

# **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE AMIDO DE MANDIOCA/QUITOSANA, REFORÇADOS COM FIBRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

FRANCO, Paula Consoli Ireno, FARIA, Mary Leiva, BILCK, Ana Paula,  
MENEGON, Elaine Amorim Soares

*paulaconsolif@hotmail.com, ap.bilck@gmail.com, eamorim@femanet.com.br,  
ml.faria@uol.com.br*

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo verificar a influência da quitosana nas propriedades mecânicas e de barreira da blenda polimérica amido/quitosana/fibra de cana-de-açúcar, bem como na atividade antimicrobiana destes filmes contra *E. coli*. Os filmes foram preparados pela técnica de “casting” e produzidos a partir de uma solução de 3% de amido, com adição de 15g de fibra/100g de amido e 0,25g; 0,5g e 1,0g de quitosana/100g solução filmogênica, empregando glicerol como plastificante. Os filmes foram caracterizados quanto à espessura, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água (PVA) e isotermas de sorção. A adição de quitosana à blenda amido/fibra de cana-de-açúcar melhorou as propriedades mecânicas dos filmes, entretanto, não melhorou as propriedades de barreira, tornando inviável a aplicação dos filmes em massas de pastel. O teste do halo confirmou a atividade antimicrobiana da quitosana, visto que a *Escherichia coli* se mostrou sensível frente à todas as concentrações da quitosana empregada nos filmes.

**PALAVRAS-CHAVE:** biofilme, amido de mandioca, fibra de cana-de-açúcar, quitosana

**ABSTRACT:** The aim of this work was to verify the influence of chitosan on the mechanical and barrier properties of the polymeric blends of starch/chitosan/sugarcane fiber, as well as on the antimicrobial activity of these films against *Escherichia coli*. The films were prepared by the casting technique and produced from a solution of 3% starch, with addition of 15g of fiber / 100g of starch and 0.25g; 0.5g and 1.0g

chitosan/100g film-forming solution, using glycerol as plasticizer. The films were characterized in terms of thickness, mechanical properties, water vapor permeability (WVP) and sorption isotherms. The addition of chitosan to the starch/sugarcane fiber improved the mechanical properties of the films, however, it did not improve the barrier properties, making it impossible to apply the films in pastry. The halo test confirmed the antimicrobial activity of chitosan, showing the sensitivity of *Escherichia coli* to all concentrations of chitosan used in the films.

**KEYWORDS:** biofilms, cassava starch, sugarcane fiber, chitosan

## **1. Introdução**

O desenvolvimento de embalagens biodegradáveis compostas de polímeros naturais e blendas poliméricas com polímeros biodegradáveis, aplicadas na agricultura e em embalagens alimentícias tem sido atualmente o foco de estudo de vários pesquisadores (BILCK; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; BRANDELERO et al., 2010; SHIRAY et al., 2013).

Devido à atrativa combinação de preço e desempenho, o amido é considerado um dos mais promissores para futuros materiais. Também conhecido como fécula de mandioca ou polvilho doce, o amido de mandioca é utilizado na elaboração de materiais biodegradáveis. É necessário que a estrutura granular do amido seja destruída para que se obtenha uma embalagem termoplástica à base deste polissacarídeo, o que dá origem a uma matriz polimérica homogênea e sobretudo amorfa. Os processos de *casting* e extrusão são os mais utilizados para a produção destas embalagens (MALI et al., 2010a; MACHADO et al., 2014; SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, YAMASHITA, 2010b).

O emprego de filmes produzidos exclusivamente de amido é limitado, devido a algumas restrições de desempenho como baixa resistência mecânica e alta hidrofobicidade em ambientes com elevada umidade relativa. Estes fatores conduzem a obtenção de materiais quebradiços e higroscópicos. Esta limitação, entretanto, pode ser superada pelo emprego de fibras naturais, de origem vegetal, proveniente de resíduos da

agroindústria, as quais são utilizadas como materiais de reforço de matrizes poliméricas de amido. Esta adição leva à formação de compósitos poliméricos que apresentam melhores propriedades mecânicas e maiores resistência à umidade, além de diminuir os custos e aumentar a biodegradabilidade (DEBIAGI et al., 2012; SOUZA; SILVA; DRUZIAN, 2012).

