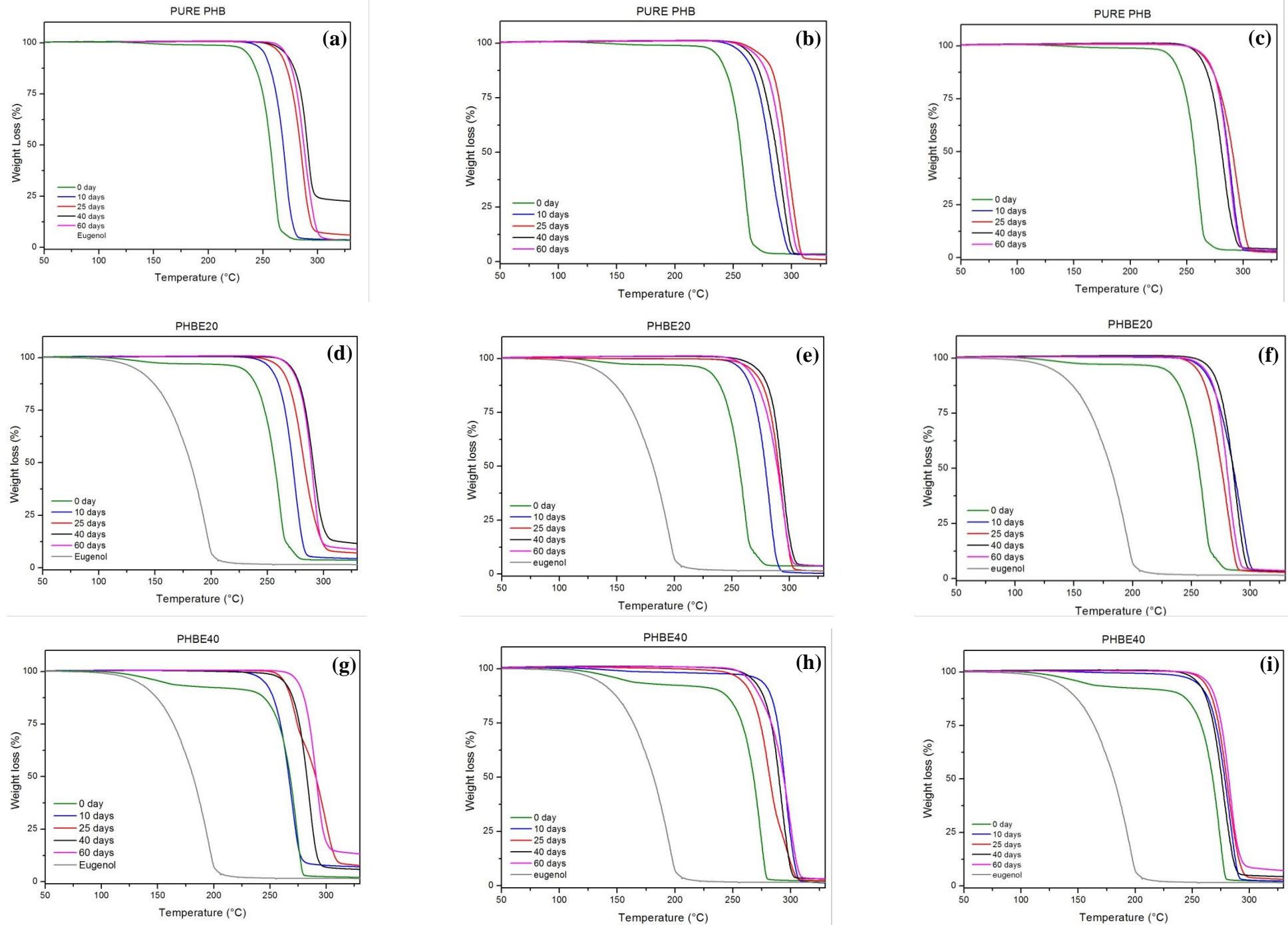
**Fig. 3.** Climatic parameters during the biodegradation study.



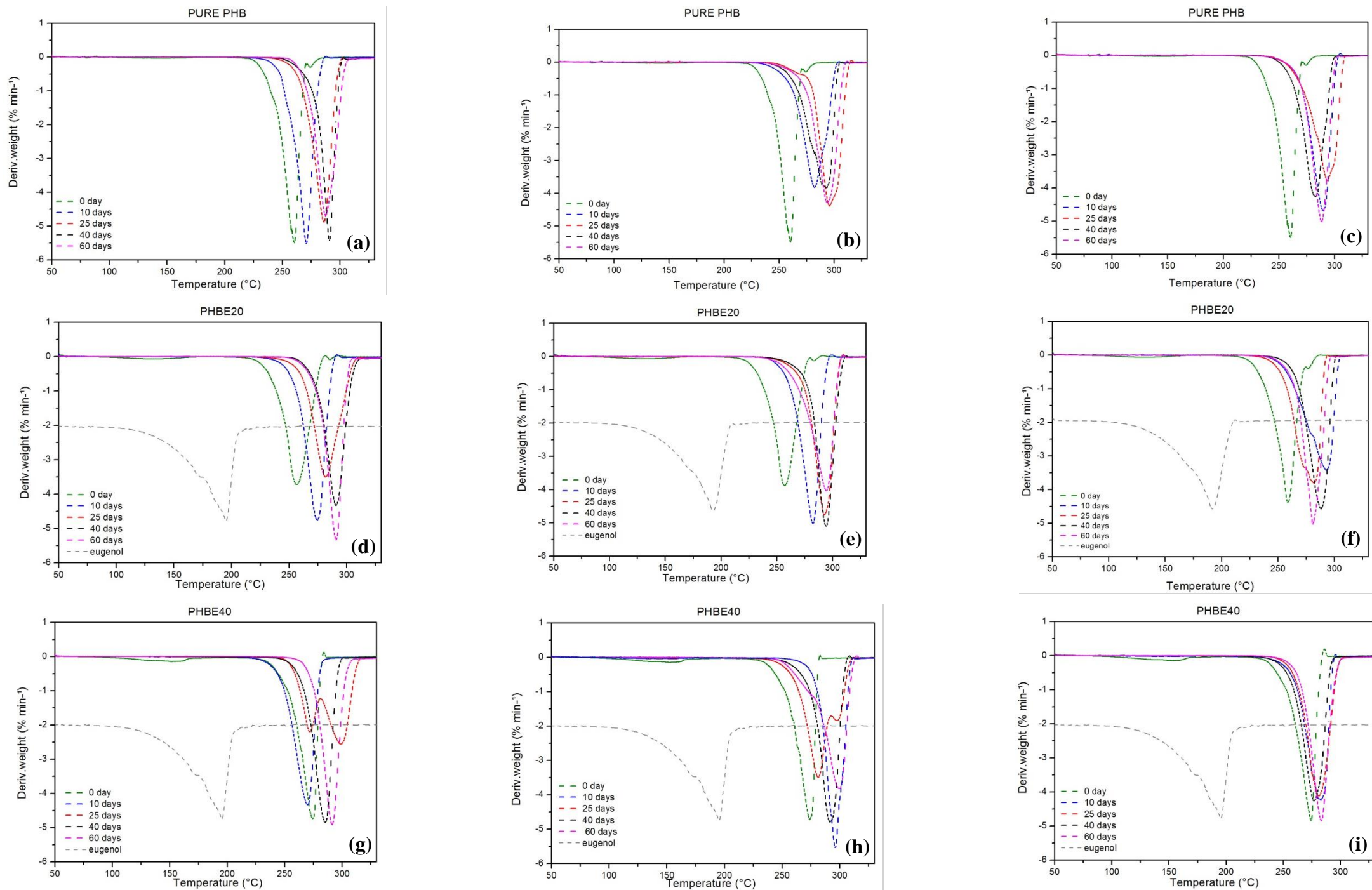
**Fig. 2.** Pure PHB films and containing eugenol after 60 days of biodegradation. (a,b,c) represent pure PHB films in agricultural, sandy and landfill soil, respectively; (d,e,f) represent PHB films prepared with 20% of eugenol and buried in agricultural, sandy and landfill soil, respectively; (g,h,i) represent PHB films prepared with 40% of eugenol and buried in agricultural, sandy and landfill soil, respectively.



