

## USO DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DO LIMÃO EM BIOFILMES:

### produção e aplicação como revestimento de tomates

Stephanny Letícia Costa Carneiro<sup>1</sup>; Josilene Lima Serra<sup>2</sup>; Jasamim Lemos Fonseca<sup>3</sup>; Gleice Karoline dos Santos Alves<sup>4</sup>

#### RESUMO

A qualidade e a segurança alimentar dos tomates são fatores primordiais para a seleção desse produto pelos consumidores. Por isso, o presente trabalho tem como objetivo produzir, aplicar e avaliar biofilmes ativos produzidos utilizando como base um polissacarídeo natural e o óleo essencial da casca do limão. O biofilme produzido será aplicado em tomates, avaliando-se sua efetividade enquanto filme bioativo com atividade antifúngica. O óleo essencial foi extraído das cascas frescas do limão pelo método de hidrodestilação utilizando o extrator de Clevenger. Determinou-se a densidade relativa e o rendimento do óleo. Os filmes foram obtidos utilizando uma solução aquosa, contendo polissacarídeo (4% p/p), glicerol (50% p/p em relação ao amido) como plastificante e o óleo essencial da casca de limão (2%). A atividade antifúngica foi analisada através do método de microdiluição, na qual foi utilizado o fungo *Aspergillus niger*, para determinar a concentração fungicida mínima do óleo essencial. A partir dessa concentração do óleo foram produzidos os biofilmes e avaliados a atividade antifúngica pelo método de difusão de discos. Os biofilmes foram avaliados quanto aos aspectos visuais, táteis, espessura ( $\delta$ ) e cor. Além disso, foram avaliados a perda de massa dos frutos por gravimetria, pH, acidez titulável (%), sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix) e relação sólidos solúveis e acidez total, nos tempos 0, 3, 7, 9 e 14 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Os resultados indicam que a concentração de 2% do óleo essencial foi a mais eficaz no controle de crescimento do fungo *A. niger*, e, portanto, foi selecionada para aplicação como aditivo bioativo nos biofilmes. Além disso, os filmes de amido de milho apresentaram boas características visuais, táteis e transparência. Os resultados da atividade antifúngica demonstraram que os filmes apresentaram bioatividade frente ao *A. niger*, com atividade fungistática. A aplicação dos biofilmes a base de amido de milho e óleo essencial de limão (AM+OEL), apresentaram bioatividade frente aos coliformes totais, bactérias aeróbias mesófilas, e reduziram o crescimento dos fungos, em relação aos tomates *in natura* armazenados à temperatura ambiente durante 16 dias. Quanto aos parâmetros físico-químicos verifica-se que os frutos revestidos com os filmes AM+OEL retardaram o tempo de senescência dos frutos, prolongando a sua vida útil.

**Palavras-chave:** Filme biodegradável; Bioplástico; Compostos bioativos.

<sup>1</sup> Discente do curso Técnico Integrado em Agroindústria – IFMA, Campus São Luís Maracanã – Maranhão, stephannyleticia615@gmail.com

<sup>2</sup> Orientadora/Professora Dr<sup>a</sup> de Tecnologia em Alimentos – IFMA– Campus São Luís Maracanã – Maranhão, josilene.serra@ifma.edu.br

<sup>3</sup> Estudante do Curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais do Campus Monte Castelo; E-mail: jasamim.fonseca@acad.ifma.edu.com.

<sup>4</sup> Estudante do Curso de Tecnologia em Alimentos do IFMA do Campus Maracanã; E-mail: gleice.alves@acad.ifma.edu.com

## 1 INTRODUÇÃO

As embalagens possuem um papel fundamental na indústria de alimentos, por conterem o alimento, protegerem, preservarem, transportarem, o que ajuda a reduzir perdas e desperdício de alimentos. Além do papel social e informativo sobre os valores nutricionais do alimento (JORGE, 2013; CLAIRE, SARANTÓPOULOS, 2020).

O impacto ambiental gerado por embalagens plásticas é uma grande preocupação por ser derivado do petróleo e não biodegradável. No ano de 2020, 367 milhões de toneladas de plástico foram produzidos mundialmente, sendo a China um dos maiores consumidores de plástico do mundo (PLASTICSEUROPE, 2021). Nesse contexto, estudos sobre o desenvolvimento de embalagens de alimentos utilizando biopolímeros e substâncias bioativas de produtos naturais tem se intensificado.