Também com a finalidade de melhorar as propriedades físicas e funcionais de filmes de amido, blendas com outros biopolímeros ou compostos antimicrobianos tem sido proposto. A quitosana, um biopolímero obtido pela desacetilação da quitina, devido as suas características biológicas únicas, incluindo biodegradabilidade e não toxicidade tem apresentado várias aplicações seja sozinha ou em blendas com outros produtos naturais (amido, gelatina, alginatos) (KONG et al., 2010). É um polissacarídeo catiônico, com uma excelente habilidade de formar filmes, além de possuir um grande potencial como material de embalagem antimicrobiano devido à sua atividade antimicrobiana e não toxicidade (SÁNCHEZ-GONZÁLES et al., 2010; LIU et al., 2004). De acordo com Silva, Santos e Ferreira. (2006), “dentre as inúmeras características que distinguem quitina e quitosana dos demais polissacarídeos destaca-se a atividade antimicrobiana.

As embalagens ativas têm sido utilizadas em uma variedade de produtos, como pães, biscoitos, bolos, pizzas, massas frescas, queijos, carnes, frutas, entre outros. As características como boa aparência, preparo rápido e sabor agradável são fatores que têm proporcionado às massas frescas uma aceitação cada vez maior no mercado, passando a fazer parte do hábito alimentar, havendo, conseqüentemente, uma tendência à modernização do setor. Esse tipo de produto apresenta alta perecibilidade, havendo a necessidade de adição de conservadores para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes. A embalagem antimicrobiana é uma forma promissora de embalagem ativa (BERTAN, 2008; MORAES et. al, 2011).

Em trabalho anterior realizado por este grupo de pesquisa, filmes produzidos de amido de mandioca, plastificados com glicerol e com a adição de 15% fibras de cana de açúcar (F15) levaram à formação de compósitos poliméricos que, embora tenham perdido resistência à tração, apresentaram boas propriedades de barreira. Contudo, ensaios em massa de pastel indicaram que os filmes ainda se apresentavam bastantes higroscópicos para serem empregados como embalagem ativa. Vásconez et al (2009) observaram que a adição de quitosana reduziu a permeabilidade ao vapor de água e a solubilidade de filmes de amido. Assim, com a finalidade de se obter filmes com melhores propriedades

físicas e funcionais, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da quitosana nas propriedades mecânicas e de barreira da blenda polimérica amido/quitosana/fibra de cana-de-açúcar, bem como na atividade antimicrobiana destes filmes contra *E. coli*.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Materiais**

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido de uma Usina da região de Assis. O amido de mandioca foi gentilmente cedido pela Tereos Syral (Brasil). O glicerol e a quitosana foram adquiridos da Dinâmica e Sigma, respectivamente. A goma guar foi obtida no comércio da região.

### **2.2. Preparo do bagaço de cana-de-açúcar**

Inicialmente, foi feita a limpeza de 2,0 Kg do bagaço de cana-de-açúcar, em que foram retirados os pedaços maiores e as sujidades, restando ao final 1,60 Kg do bagaço em fragmentos menores. Em seguida, este bagaço foi dividido em frações de 50 g. Cada fração de 50 g foi adicionada em um Becker de 2.000 mL com 1500 mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 70 °C e mantidas nesta temperatura por 3 horas sob agitação mecânica constante de 1.000 rpm, trocando a água a cada hora. Em seguida a mistura foi filtrada e as frações foram secas em estufa de circulação de ar (Marconi-MA035) a 60 °C por 48 horas. Depois as fibras foram trituradas em processador. Após a moagem as fibras foram passadas em peneira de 60 mesh e depois em outra peneira de 100 mesh, obtendo-se fibras com um tamanho aproximado de 0,149 milímetros.