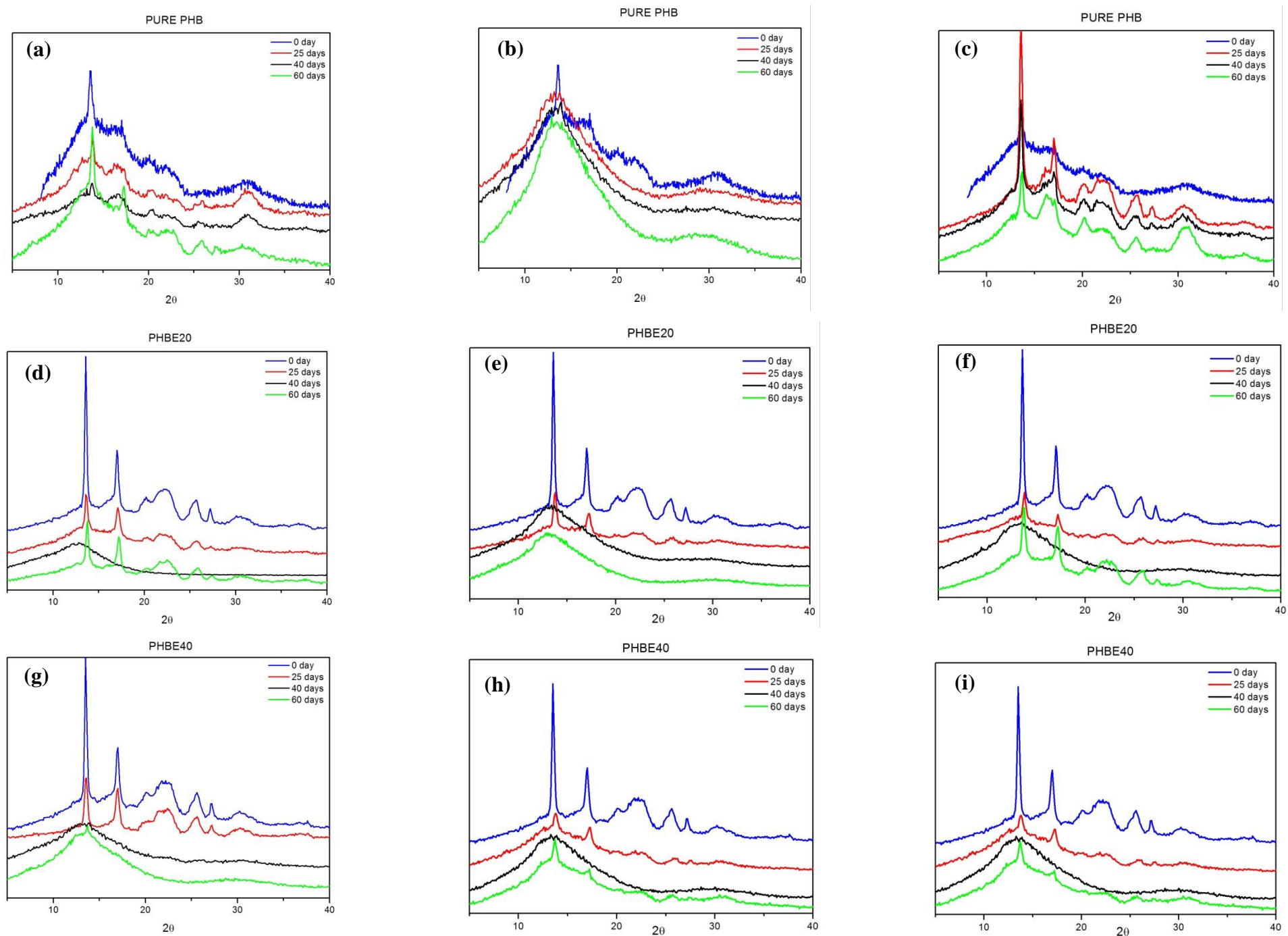
**Fig. 3.** Microbial growth in different soil types after treatment with PHB/eugenol films.



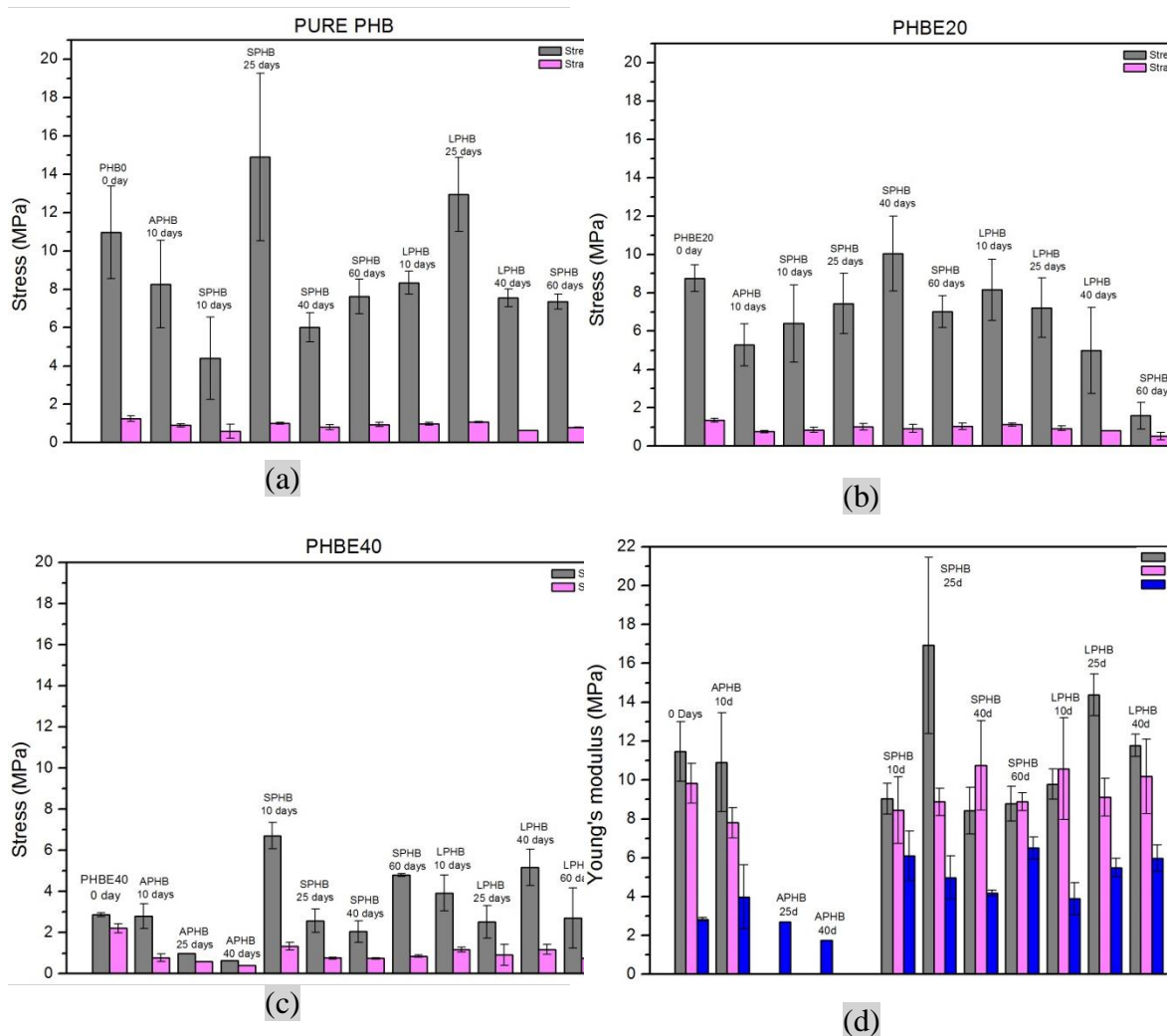
**Fig. 4.** TGA curves of pure PHB and films with eugenol oil submitted to soil biodegradation. (a, d, g) agricultural soil; (b, e, h) sandy soil e (c, f, i) landfill soil.



**Fig. 5.** DTG curves for pure PHB and eugenol films submitted to soil biodegradation. (a, d, g) agricultural soil; (b, e, h) sandy soil e (c, f, i) landfill soil.



**Fig.6.** Diffractograms of XRD films of pure PHB and containing eugenol submitted to biodegradation in soil. (a, d, g) agricultural soil; (b, e, h) sandy soil and; (c, f, i) landfill soil.



**Fig. 7.** Tensile test (a, b, c) and modulus of elasticity (d) for samples pure PHB and incorporated with eugenol films subjected to biodegradation. (APHB: agricultural soil; SPHB: sandy soil; LPHB: landfill soil).

### List of Tables

**Table 1.**  
Antimicrobial activity of PHB/eugenol films.

Microorganisms	Average size of inhibition halos		
	PHB0	PHBE20	PHBE40
<i>Salmonella</i> sp. ATCC 13076	-	1.00 ± 0.70	3.00 ± 1.40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19093	-	-	1.00 ± 0.00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	2.00 ± 1.40
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	-	-	3.50 ± 0.07

**Table 2.**  
Soil properties

Soil	pH CaCl <sub>2</sub>	pH H <sub>2</sub> O	P (mg/dm <sup>3</sup> )	K (cmolc/dm <sup>3</sup> )	Humidity (%)			pH		
					0 day	25 days	60 days	0 day	25 days	60 days
Agricultural	5.84	6.44	28.056	0.7	3.09	8.19	9.63	5.47	6.20	6.40
Sandy	4.61	5.37	0.762	0.0	6.41	15.48	15.36	3.94	6.04	5.22
Landfill	6.64	7.13	7.351	0.3	12.08	5.09	7.86	6.67	7.77	7.79



**Table 3.**

Thermodynamic parameters of DSC for pure PHB and PHB samples containing eugenol essential oil.