Os biopolímeros são polímeros capazes de serem decompostos por ação microbiana em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, compostos inorgânicos ou biomassa, contribuindo para a redução dos resíduos sólidos no meio ambiente. Os bioplásticos produzidos a partir de fontes biodegradáveis ou compostáveis, tais como, polilactídeos, amido, gelatina, polihidroxialcanoatos, celulose e outros (MROCZKOWSKA et al., 2021). Os resíduos agroindústrias, também podem ser uma excelente matéria prima para produção de bioplásticos, além disso, uma fonte de compostos biodegradáveis, ricos em compostos bioativos, como as cascas frutas cítricas.

As frutas cítricas são frutas populares ao redor do mundo que ganhou um grande destaque durante o período da pandemia por ser fonte de nutrientes que fortalecem o sistema imunológico. Entretanto, o consumo e o processamento industrial das frutas cítricas geram muitos resíduos, tais como, cascas, sementes e bagaço, o que pode gerar também impactos ambientais e perdas econômicas. Por exemplo, em torno de 50% do peso total do fruto é composto pela casca, o que tornam esse resíduo uma excelente fonte de matéria prima para produção de biofilmes (YUN, LIU, 2022). Recentemente, Yun et al. (2022) verificaram que filmes produzidos com a farinha da casca de frutos cítricos retardaram a oxidação do óleo de milho por ser uma excelente barreira a oxigênio e a luz, além das propriedades antioxidantes.

O tomate (*Lycopersicon esculentum*), em particular, é um fruto muito produzido, que possui um alto valor econômico no mercado e muito utilizado na culinária brasileira,

contudo, o curto tempo de vida de prateleira e a fragilidade desse fruto são fatores limitantes que geram perdas pós-colheita. De fato, Lana et al. (2006) verificaram que o manuseio pós-colheita inadequado desse fruto, bem como, o uso de embalagens mal dimensionadas, geram cerca de 67,8% de danos a esse produto.

Outro fator limitante é alta atividade de água de frutas, que aumentam a perecibilidade desse produto e reduz a sua vida de prateleira, devido a contaminação por microrganismos deteriorantes. Frutas e hortaliças, são importantes veículos de transmissão de doenças infecciosas, se mal higienizados. Espécies de microrganismos contaminantes em frutas e hortaliças já foram identificados, entre eles destacam-se a *Escherichia coli* O 157:H7, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Byssoschlamys*, *Aspergillus flavus* entre outros (ICMSF, 2005).

O uso de biofilmes contendo óleos essenciais com atividade antimicrobiana é uma estratégia para o aumento da vida de prateleira de frutos, como o tomate. Rita et al. (2011) demonstraram que houve um aumento da vida de prateleira de tomates com aplicação de biofilmes desenvolvidos com óleos essenciais de sálvia e manjerona, constatando uma eficiência na inibição do crescimento de bactérias mesófilas.

Com base no exposto, verifica-se que é importante desenvolver estudos que promovam melhorias na conservação pós-colheita de frutos, como o tomate, bem como, a aplicação de produtos sustentáveis e de baixo custo. Com o desenvolvimento deste estudo pretende-se estudar a aplicação do óleo essencial extraído da casca do limão, um resíduo gerado pela indústria de alimentos para desenvolvimento de biofilmes biodegradáveis, produzidos de um polissacarídeo, como amido de milho, e posterior aplicação como revestimento de tomate.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Extração do óleo essencial da casca do limão**

O óleo essencial foi extraído das cascas frescas do limão pelo método de hidrodestilação utilizando o extrator de Clevenger, conforme Santos et al. (2004).