### **2.3 Preparação dos biofilmes de fécula de mandioca/quitosana reforçados com fibra de cana-de-açúcar por *casting***

Os filmes foram produzidos pela técnica do tipo *casting*, com amido de mandioca (3 g de amido/100g solução filmogênica), empregando glicerol como plastificante (30g/100g de amido), fibra de cana-de-açúcar (15g/100g de amido), quitosana e goma guar (0,01

g/g amido) para evitar a sedimentação das fibras. Foram realizadas três formulações para os filmes, variando a concentração de quitosana, conforme descrito na tabela 1. A quitosana foi adicionada após a gelatinização. Cada formulação foi completada com água para obter 100g de solução filmogênica. As soluções filmogênicas contendo amido, plastificante, goma guar, fibra e água foram aquecidas de 30 a 95°C, mantidas a 95°C por 10 minutos, sob agitação constante em agitador magnético. Após gelatinização o pH das soluções foi ajustado para 4,0 com ácido acético 50% e adicionou-se a quitosana. Em seguida, cada solução filmogênica foi espalhada em placa de acrílico (10 x 20 cm) e o material foi seco em estufa de circulação de ar (Marconi-MA035) a 40 °C por 20 horas. Para a realização das análises, os filmes foram condicionados por um período de 48 horas, em dessecadores, sob umidade relativa de 53% e temperatura de 25 °C ( $\pm 2$ ).

<b>Formulação</b>	<b>Amido</b> (g/100g de solução filmogênica)	<b>Glicerol</b> (g/100g de amido)	<b>Quitosana</b> (g/100g de solução filmogênica)	<b>Fibra de cana- de-açúcar</b> (g/100g de amido)
FC-F15	3	30	0,0	15
F-0,25	3	30	0,25	15
F-0,50	3	30	0,50	15
F-1,00	3	30	1,00	15

**Tabela 1** – Formulações dos biofilmes de fécula de mandioca/quitosana reforçados com fibra de cana-de-açúcar

## 2.4 Caracterização dos biofilmes

Os filmes foram caracterizados quanto à espessura, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água (PVA) e isothermas de sorção.

### 2.4.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com auxílio do micrometro digital (Starret, Brasil, resolução 0,001). A espessura final foi a média aritmética de 5 medidas aleatórias sobre a área do filme.

#### **2.4.2 Propriedades mecânicas**

Para os testes de tração foi utilizado o texturômetro (Stable Micro System, modelo TA TX2i, Inglaterra) de acordo com o método da *American Society for Testing and Material* (ASTM D-882-02, 2002). As amostras foram cortadas nas dimensões de 50 mm x 25 mm e condicionadas em 53% de Umidade Relativa (UR) (solução saturada de  $Mg(NO_3)_2$  a 25°C, por 48 horas antes da realização dos ensaios. A seguir foram ajustadas às garras pneumáticas do equipamento com distância entre as garras de 30 mm e a velocidade de tração de 50 mm.min<sup>-1</sup>. As propriedades de tração determinadas foram resistência à tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de Young (MPa). Para cada tratamento foram preparados 10 corpos de prova.

#### **2.4.3 Permeabilidade ao vapor de água**

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada gravimetricamente de acordo com o método da ASTM E-96-(00) (2000) com algumas modificações. O material, previamente condicionado por 48 horas em umidade relativa (UR) de 53% (solução saturada de  $Mg(NO_3)_2$ ), foi fixado na abertura circular (60 mm de diâmetro) da cápsula de permeabilidade, empregando-se graxa de silicone para garantir a migração de umidade exclusivamente através do filme. O interior da cápsula foi parcialmente preenchido com  $CaCl_2$  (0% de UR) e o sistema foi introduzido no dessecador contendo solução saturada de NaCl (75% de UR) criando um gradiente de UR para a passagem de vapor de água para o interior da cápsula. Foram realizadas sete pesagens sucessivas, em intervalos de tempo de 24 horas. O ganho de massa (m) foi graficado em função do tempo (t), e então foi determinado o coeficiente angular (m/t) e a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) dada pela Equação 1

$$TPVA = \frac{m}{t} \times \frac{1}{A} \quad [\text{Eq. 1}]$$

Onde **A** é a área de permeação do corpo de prova (m<sup>2</sup>).