Soils	Samples	Degradation Period	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	X <sub>c</sub> (%)
<b>Before degradation</b>	PHB0	0 day	169	21.72	14.88
	PHBE20	0 day	164	16.51	11.31
	PHBE40	0 day	171	18.66	12.78
<b>Agricultural</b>	PHB0	10 days	172	19.11	13.09
		25 days	173	15.92	10.90
		40 days	173	14.27	9.77
		60 days	176	18.33	12.55
	PHBE20	10 days	169	23.79	16.29
		25 days	171	19.75	13.58
		40 days	171	17.53	12.00
		60 days	171	20.41	13.98
	PHBE40	10 days	173	19.97	13.68
		25 days	172	22.47	15.39
		40 days	171	20.92	14.33
		60 days	172	18.45	12.64
<b>Sandy</b>	PHB0	10 days	161	17.38	11.90
		25 days	164	22.07	15.12
		40 days	165	20.90	14.31
		60 days	163	21.40	14.66
	PHBE20	10 days	157	25.59	17.52
		25 days	163	27.19	18.62
		40 days	160	22.56	15.45
		60 days	159	22.61	15.49
	PHBE40	10 days	158	24.67	16.90
		25 days	159	25.55	17.50
		40 days	160	26.22	17.96
		60 days	162	27.86	19.08
<b>Landfill</b>	PHB0	10 days	163	20.02	13.71
		25 days	164	20.92	14.33
		40 days	163	22.56	15.45
		60 days	163	17.68	12.10
	PHBE20	10 days	160	25.60	17.53
		25 days	161	22.43	14.33
		40 days	160	23.47	16.07
		60 days	161	18.48	12.66
	PHBE40	10 days	160	25.58	17.52
		25 days	160	24.44	16.74
		40 days	160	22.21	15.21
		60 days	161	21.14	14.48

### CAPÍTULO III

Artigo referente às blendas – a ser submetido à revista *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.

Os PHAs são termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis, sintetizados a partir de recursos renováveis e podem substituir plásticos convencionais em algumas aplicações. Além disso, o aumento da demanda do consumidor por embalagens que não agridem o meio ambiente também ganhou destaque, e vários estudos têm se concentrado na incorporação de agentes antimicrobianos em produtos biodegradáveis.

Este capítulo apresenta misturas de OEs incorporadas em PHB. Os filmes contendo melaleuca e canela, e canela e citronela apresentaram atividade antimicrobiana e maior transmitância do que os filmes de melaleuca e citronela. O comportamento térmico não foi alterado com a adição de blendas de OEs, mas interferiu na cristalinidade do material e nas propriedades mecânicas.

# **Antimicrobial polyhydroxybutyrate (PHB) films incorporated with essential oil blends**

**Chaiane R. Rech<sup>\*1</sup>, Kelly C. S. Brabes<sup>2</sup>, Bárbara E. Bagnara e Silva<sup>1</sup>, Marco A. U. Martines<sup>3</sup>, Tayla F. S. Silveira<sup>3</sup>, Josué Alberton<sup>4</sup>, Thiago Caon<sup>5</sup>, Eduardo J. de Arruda<sup>1</sup>, Silvia M. Martelli<sup>2</sup>.**

\*Correspondence: smmartelli@gmail.com (S.M. Martelli).

Faculty of Engineering, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12 - Cidade Universitaria, 364, Zip Code 79804-970, Dourados, MS, Brazil. Tel.: +55 67 3410 2183.

---

<sup>1</sup> Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil; chaiane.rech@hotmail.com; babibagnara@hotmail.com

<sup>2</sup> Faculty of Engineering, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil; kellybrabes@ufgd.edu.br; smmartelli@gmail.com

<sup>3</sup> Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil; marcomartines@gmail.com; taylafserantoni@gmail.com

<sup>4</sup> Barriga Verde University Center, Orleans, SC, Brazil, gwduarte@gmail.com

<sup>5</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. thiagoCaon@gmail.com

**Abstract:** The present work explores the combination of essential oils of cinnamon, melaleuca and citronella in different concentrations and their incorporation in polyhydroxybutyrate (PHB) films, which have potential for application in food packaging. The films were characterized by TGA, DSC, UV-vis and mechanical assay. The antimicrobial activity of the films was also evaluated against five microorganisms. Only the melaleuca and citronella (MCI) films showed no antimicrobial activity, but can be used for other purposes due to their low UV transmission and good thermal stability. The films of citronella and cinnamon (CICA) and melaleuca and cinnamon (MCA) presented antimicrobial activity and more flexibility than those of pure PHB. These results demonstrate that the addition of essential oil blends may offer a good outlook for antimicrobial and flexible films and therefore suitable for biodegradable food packaging.

**Keywords:** Poly 3-hydroxybutyrate; essential oil; thermal analysis; mechanical testing; antimicrobial.

## Introduction

The increasing search for the reduction of the environmental impact due to the accumulation of plastic wastes, aroused interest in the research of new biodegradable materials<sup>(1)</sup>. Among the most studied biodegradable polymers are poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), a polyhydroxyalkanoate (IGGUI et al.) family polymer synthesized by many bacteria<sup>(2)</sup> and whose molecular weight differs from one organism to another growth and extraction method<sup>(3)</sup>.

PHB has some properties similar to conventional plastics, such as polypropylene<sup>(4, 5)</sup>. It is a renewable, biocompatible and linear thermoplastic<sup>(6)</sup> with low oxygen and water permeability and attractive barrier properties compared to other polyesters<sup>(7, 8)</sup>. It has high melt temperature (175°C)<sup>(9)</sup> and high tensile strength (30 MPa)<sup>(4)</sup>, degree of crystallinity in the range of 55-80%, with glass transition temperature (T<sub>g</sub>) of approximately 5°C and decrease of the molar mass at temperature above 170°C<sup>(10)</sup>.

PHB presents potential for application in medical devices<sup>(11, 12)</sup> and packaging<sup>(13)</sup>. In addition, recent research has focused on the development of edible/biodegradable food packaging with the incorporation of natural additives, such as essential oils (EO's)<sup>(14)</sup>, which have antimicrobial and antioxidant activity<sup>(15)</sup>. This process can be done by incorporating the antibacterial agent into the polymer matrix or by immobilizing the antimicrobial agents on the surface of the packaging material<sup>(16)</sup>.

EO's are volatile liquids obtained from different parts of plants and are generally recognized as safe for consumption<sup>(17)</sup>. The antimicrobial activity of EO's is associated with the number of terpenoids and phenolic compounds, such as eugenol, carvacrol and thymol<sup>(18, 19)</sup>. Thus, its incorporation into polymer films provides microbial safety to consumers, reducing, inhibiting or retarding the growth of microorganisms, as well as prolonging the shelf life of packaged foods<sup>(20)</sup>.

Among the large variety of EO's, several authors have demonstrated in the literature the efficacy of cinnamon EO's (*Cinnamomum cassia*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) and citronella (*Cymbopogon winterianus*) for their antimicrobial activity<sup>(20-24)</sup>. In addition, the EO combination may be effective in enhancing the antimicrobial effects of films<sup>(25)</sup>. Yanwong and Threepopnatkul<sup>(24)</sup> developed chitosan films with the combination of cinnamon and ginger EO for pork packaging. They observed that the addition of EO's increased film thickness and opacity, but did not modify film solubility and water vapor permeability. In addition, when applied to the preservation of pork slices, the films were effective in retarding total microbial growth, pH increase and lipid oxidation. The authors concluded that chitosan films with EO's showed potential for application in pork packaging.

Considering the above mentioned, the present work explored the potential of use a combination of the EO's of cinnamon, melaleuca and citronella, in different concentrations, its incorporation into PHB films for obtaining antimicrobial materials that could be used for food packaging. Also, the effect of EO blends addition on the mechanical and thermal properties of the films was evaluated.

## **Materials and Methods**

### *Materials*

The PHB (MW = 221,000 g/mol; 99% purity) was obtained from PHB Industrial S.A. The EO's (99% purity) was purchased from the Ferquima. The other reagents used were of analytical grade and used as received.

### *Film Preparation*

The PHB films were prepared by the casting method. PHB was initially added to the chloroform (5%, w/v) and stirred until complete solubilization at 60°C. This solution was filtered, partitioned, different concentrations of EO (Table 1) were added and stirred for 15 min. After this period, 25 mL of the solution was placed in Petri dishes and incubated in an atmosphere saturated with chloroform for 3 days (time needed for the formation of a thin and dry film).

#### *Determination of antimicrobial activity of films containing EO's*

The antimicrobial activity of films was evaluated by the agar disk diffusion method<sup>(26)</sup>, with adaptations. against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella* sp. ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Aspergillus niger* ATCC 6275. For the bacterial inoculum preparation, the turbidity of the initial bacterial suspension was adjusted comparing with 0.5 McFarland standard. After seeding the bacterial inoculum, PHB films were cut into circles of approximately 6 mm diameter and placed on the Petri dish containing Mueller Hinton agar. The plates were then maintained in a bacteriological incubator for 24 h at 35°C.