### **2.2 Atividade antifúngica do óleo essencial da casca do limão e dos filmes**

Para atividade antifúngica foi utilizado o fungo *Aspergillus niger*, como microrganismo alvo. A suspensão fúngica foi previamente preparada em caldo YPG (Extrato de levedura, Peptona e Glicose). Essa solução foi inoculada em placas com Ágar Batata Dextrose acidificado com solução de ácido tartárico à 10%. Esse inóculo foi utilizado nos experimentos de determinação da CFM e método de difusão de discos. A concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial do limão foi determinada pelo método de microdiluição em microplacas de 96 poços, utilizando sete diluições seriadas do óleo essencial, Tween 80 e caldo YPG, variando de 8 a 0,125%, conforme método descrito por Calvacanti, Almeida e Padilha (2011). Após a obtenção das diluições nas microplacas, 10 µL do inóculo do fungo foram adicionados aos poços, com posterior incubação das microplacas em estufa à 30°C por 48 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de cada diluição em placas contendo Ágar Batata acidificado, com incubação em estufa à 30°C por 48 horas. Após esse período foi realizado a contagem das placas e a CFM foi considerada nas placas que não houve crescimento do fungo ou tiveram contagens menores que 3 Unidades Formadoras de Colônias (UFC). A atividade antifúngica dos filmes foi avaliada pelo método de difusão de discos conforme referenciado por Souza et al. (2022). O óleo essencial foi adicionado nos discos de papel filtro estéril e posteriormente adicionados nas placas de Agar Batata acidificado inoculadas com o fungo. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 48 horas e posteriormente o crescimento do fungo verificado.

### 2.3 Aplicação dos filmes como revestimento em tomates cereja

A solução filmogênica foi aplicada como revestimento em tomate cereja maduro (coloração vermelha), conforme metodologia adaptada de Almeida (2014), utilizando 4% de amido de milho, 2% de glicerol e 2% de óleo essencial de limão na forma de nanoemulsão. Para avaliação da eficiência dos filmes como revestimento nos tomates, foram realizados 2 tratamentos, contendo 50 frutos em cada tratamento: i) tomates *in natura* sanitizado em solução de hipoclorito de sódio a 300 ppm (Tomate IN) e ii) tomates revestidos com filmes de amido de milho e óleo essencial de limão (Filmes AM +OEL). Os tomates foram avaliados quanto: a perda de peso por gravimetria, pH, acidez titulável (%) e sólidos solúveis (°Brix). Os tomates revestidos foram armazenados em condições

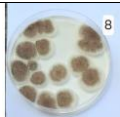
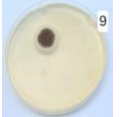
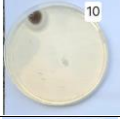
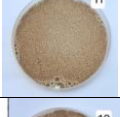



ambientes e analisados nos tempos 0, 2, 7, 14 e 16 dias. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Atividade antifúngica do óleo essencial da casca de limão

O óleo essencial da casca do limão Taiti apresentou atividade fungicida frente ao fungo endofítico *Aspergillus niger* (Tabela 1). A determinação da concentração fungicida mínima foi realizada para identificarmos a melhor concentração para aplicação deste óleo na produção dos filmes, e os resultados indicaram que a menor concentração com atividade antifúngica foi de 2%.

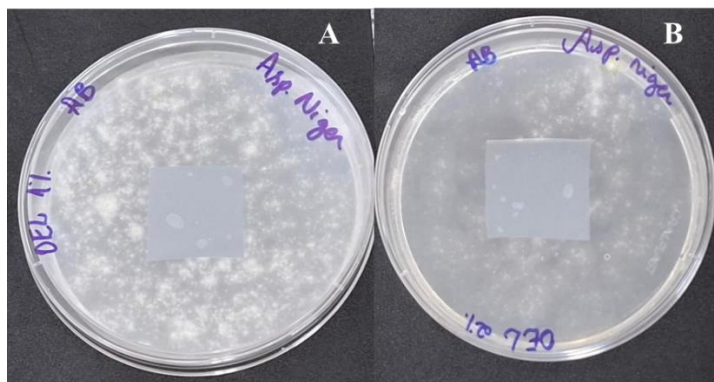
**Tabela 1** - Atividade antifúngica e concentração fungicida mínima do óleo essencial da casca do limão.

Óleo essencial de limão (%)	Concentração (mg/mL)	UFC/ mL		Atividade antifúngica
8	72		13	Fungioestática
4	36		1	Fungicida
2	18		1	CFM
1	9		INC	Resistente
0,5	4,5		INC	Resistente
0,25	2,25		INC	Resistente
0,0125	1,125		INC	Resistente

**Legenda:** CFM: Concentração Fungicida Mínima (Não houve crescimento do fungo ou houve a formação de menos de 3 UFC); Fungioestática (Formação de mais de 3 UFC); INC: Incontável; Resistente (Crescimento normal do fungo).