Para cada formulação desenvolvida, o ensaio foi realizado em duplicata. A permeabilidade ao vapor de água foi obtida pela Equação 2:

$$PVA = \frac{TPVA \times e}{p_s \times \left( \frac{UR_1 - UR_2}{100} \right)} \quad [\text{Eq. 2}]$$

Onde **e** é a espessura média do corpo de prova (m), **p<sub>s</sub>** pressão de saturação de vapor à temperatura do ensaio (Pa), **UR<sub>1</sub>** é a umidade relativa no interior do dessecador em % e **UR<sub>2</sub>** é a umidade relativa no interior da cápsula em %.

#### 2.4.4 Isotermas de Sorção

As amostras dos filmes foram finamente cortadas e desidratadas e deixados em dessecador contendo CaCl<sub>2</sub> anidro, que manteve a umidade relativa (UR) próxima a 0%. Após este período, as amostras foram colocadas individualmente em um equipamento gerador de isotermas AquaSorp (Decagon Devices, EUA) que opera pelo método de isotermas por ponto de orvalho dinâmico. Uma quantidade de aproximadamente 500 a 800 mg de cada amostra foi colocada no compartimento específico. A varredura no ciclo de adsorção foi realizada na faixa de 0,30 a 0,80 de atividade de água a uma temperatura de 25°C.

#### 2.5 Atividade Antibacteriana dos filmes

Para o preparo do inóculo, a cultura de *Escherichia coli* foi inoculada em TSB (Trypticase soy broth). Após 24 horas de incubação a 37 °C procedeu-se a diluição até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (10<sup>8</sup> micro-organismos mL<sup>-1</sup>). Os meios foram preparados conforme instruções de embalagem. Foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos e distribuiu-se em placas. O plaqueamento foi realizado dentro da capela de fluxo laminar e todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados na autoclave. Com uma pipeta graduada foi adicionado 0,1 mL da bactéria *E. Coli* na superfície da placa contendo meio EMB solidificado e com uma alça de Drigaskl, previamente flambada, foram espalhadas nas placas.

A atividade antibacteriana dos filmes foi realizada pelo método de difusão de disco (MDD). O procedimento também foi realizado dentro da capela de fluxo laminar e todos os materiais utilizados também foram previamente esterilizados na autoclave. Com as placas já inoculadas, os discos dos biofilmes, com 9 mm de diâmetro, foram colocados em cada placa com o auxílio de uma pinça. O teste foi feito em duplicata. Em seguida as placas foram incubadas a 37° C por 24-48 horas. Depois realizou-se a medição dos halos de inibição do crescimento bacteriano.

### 3. Resultados e Discussão

Todos os filmes se apresentaram sem ondulações, rupturas ou fraturas após a secagem. Os filmes apresentaram boa manuseabilidade e depois de serem retirados das placas puderam ser manipulados sem qualquer risco de ruptura.

A espessura dos filmes apresentou pouca variação, principalmente os filmes com quitosana (tabela 2), tendo em vista que os mesmos apresentam a mesma quantidade de fibra de cana de açúcar.

<b>Formulação</b>	<b>Espessura (mm)</b>
FC-F15	0.267 ( $\pm 0.04$ )
F-0,25	0,216 ( $\pm 0,02$ )
F-0,50	0,200 ( $\pm 0,02$ )
F-1,00	0,222 ( $\pm 0,01$ )

**Tabela 2** – Valores de espessura dos filmes

A adição de quitosana melhorou as propriedades mecânicas dos filmes quando comparado ao filme controle (F15) (tabela 3).