#### *Films characterization*

##### *UV-visible absorption spectroscopy*

Molecular absorption spectra were obtained using a Ultraviolet-Visible (UV-vis) Cary, 50 CONC (Varian) Molecular Absorption Spectrophotometer with a 3,5 mL quartz cuvette (10 mm optical path). The transmittance was measured in the range of 250 to 800 nm.

### *X-Ray diffraction (XRD)*

Diffraction patterns were obtained using a  $\theta$ - $\theta$  D2 Phaser X-ray diffractometer (Bruker, Germany) with vertical goniometer of 282.2 mm in diameter and scintillator detector. The measurements were performed in the range of  $2\theta$  from 5 to 50°, using Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ), a tube current of 10 mA, a voltage of 30 kV, an integration time of 10 s and resolution of 0.01 degrees in acrylic. The degree of crystallinity was determined through the relationship between crystalline zones and amorphous zones.

### *Differential scanning calorimetry (DSC)*

The DSC analysis was performed on a TA Instruments device, model Q20 V24.11 Build 124, with a heating rate of 10 °C/min in the temperature range of -20 °C to 210 °C under Nitrogen atmosphere.

### *Thermogravimetric analyses*

The thermogravimetric analysis was performed using the TA Instruments apparatus, model Q50 V20.13 Build 39. The samples were heated at 20-600°C at a heating rate of 10°C min<sup>-1</sup> under nitrogen.

### *Mechanical tensile strength test*

The tensile strength mechanical tests of the films were performed according to ASTM D882 (American Society for Testing And Materials)<sup>(27)</sup>, using the universal testing machine Emic (model DL2000) and load cell TRD-21 with Load capacity equal to 50 kg (490.5 N).

The specimens were obtained from the films, having a uniform thickness of 0.08-0.120 mm, 130 mm (length), 10 mm (width) and conditioned before the tests at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $58 \pm$



3% RH, for 48 h. Subsequently, the specimens were positioned in the universal test machine with 50 mm spacing between the mechanical claws.

The tensile strength tests were performed at a constant speed of  $5 \text{ mm min}^{-1}$  at  $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $58 \pm 3\%$  RH. For each treatment (formulation) 10 replicates were performed. Data were collected from the universal test machine using Tesc® software version 1.13. The mechanical tensile strength test was used to analyze the modifications in the PHB films by means of the tensile strength at break, specific deformation and modulus of elasticity (Young's modulus) measurements.

The statistical analysis to test the equality of the means of treatments in each of the systems was performed by analysis of variance (ANOVA). To examine the differences between the means by multiple comparison was used the Tukey test. The significance level of the statistical tests was 5% and the data were treated in Excel® 2013 software from Microsoft® Corporation and Dell Statistica (data analysis software system), version 13.

## **Results and Discussion**

### *PHB films incorporated with essential oil blends*

Figure 1 shows the images of pristine PHB films and films containing EO's blends. Considering the visual aspect, homogeneity and transparency of the films, PHB films with melaleuca and citronella (MCI) EO blends were opaque and heterogeneous, differing from films made with melaleuca and cinnamon blends (MCA) and citronella and cinnamon (CICA) which were homogeneous and transparent. The presence of other molecules inside the polymer matrix, such as the EO, can interact with the biopolymer, changing its structure organization and then, the way its disperse light, so changing its appearance, from opacity to transparent.

### *Transmittance*

Transmittance is an important property for evaluating the efficacy of food packaging, since ultraviolet<sup>(9)</sup> radiation is responsible for the lipid oxidation of food<sup>(28)</sup> the loss of vitamins and other nutritional components, through degradation reactions that affect product quality<sup>(29)</sup>. However, not only UV radiation, but also visible radiation, has a significant effect on the stability of photosensitive foods, since it has a deteriorating effect, since they initiate and accelerate degradation reactions through photochemical action<sup>(30)</sup>. In order to protect the packaged products from the deterioration caused by photochemical reactions, light barrier packaging is necessary, since it is a catalyst for the degradation reactions<sup>(31)</sup>, deteriorating lipids, anthocyanins, carotenoids, vitamins and chlorophyll.

The films incorporated with MCI presented opaque coloration and, consequently, low transmittance of UV radiation (1.84%) (Figure 2), essential feature to avoid the oxidation of photosensitive foods. While the films incorporated with MCA and CICA were transparent, and presented transmittance at 36.79% and 17.81%, respectively.

Foods such as fruits and vegetables, egg yolk, skin and muscle of some fish, are rich in carotenoids<sup>(32)</sup>, as are anthocyanins in fruits and vegetables<sup>(33)</sup>. Most carotenoids exhibit absorption in the visible region between 400 and 500 nm<sup>(34)</sup>, while anthocyanins exhibit absorption bands in the region of 490 to 550 nm<sup>(33)</sup>. Evaluating this wavelength range, from 400 to 550 nm, it is observed that MCI films exhibit lower transmittance, allowing better use of foods rich in carotenoids and anthocyanins (Figure 3).

EO's are a mixture of terpenes and other compounds, containing double bonds, which can absorb light in the wave lengths corresponding to UV and visible radiation, also contributing to the reduction of transmittance of samples.

Some EO's when incorporated in a polymeric matrix are not effective, however, they may improve other packaging characteristics that are necessary, such as MCI films that did not present antimicrobial activity, but their UV light barrier is a positive factor for product protection sensitive to light<sup>(35)</sup>. Incorporation of EO causes reduced film transparency and thus a decrease in light transmission, possibly due to the dispersion of light at the EO droplet interface in the polymer matrix<sup>(36)</sup>, and consequently the increase in transmittance is directly interconnected the greater transparency of the film<sup>(14)</sup>. Atarés et al.<sup>(37)</sup> made films with cinnamon and ginger EO's, and cinnamon affected the color of the films more than ginger, with reduction of whiteness as the concentration of this oil increased.

#### *Antimicrobial activity of PHB films incorporated with oils essential blends*

The MCI films showed no antimicrobial activity against any of the microorganisms tested, as shown in Table 2. The MCA and CICA films showed antimicrobial activity for all microorganisms (Figure 4), and both presented the best results for *Aspergillus niger*.

In a previous study, was observed that, individually, the oil of melaleuca and citronella in PHB films showed no activity for any evaluated microorganism and cinnamon oil was not effective for *Salmonella* sp. at no concentration<sup>(38)</sup>. The mixture of MCA as well as CICA showed activity for *Salmonella* sp., besides, in most cases, an increase in the inhibition halo when compared to the individual oils, proving the synergism between the EOs. However, this was not observed among the EOs of melaleuca and citronella. Positive or negative interactions of EOs may occur and depend on the microorganisms evaluated and the relationship of the components of the mixture<sup>(39)</sup>.

Fu et al.<sup>(40)</sup> evaluated the antimicrobial activity of clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) alone and in combination. The mixture of EOs indicated additive, synergistic and antagonistic effects.

In a study carried out by Burgos et al.<sup>(41)</sup> PLA/PHB films incorporated with oligomers of lactic acid and EO of carvacrol presented antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. Narayanan et al.<sup>(18)</sup> developed PHB antimicrobial films by incorporating eugenol at various concentrations and evaluated their antimicrobial activity. The films were active against all tested microorganisms. Requena, Jiménez, Vargas e Chiralt<sup>(42)</sup> evaluated the antimicrobial activity of PHBV films with four active components: EO of oregano, carvacrol, clove EO and eugenol against *Escherichia coli* and *Listeria innocua*, with greater efficacy of oil of oregano and carvacrol.

Only one of the films with EO's blends did not present antimicrobial activity but can be used for other purposes due to its low UV transmission and good thermal stability. The CICA and MCA films presented antimicrobial activity and more flexibility than those of pure PHB. These results demonstrate that the addition of EO blends may offer a good outlook for antimicrobial and flexible films and thus suitable for biodegradable food packaging.

#### *Crystalline structure of pure PHB and PHB with essential oil blends.*

The influence of the addition of EO's on the crystal structure of the PHB films was studied through XRD and the results are presented in Figure 5.

In general, the diffractograms of the films are quite similar to each other, but films with EO have more defined peaks than the pure PHB. Characteristic  $2\theta$  values for PHB were observed in all of them:  $13.5^\circ$  and  $16.37^\circ$ <sup>(43-45)</sup>, in addition to the  $20.04^\circ$  peak attributed to  $\beta$ -form crystals<sup>(44)</sup> and peaks at  $25.45^\circ$  and  $30.71^\circ$ .

For the films incorporated with EO, it is observed in Figure 6 that the degree of crystallinity calculated by XRD ranged from 35,1 to 37,5%, whereas pure PHB showed a crystallinity degree of 20,2%. This means that the incorporation of these antimicrobials considerably altered the crystalline structure of the PHB with increase in the degree of crystallinity of the film.