<b>Formulação</b>	<b>Resistência Máxima a Tração (MPa)</b>	<b>Alongamento na ruptura (%)</b>	<b>Módulo de Young (MPa)</b>
FC-F15	0,59 ( $\pm 0,1$ )	15,36 ( $\pm 3,5$ )	3,23 ( $\pm 0,5$ )
F-0,25	6,091 ( $\pm 1,3$ )	37,383 ( $\pm 6,1$ )	242,899 ( $\pm 27,5$ )
F-0,50	6,946 ( $\pm 1,2$ )	43,910 ( $\pm 9,2$ )	261,566 ( $\pm 30,7$ )
F-1,00	8,049 ( $\pm 0,7$ )	22,997 ( $\pm 4,4$ )	299,491 ( $\pm 20,1$ )

**Tabela 3** – Propriedades Mecânicas dos Filmes

A adição de quitosana aumentou o alongamento na ruptura dos filmes até a concentração de 0,5% (F-0,50). Nos filmes com 1% de quitosana (F-1,00), o alongamento reduziu praticamente a metade se comparado com o filme com 0,5%, indicando que o aumento de quitosana deixou os filmes mais rígidos, alongando menos. Este resultado corrobora com os valores do Modulo de Young (que mede a rigidez dos filmes) que também teve um aumento expressivo na rigidez nos filmes com 1% de quitosana.

A adição de quitosana, embora tenha melhorado as propriedades mecânicas dos filmes, piorou as propriedades de barreira, aumentando a permeabilidade ao vapor de água quando comparado ao filme controle (FC-F15), conforme pode ser observado na tabela 4.

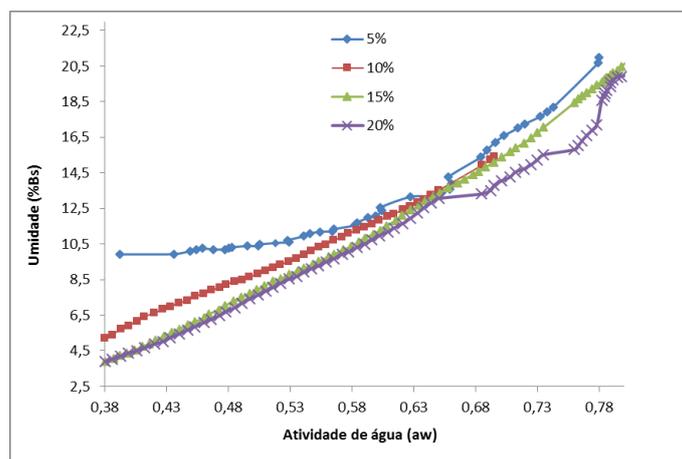
<b>Formulação</b>	<b>Permeabilidade ao vapor de água (g/m.Pa.dia)</b>
FC-F15	0,16 E-06
F-0,25	2,29 E-06
F-0,50	2,52 E-06
F-1,00	1,97 E-06

**Tabela 4** – Permeabilidade ao vapor de água dos filmes (0-75% UR)

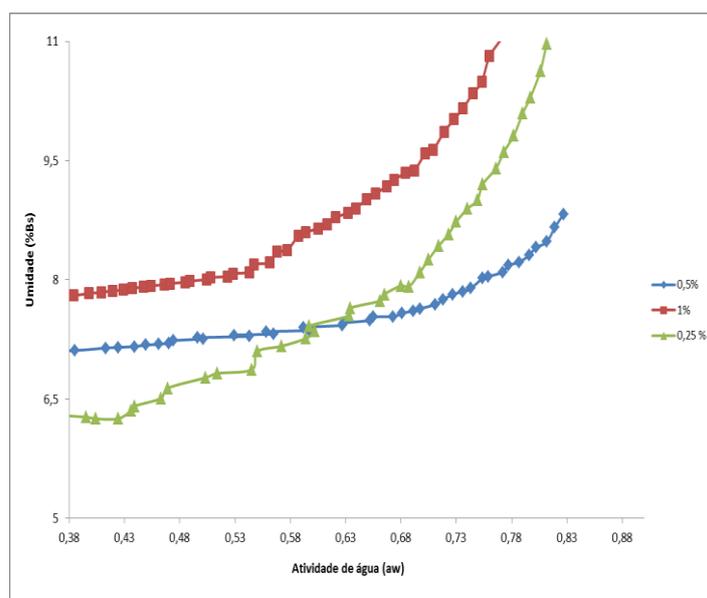
Este resultado indica que interações do tipo ligações de hidrogênio entre quitosana e fibra devem prevalecer sobre as mesmas interações quitosana amido, deixando os filmes com mais grupos-OH livres no amido para interagir com a água, o que aumenta a permeabilidade ao vapor de água. O resultado obtido está de acordo com Vásconez et al. (2009), que também observaram um aumento na permeabilidade ao vapor de água em filmes de amido/quitosana/sorbato de potássio, quando comparados ao filme amido/quitosana. Neste estudo o autor atribui o aumento da permeabilidade ao vapor de água ao fato das interações do tipo ligações de hidrogênio entre sorbato de potássio e quitosana, prevalecerem sobre as mesmas interações entre amido e quitosana.

A subsequente diminuição da PVA é decorrente da alta hidrofobicidade da quitosana quando comparada ao amido, que seria responsável pela existência de menos interações entre a matriz de amido e a água. Isto porque o aumento subsequente de quitosana leva a um aumento das interações quitosana-matriz de amido, reduzindo a disponibilidade de grupos hidrofílicos, diminuindo a interação destes grupos com as moléculas de água, reduzindo, portanto, a taxa de transmissão de vapor de água.

A figura 1 ilustra o gráfico de isoterma de sorção de água a 25°C dos filmes amido/fibra de cana-de-açúcar (a) e o gráfico dos filmes amido/quitosana/fibra de cana-de-açúcar. (b).



(a)



(b)

**Figura 1** - Isotermas de sorção: a) filmes de amido/fibra de cana-de-açúcar variando a concentração de fibra; b) filmes de amido/fibra de cana-de-açúcar 15%, variando a concentração de quitosana

Os filmes compostos de amido/glicerol/fibra adicionados de quitosana (figura 1b) apresentaram menor ganho de água ou sorção de água se comparados com o filme somente composto de 15% fibras, sem a quitosana (figura 1a). O filme composto por 15% de fibras teve ganho de água crescente desde a aw de 0,40 até a aw de 0,78. Nos filmes com a adição de quitosana houve aumento da estabilidade do ganho de água, sendo que o filme composto por 0,5% de quitosana apresentou maior estabilidade na sorção de água, mantendo-se estável até aw de 0,68%

A partir destes resultados, verificou-se que a quitosana foi eficiente no controle da sorção de água dos filmes até a concentração de 0,5 %. Concentrações acima de 0,5% de quitosana possivelmente reduziram a homogeneidade entre os componentes da matriz, aumento a higroscopicidade dos filmes quando submetidos a aw superiores a 0,53%.

A medida da atividade antimicrobiana dos filmes foi realizada pelo método de difusão em disco, que se baseia na determinação dos halos de inibição do crescimento de microrganismos. Nesta metodologia o valor da medida do halo de inibição é proporcional a ação antimicrobiana (MORAIS; GOY; ASSIS, 2009). Os valores dos halos de inibição dos filmes estão apresentados na tabela 5.