#### *Differential scanning calorimetry (DSC)*

The melting behavior of the PHB films was determined using DSC. The curves of first heating scan of PHB films incorporated with EO blends are shown in Figure 7 and the thermal properties in Table 3.

The XRD and DSC analyzes can confirm if the active compound was actually encapsulated in the polymer because if it occurs to the interaction, the crystalline peaks and melting peaks will be an overlap of each substance<sup>(46)</sup>. There was no change in the thermal behavior with the addition of essential oil. The DSC curve shows two distinct endothermic peaks for all samples, between 145 and 175°C, the first peak shows the greatest change (reduction) in the melting temperature that can be attributed to the bimodal distribution of the PHB crystals.

The CICA and MCI films show the main melting peak at 149°C with 40,7 and 46,2% crystallinity, respectively. This result corroborates with the transmittance analysis, since the higher the degree of crystallinity, the greater the opacity of the film<sup>(47)</sup>. While the MCA films showed a peak of 143,7°C and 170,0°C and a crystallinity of 28,3%. The films incorporated with EO blends had lower initial degradation temperature than pure PHB, but this behavior is expected, since the oil modifies the way PHB crystallizes and has plasticizing action.

When crystallization is evaluated, it is observed that the crystallization of the pure PHB and MCI is faster, for the films containing EO this crystallization is slower, especially MCA that presented the lowest rate.

The presence of EO in the PHB matrix has changed its thermal behaviour. For instance it is clear that the addition of EO caused a change in the T of degradation of the polymer. This can be associated with the type of molecule present in its majority in to the oil.

#### *Thermogravimetric analyses*

Figure 8 and Table 3 shows the curves obtained from the thermogravimetric analysis (TGA) analysis for EO doped PHB films. The thermal analysis of the films showed two stages of degradation, the first stage at temperatures between 60 and 200°C, with loss of mass of 8.14 to 11.34%, and the second stage of higher thermal degradation occurred at temperatures of 200 to 400°C and mass loss of 97 to 98%. MCI films presented higher thermal stability than the others.

The derivative thermogravimetric analysis (DTG) curves are shown in Figure 9. The temperature of maximum degradation rate for films was found to be 287°C for MCI, 298°C and 310°C for CICA and MCA, respectively, while for pure PHB the maximum degradation occurs at 283°C. Depending of the EO used, the maximum degradation T increases, that is presents greater thermal stability.

#### *Mechanical properties*

Films for food packaging applications are subjected to stretching during the packaging process, with their modulus of elasticity and stretching characteristics being important. Table 4 shows the results of the mechanical test, specifically the tensile strength at

break, modulus of elasticity and percentage of deformation of pure PHB and PHB with mixtures of EOs. The addition of EO decreased the tensile strength compared to pure PHB, possibly due to substitution of the polymer-polymer interactions by oil components. MCA films reduced the traction by up to 71%. Regarding stiffness, the incorporation of EO also showed a decrease, with modulus of elasticity values lower than those obtained with pure material: 58% lower for CICA, 47% and 72% for MCI and MCA, respectively. The decrease of the modulus of elasticity is due to the plasticizing action of EO. The decrease of the modulus of elasticity is due to the plasticizing action of EO.

The addition of EO blends caused a reduction in stiffness and tensile strength compared to pure PHB. Result also found by Arrieta et al.<sup>(48)</sup> with the addition of D-limonene in PLA/PHB blends and the incorporation of EO of oregano into PLA films<sup>(49)</sup>. The addition of eugenol in PHB films also resulted in reduced crystallinity and tensile strength<sup>(18)</sup>.

### **Acknowledgments:**

The authors would like to acknowledge CNPq/MCTI and CAPES/MEC for financial support and also PHB Industrial S.A. for the polymer donation.

## References

1. Arrieta MP, Castro-López MadM, Rayón E, Barral-Losada LF, López-Vilariño JM, López J, et al. Plasticized poly (lactic acid)–poly (hydroxybutyrate)(PLA–PHB) blends incorporated with catechin intended for active food-packaging applications. *J Agric Food Chem.* 2014;62(41):10170-80.
2. Sn B, G S. Need for Bioplastics and Role of Biopolymer PHB: A Short Review. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology.* 2016;07(02).
3. Bugnicourt EC, P.; Lazzeri, A.; Alvarez, V. Polyhydroxyalkanoate (IGGUI et al.): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym. Lett.* 2014, 8(11), 791-808.
4. S de O Patrício P, Pereira FV, dos Santos MC, de Souza PP, Roa JP, Orefice RL. Increasing the elongation at break of polyhydroxybutyrate biopolymer: Effect of cellulose nanowhiskers on mechanical and thermal properties. *Journal of Applied Polymer Science.* 2013;127(5):3613-21.
5. Iggui K, Le Moigne N, Kaci M, Cambe S, Degorce-Dumas J-R, Bergeret A. A biodegradation study of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/organoclay nanocomposites in various environmental conditions. *Polymer Degradation and Stability.* 2015;119:77-86.
6. Wellen RM, Rabello MS, Fechine GJ, Canedo EL. The melting behaviour of poly (3-hydroxybutyrate) by DSC. Reproducibility study. *Polymer Testing.* 2013;32(2):215-20.
7. Casarin SA, Agnelli JA, Malmonge SM, Rosário F. Blendas PHB/copoliésteres biodegradáveis: biodegradação em solo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2013;23(1):115-22.
8. Correa JP, Molina V, Sanchez M, Kainz C, Eisenberg P, Massani MB. Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin. *Food Packaging and Shelf Life.* 2017;11:31-9.
9. Anbukarasu P, Sauvageau D, Elias A. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. *Scientific reports.* 2015;5:17884.
10. Machado ML, Pereira NC, Miranda LFd, Terence MC, Pradella JG. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2010;20(1).
11. Brigham CJ, Sinskey AJ. Applications of polyhydroxyalkanoates in the medical industry. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries.* 2012;1(1):52-60.
12. Bonartsev A, Myshkina V, Nikolaeva D, Furina E, Makhina T, Livshits V, et al. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymers-natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* 2007;1:295-307.
13. Bucci D, Tavares L, Sell I. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer testing.* 2005;24(5):564-71.



14. Atarés L, Chiralt A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in food science & technology*. 2016;48:51-62.
15. Viuda-Martos M, El Gendy AE-NG, Sendra E, Fernandez-Lopez J, Abd El Razik K, Omer EA, et al. Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(16):9063-70.
16. Urbankova M, Hrabalíková M, Poljansek I, Miskolczi N, Sedlarik V. Antibacterial polymer composites based on low-density polyethylene and essential oils immobilized on various solid carriers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015;132(47).
17. Alboofetileh M, Rezaei M, Hosseini H, Abdollahi M. Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. *Food Control*. 2014;36(1):1-7.
18. Narayanan A, Ramana KV. Synergized antimicrobial activity of eugenol incorporated polyhydroxybutyrate films against food spoilage microorganisms in conjunction with pediocin. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2013;170(6):1379-88.
19. Oussalah M, Caillet S, Salmieri S, Saucier L, Lacroix M. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. *Journal of food protection*. 2007;70(4):901-8.
20. Souza A, Goto G, Mainardi J, Coelho ACV, Tadini CC. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT-Food Science and Technology*. 2013;54(2):346-52.
21. Bahram S, Rezaei M, Soltani M, Kamali A, Ojagh SM, Abdollahi M. Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. *Journal of Food Processing and preservation*. 2014;38(3):1251-8.
22. Nairetti D, Mironescu M, Tita O. Antimicrobial activity of active biodegradable starch films on pathogenic microorganisms. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2014;19(1):75.
23. Pires C, Ramos C, Teixeira B, Batista I, Nunes M, Marques A. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*. 2013;30(1):224-31.
24. Yanwong S, Threepopnatkul P, editors. Effect of peppermint and citronella essential oils on properties of fish skin gelatin edible films. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*; 2015: IOP Publishing.
25. Wang Y, Xia Y, Zhang P, Ye L, Wu L, He S. Physical Characterization and Pork Packaging Application of Chitosan Films Incorporated with Combined Essential Oils of Cinnamon and Ginger. *Food and Bioprocess Technology*. 2016;3(10):503-11.
26. 2015;35(1). CCaLSIPsfADSTTEAS-M-ACaLSIJ.