<b>Filmes</b>	<b>Inibição (mm) - <i>Escherichia coli</i></b>
F-0,25	12,5
F-0,50	12,5
F-1,00	14,5

Segundo Moreira et. al (2005), halos de 9-14 mm são considerados sensíveis; entre 15-19 mm são considerados muito sensíveis. Os resultados mostram que a *Escherichia coli* foi sensível a todos os filmes que continham quitosana e que o filme com 1% de quitosana (F-1,00) foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana.

Estudos sobre a atividade antimicrobiana da quitosana indicam que esta atividade é decorrente do grupo amino em sua forma catiônica, em pH abaixo de 6. Sob estas condições, uma interação entre quitosana e os componentes predominantemente aniônicos da membrana celular do microorganismo é possível, o que causa mudanças na permeabilidade da membrana plasmática, perda de componentes intracelulares, e finalmente, morte da célula (BERGER; MONTENEGRO STAMFORD; PEREIRA STAMFORD, 2011; KONG et al., 2010). Além desta propriedade da quitosana, Liu et al. (2004) sugerem que a quitosana pode também se ligar à superfície da célula e formar um filme ao redor desta, inibindo o transporte de nutrientes pela membrana plasmática. Kong et al. (2010) também relatam que a quitosana interage com a superfície da célula e altera a permeabilidade celular ou forma uma camada impermeável ao redor da célula, bloqueando assim o transporte de nutrientes essenciais para dentro da célula. Kong et al. (2010) relatam ainda, que a quitosana pode penetrar na parede celular e combinar com o DNA e inibir a síntese do mRNA e transcrição do DNA microbial.

#### **4. Conclusão**

Os resultados levam a concluir que a adição de quitosana à blenda amido/fibra de cana-de-açúcar, melhorou as propriedades mecânicas dos filmes, entretanto, não melhorou as propriedades de barreira, tornando inviável a aplicação dos filmes em massas de pastel.

O teste do halo confirma a atividade antimicrobiana da quitosana, visto que a *Escherichia coli* se mostrou sensíveis frente à todas as concentrações da quitosana empregada nos filmes.

## **Agradecimentos**

À Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA/IMESA) pelo apoio e à Universidade Estadual de Londrina pelas análises realizadas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA**

BILCK, Ana P.; GROSSMANN, Maria. V. E.; YAMASHITA, Fabio. Biodegradable mulch films for strawberry production. *Polymer Testing*, v. 29, 2010, p. 471-476.

BRANDELERO, Renata P. H.; YAMASHITA, Fabio; GROSSMANN, Maria V. E. The effect of surfactant Tween 80 on the hydrophilicity, water vapor permeation, and the mechanical properties of cassava starch and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) blend films. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, 2010. p.1102-1109.

CAMPOS, Adriana de; TEODORO, Kelcilene B. R.; MARCONCINI, José M.; MATTOSO, Luiz H. C.; MARTINS-FRANCHETTI, Sandra M.. Efeito do Tratamento das Fibras nas Propriedades do Biocompósito de Amido Termoplástico/Policaprolactona/Sisal, *Polímeros*, v. 21, nº 3, 2011, p. 217-222.

DEBIAGI, Flávia.; IVANO, Léa Rita P. F. M.; NASCIMENTO, Pedro Henrique A.; MALI, Suzana. Starch biodegradable packaging reinforced with lignocelulosic fibers from agroindustrial wastes. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 1, nº 2, 2012, p. 57-67.

DEBIAGI, Flávia; MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria Vitória Eiras; YAMASHITA, Fábio. Efeito de Fibras Vegetais nas Propriedades de Compósitos Biodegradáveis de Amido de Mandioca Produzidos via Extrusão. *Ciênc. agrotec., Lavras*, v. 34, nº. 6, nov./dez., 2010, p. 1522-1529.

KHARE, A.; DESHCUKH, S. Studies toward production eco-friendly plastics. *Journal of plastic film & sheeting*, v. 22, 2006, p.192 - 211.

MACHADO, Bruna A. S.; REIS, João H. O.; SILVA, Jania B. da; CRUZ, Lindaiá S.; NUNES, Itaciara L. PEREIRA, Fabiano V.; DRUZIAN, Janice I. Obtenção de Nanocelulose da Fibra de Coco Verde e Incorporação em Filmes Biodegradáveis de Amido Plastificados com Glicerol. *Química Nova*, v. 37, nº 8, 2014, p. 1275-1282.

MALI, Suzana; DEBIAGI, Flávia.; GROSSMANN, Maria Vitória Eiras; YAMASHITA, Fábio. Starch, sugarcane bagasse fibre, and polyvinyl alcohol effects on extruded foam properties: A mixture design approach. *Industrial Crops and Products*, v. 32, 2010a, p. 353–359.

MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria Vitória Eiras; YAMASHITA, Fabio. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, nº. 1, 2010b, p. 137-156.

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; VALLE, C.E. del; ROUR, S.I.; Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*. V. 38, 2005, p. 565-570.

MULLER, Carmem M. O.; LAURINDO, João Borges; YAMASHITA, Fabio. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values, *Carbohydrate Polymers*, v. 77, 2009, p. 293–299.

SHIRAY, Marianne.; OLIVATO, Juliana. B; GARCIA, Patricia; MULLER, Carmen; GROSSMANN, Maria Victoria Eiras; YAMASHITA, Fabio. Thermoplastic starch/polyester films: Effects of extrusion process and poly (lactic acid) addition. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, 2013, p. 4112-4117.

SILVA, Rafael; HARAGUCHI, Shirani K.; MUNIZ, Edvani C.; RUBIRA, Adley F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos, *Química Nova*, v. 32, nº 3, 2009, p. 661-671

SOUZA, Carolina Oliveira de; SILVA, Luciana Tosta; DRUZIAN, Janice Izabel, Estudo Comparativo da Caracterização de Filmes Biodegradáveis de Amido de Mandioca Contendo Polpas de Manga e de Acerola, *Química Nova*, v. 35, nº 2, 2012, p. 262-267.

VÁSCONEZ, Maria B.; FLORES, Silvia K.; CAMPOS, Carmem A.; ALVARADO, Juan; GERSCHENSON, Lía N. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coating. *Food Research International*, v. 49, 2009, p. 762-769.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, Laura; GONZÁLES-MARTÍNEZ, Chelo; CHIRALT, Amparo; CHÁFER, Maite. Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*, v. 98, 2010, p. 443-452.

SILVA, Hélio S. R. Costa; SANTOS, Kátia S. C. R. Dos; FERREIRA, Elizabeth I. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços, *Química Nova*, v. 29, nº 4, 2006, p. 776-785.

MORAES, A. R. F.; VIDIGAL, M. C. T. R.; SOARES, N. F. F.; MORAES, L. P.; MELO, N. R.; GONÇALVES, M. P. J. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano aromatizado para aplicação em massa de pastel. *Ciência Rural*, v. 41, nº 3, 2011, p. 537-543.

BERGER, Lucia R. Ramos; STAMFORD, Thayza Ch. Montenegro; STAMFORD, Newton Pereira. Perspectivas para o Uso da Quitosana na Agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v. 12, nº 4, 2011, p. 195-215.

BERTAN, L.C. *Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma*. 2008. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2008.

KONG, Ming; CHEN, Xi Guang; XING, Ke; PARK, Hyun Jin. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of food microbiology*. nº 144, 2010, p. 51-63.

LIU, Hui; DU, Yumin; YANG, Jianhong; ZHU, Huayue. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betaine derivate complex. *Carbohydrate Polymers*, v. 55, 2004, p. 291–297.

MORAIS, Sinara T. B.; GOY, Rejane C.; ASSIS, Odílio B. G.. Avaliação da atividade antimicrobiana de filmes de derivados hidrossolúveis de quitosana. *Anais da I Jornada Científica - Embrapa São Carlos*. 2009.