27. ASTM D882 (2012). Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting (D882-88). Annual book of ASTM standards P, USA: American Society for Testing and Materials. <astm\_d882.pdf>.
28. Leceta I, Guerrero P, De la Caba K. Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate polymers*. 2013;93(1):339-46.
29. Brown N. *Plastics in food packaging: properties: design and fabrication*: CRC Press; 1992.
30. Silverstein R, Webster F, KIEMLE D. *Espectrometria no infravermelho*. ALENCASTRO, RB (Trad) *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 1994;5.
31. Coltro L, Buratin AEP. Garrafas de PET para óleo comestível-avaliação da barreira à luz. *Polímeros Ciência e Tecnologia*. 2004;14:206-11.
32. Andriati SENTANIN M, Rodriguez AMAYA DB. Teores de carotenóides em mamão e pêsego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2007;27(1).
33. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. 2001.
34. Scott KJ. Detection and measurement of carotenoids by UV/VIS spectrophotometry. *Current protocols in food analytical chemistry*. 2001.
35. Auras R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular bioscience*. 2004;4(9):835-64.
36. Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*. 2012;134(3):1571-9.
37. Atarés L, De Jesús C, Talens P, Chiralt A. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*. 2010;99(3):384-91.
38. Rech CR, Martelli SM, Brabes KCdS. Antimicrobial Analysis and Characterization of P (3HB) Films Containing Essential oils. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*. 2018;10(1):9-13.
39. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 2012;17(4):3989-4006.
40. Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*. 2007;21(10):989-94.
41. Burgos N, Armentano I, Fortunati E, Dominici F, Luzi F, Fiori S, et al. Functional Properties of Plasticized Bio-Based Poly (Lactic Acid) \_Poly (Hydroxybutyrate)(PLA\_PHB) Films for Active Food Packaging. *Food and Bioprocess Technology*. 2017;10(4):770-80.

- 42.Requena R, Jiménez A, Vargas M, Chiralt A. Poly [(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)] active bilayer films obtained by compression moulding and applying essential oils at the interface. *Polymer International*. 2016;65(8):883-91.
- 43.Armentano I, Fortunati E, Burgos N, Dominici F, Luzi F, Fiori S, et al. Processing and characterization of plasticized PLA/PHB blends for biodegradable multiphase systems. *Express Polymer Letters*. 2015;9(7).
- 44.Mottin AC, Ayres E, Oréface RL, Câmara JJD. What changes in poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) when processed as electrospun nanofibers or thermo-compression molded film? *Materials Research*. 2016;19(1):57-66.
- 45.Bazzo GC, Lemos-Senna E, Gonçalves M, Pires ATN. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly (hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2008;19(5):914-21.
- 46.Cocero MJ, Martín Á, Mattea F, Varona S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: fundamentals and applications. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2009;47(3):546-55.
- 47.Passador FR, Travain DR, Backes EH, Ruvolo Filho AC, Pessan LA. Nanocompósitos de Blendas HDPE/LLDPE e OMMT–Parte II: Avaliação das Propriedades Térmica, Óticas e de Transporte a Gases. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2013;23(6).
- 48.Arrieta MP, López J, Hernández A, Rayón E. Ternary PLA–PHB–Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. *European Polymer Journal*. 2014;50:255-70.
- 49.Javidi Z, Hosseini SF, Rezaei M. Development of flexible bactericidal films based on poly(lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. *LWT - Food Science and Technology*. 2016;72:251-60.

## Figure Captions

**Fig. 1** PHB films incorporated with EO blends. a) Melaleuca and cinnamon (MCA); b) Melaleuca and citronella (MCI); c) Citronella and cinnamon (CICA); d) Pure PHB.

**Fig. 2** UV-vis spectra of PHB/OE's blends.

**Fig. 3** Transmittance of films incorporated with blends of EO's in wavelength range characteristic of anthocyanins and carotenoids.

**Fig. 4** Antimicrobial activity of PHB films incorporated with EO blends. a) *Staphylococcus aureus* ATCC 19093; b) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; c) *Aspergillus niger* ATCC 6275.

**Fig. 5** X-ray diffraction of blends of EO's incorporated in PHB.

**Fig. 6** Influence of the addition of EO's blends on the degree of crystallinity of PHB films.

**Fig. 7** DSC curves obtained for the PHB films incorporated with EO blends.

**Fig. 8** TGA curve of PHB films embedded with EO blends.

**Fig. 9** A) DTG curve of PHB films embedded with EO blends. B) First stage of degradation.

## Table Titles

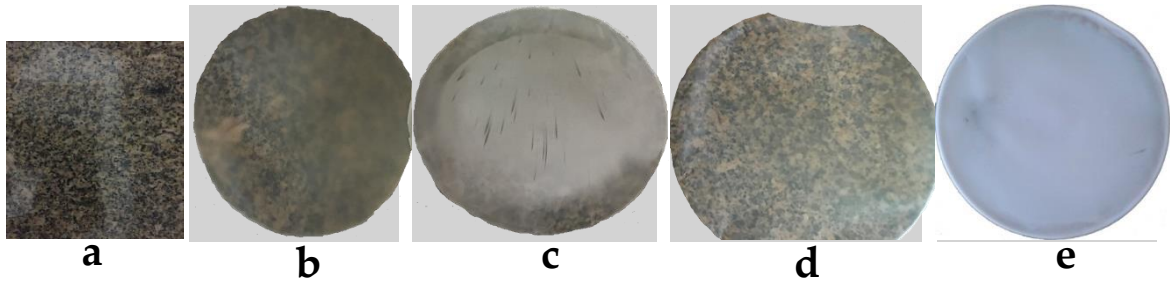
**Table 1.** Composition of PHB films incorporated with OE

**Table 2.** Antimicrobial activity of PHB films.

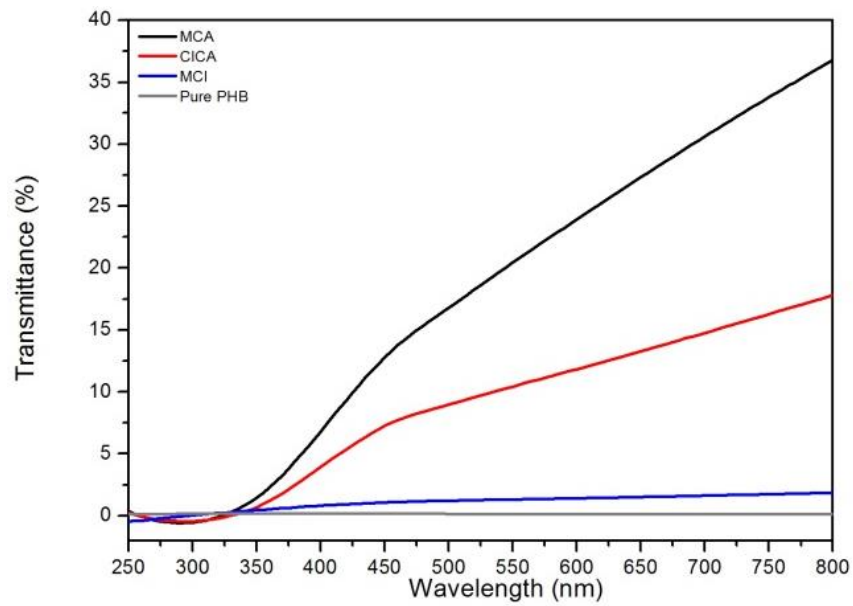
**Table 3.** Thermal properties obtained from TGA and DSC heating curves for PHB films containing essential oil blends.

**Table 4.** Mechanical parameters obtained from tensile tests of polymer films blends PHB/OE's\*.

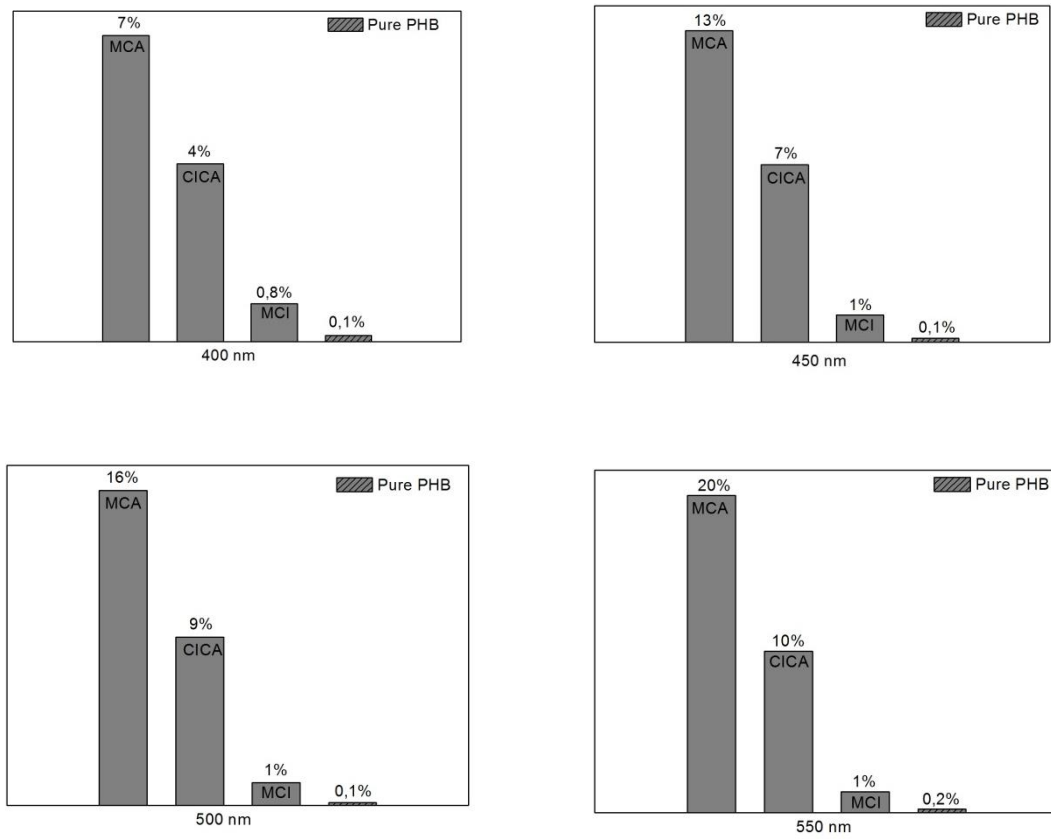
## List of Figures



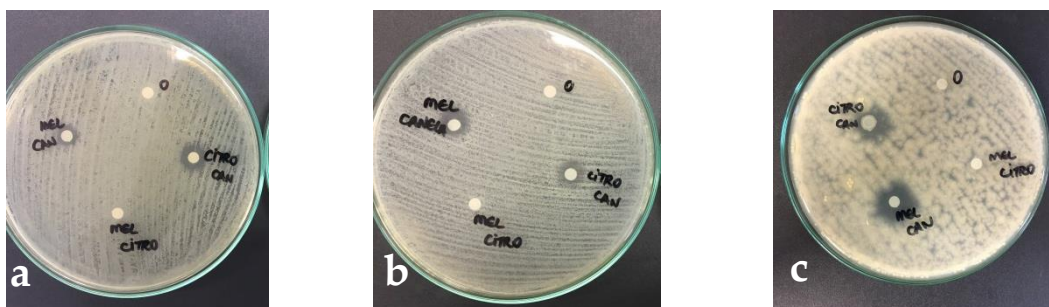
**Fig. 1** PHB films incorporated with OE blends. a) Empty bench; b) Melaleuca and cinnamon (MCA); c) Melaleuca and citronella (MCI); d) citronella and cinnamon (CICA); e) pure PHB.



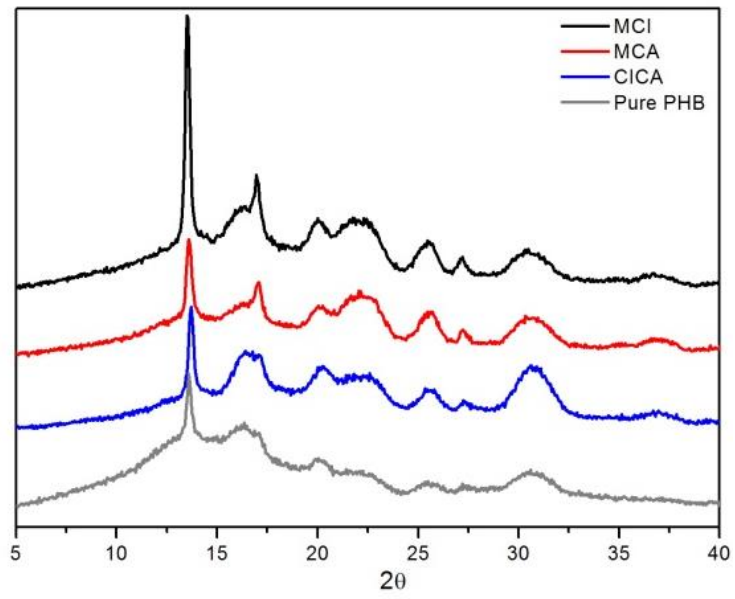
**Fig. 2** UV-vis spectrum of PHB/EOs blends.



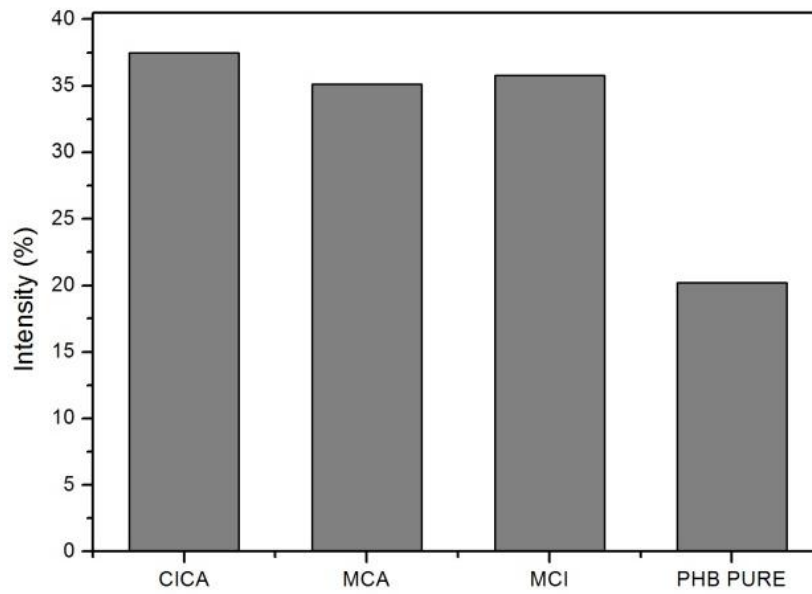
**Fig. 3** Transmittance of films incorporated with blends of EO's in wavelength range characteristic of anthocyanins and carotenoids.



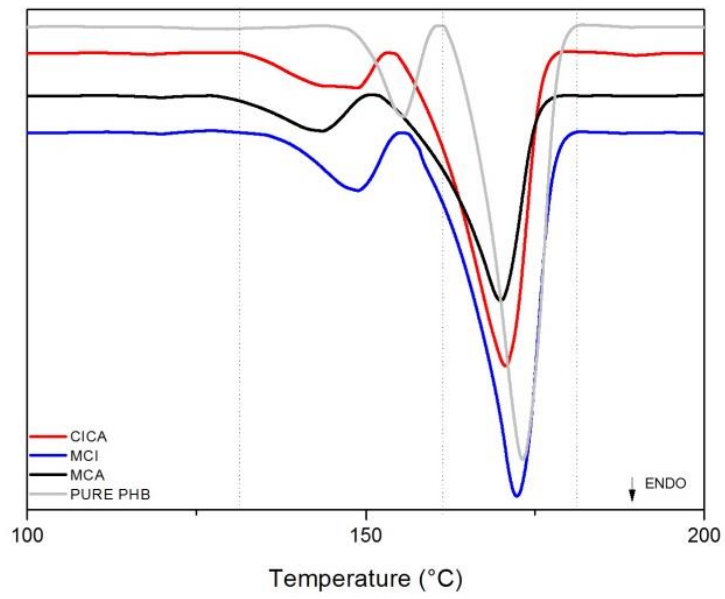
**Fig. 4** Antimicrobial activity of PHB films incorporated with EO blends. a) *Staphylococcus aureus* ATCC 19093; b) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; c) *Aspergillus niger* ATCC 6275.



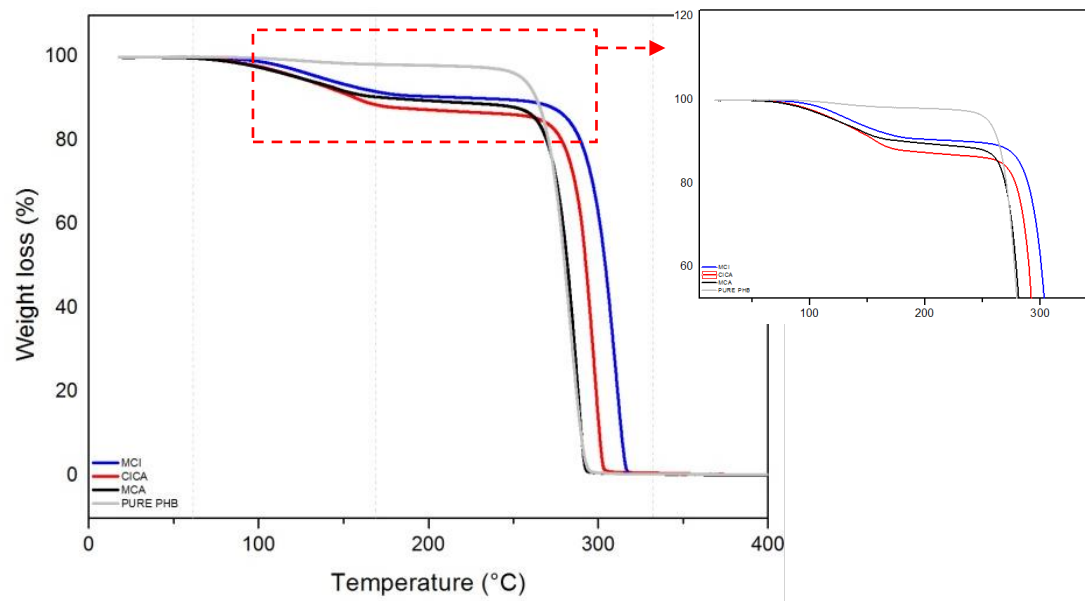
**Fig. 5** X-ray diffraction of EO mixtures incorporated into PHB.



**Fig. 6** Influence of the addition of EO blends on the degree of crystallinity of PHB films.

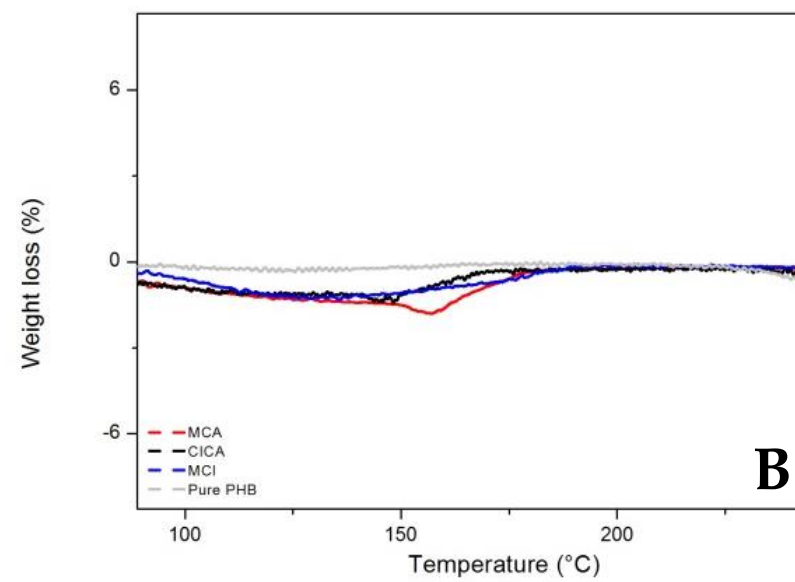
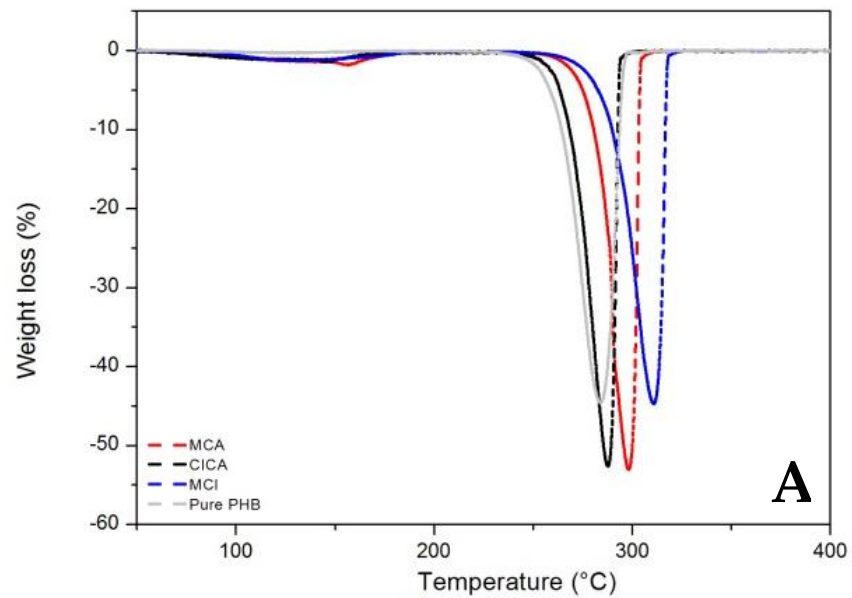


**Fig. 7** DSC curves obtained for PHB films with EO blends.



**Fig. 8** Thermogravimetric curve of PHB films containing EO blends.





**Fig. 9** A) DTG curve of films incorporated with EO blends. B) First stage of degradation.

## List of Tables

**Table I.** Composition of PHB films incorporated with OE

Sample code	<i>Melaleuca alternifolia</i> (g/100gPHB)	<i>Citronella winterianus</i> (g/100gPHB)	<i>Cinnamomun cassia</i> (g/100gPHB)
PHB/MCI	15	15	0
PHB/MCA	15	0	15
PHB/CICA	0	15	15

MCI: melaleuca + citronella; MCA: melaleuca + cinnamon; CICA: citronella + cinnamon

**Table II.** Antimicrobial activity of PHB films.

Microorganisms	Average size of inhibition halos (AURIEMMA et al.)			
	Pure/PHB	PHB/MCI	PHB/MCA	PHB/CICA
<i>Salmonella</i> sp. ATCC 13076	-	-	4,00±1,73	2,00±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	3,50±0,70	2,00±0,00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19093	-	-	4,00±2,64	3,00±1,73
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	3,66±1,15	5,00±1,00
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	-	-	10,00±0,00	7,50±3,53
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	3,00±0,00	3,00±0,00

MCI: melaleuca + citronella; MCA: melaleuca + cinnamon; CICA: citronella + cinnamon.

**Table III.** Thermal properties obtained from TGA and DSC heating curves for PHB films containing essential oil blends.

Sample	T <sub>onset</sub> <sup>1</sup> (°C)	T <sub>endset</sub> <sup>1</sup> (°C)	T <sub>onset</sub> <sup>2</sup> (°C)	T <sub>endset</sub> <sup>2</sup> (°C)	T <sub>m</sub> <sup>1</sup> (°C)	ΔH <sub>m</sub> <sup>1</sup> (J/g)	T <sub>m</sub> <sup>2</sup> (°C)	ΔH <sub>m</sub> <sup>2</sup> (J/g)	X <sub>c</sub> (%)
Pure PHB	97	149	255	295	155.7	9.0	173.1	60.9	46.2
CICA	91	168	272	304	149.0	5.8	170.6	55.7	40.7
MCI	96	176	279	317	149.0	7.6	172.3	62.3	46.2
MCA	91	157	260	292	143.7	5.8	170.0	37.0	28.3

T<sub>onset</sub> = critical weight loss temperatures; T<sub>m</sub> = melting temperature; ΔH<sub>m</sub> = enthalpy of fusion; X<sub>c</sub> = degree of crystallinity; <sup>1</sup>Peak 1; <sup>2</sup>Peak 2.

**Table IV.** Mechanical parameters obtained from tensile tests of polymer films blends PHB/EO's\*.

Sample	Tensile stress (MPa)	Specific deformation (%)	Modulus of elasticity (MPa)
PHB	11,10 <sup>a</sup> ± 0,66	1,82 <sup>a,c</sup> ± 0,47	1030 <sup>a</sup> ± 84
CICA	6,93 <sup>b</sup> ± 0,31	6,95 <sup>b</sup> ± 0,95	429 <sup>b</sup> ± 41
MCI	4,60 <sup>c</sup> ± 0,54	2,03 <sup>c</sup> ± 0,64	541 <sup>c</sup> ± 31
MCA	3,23 <sup>d</sup> ± 0,29	3,88 <sup>d</sup> ± 0,56	286 <sup>d</sup> ± 22

\*Equal letters in the same column indicate that there was no significant difference (p < 0.05).

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

O desenvolvimento de filmes de PHB puro ou incorporado com óleos essenciais e a avaliação de suas propriedades realizado neste trabalho, permitiram algumas conclusões que são apresentadas a seguir:

- Foi possível desenvolver filmes de PHB incorporados com OEs e sua aplicação como embalagem de alimento ou biomaterial pode ser considerada;
- Os filmes contendo OE de melaleuca e citronela, sozinhos ou combinados, não apresentaram atividade antimicrobiana. No entanto, apresentaram maior estabilidade térmica do que os incorporados com outras misturas de óleos, aumentando a janela de processamento do polímero;
- Os filmes contendo a combinação MCA e CICA apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos avaliados;
- Quanto ao estudo da biodegradação, observou-se que os filmes com maior concentração de eugenol foram mais ativos quanto à atividade antimicrobiana e apresentaram maior taxa de degradação no solo. Os filmes enterrados em solo agrícola apresentaram degradação maior que nos demais solos devido à disponibilidade maior de macronutrientes para o crescimento microbiano neste solo;
- A adição de OE aumentou a estabilidade térmica do polímero e, conseqüentemente, o grau de cristalinidade, mas diminuiu sua resistência e rigidez devido a ação plastificante do óleo.

Diante das conclusões apresentadas, outros estudos podem ser feitos para dar continuidade a este trabalho. Dentre as principais sugestões que podem ser realizadas em trabalhos futuros, cita-se:

- a) A avaliação da vida de prateleira de alimentos embalados em filmes de PHB contendo OE;
- b) Teste *in vivo* dos filmes incorporados com blendas de OEs;
- c) Testar micro-organismos relacionados a inflamações de pele;
- d) Análise da adesão microbiana (biofilme) em filmes antimicrobianos de PHB, e;
- e) Desenvolvimento de produtos ou dispositivos de uso farmacêutico ou biomédico.