Segundo Altun e Yapici (2022) a composição química do óleo essencial é um fator determinante para a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Os óleos essenciais que contém aldeídos ou fenóis, como, citral, carvacrol, eugenol ou timol apresentam uma forte atividade antibacteriana, como o óleo essencial de orégano. Em contrapartida, monoterpenos são menos eficientes. O limoneno, gama-terpineno e o beta-pineno pertencem a classe dos monoterpenos, fato que pode justificar a baixa eficiência na inibição das bactérias neste estudo.

Com base nesses resultados foram produzidos filmes com 2% e 1% do óleo essencial da casca de limão Taiti, e constatou-se que os filmes apresentaram atividade fungioestática frente a *Aspergillus niger*, reduzindo o seu crescimento (Figura 1). O filme de contendo 2% do óleo essencial foi mais eficiente na inibição do crescimento do *Aspergillus niger*, e, portanto, essa concentração do óleo foi selecionada para aplicação nos filmes para revestimento dos tomates cereja.



**Figura 1-** Atividade fungioestática dos filmes a base de amido de milho e óleo essencial das cascas de limão adicionado nas concentrações de 1% (A) e 2% (B).

Quanto aos aspectos visuais, táteis e cor verifica-se que o filme de amido de milho apresentou uma boa continuidade, uma excelente homogeneidade, transparência, flexibilidade e resistência. Os resultados da diferença de cor dada por  $\Delta E$  mostram que o

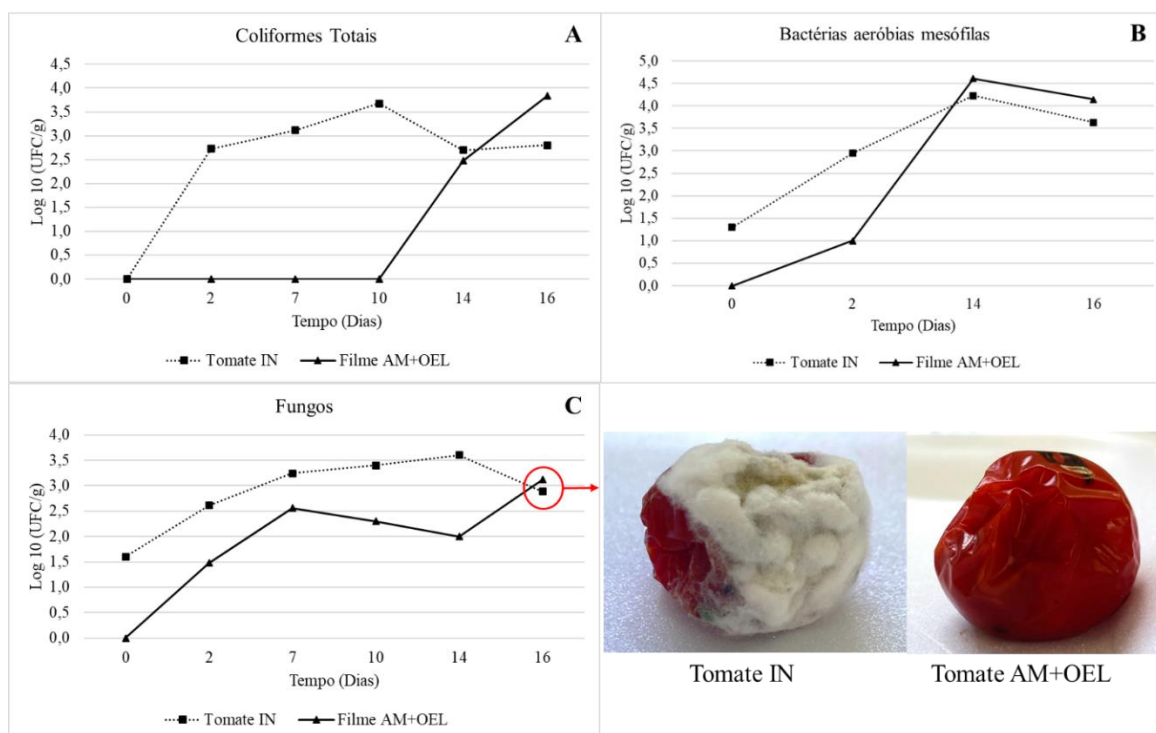
filme de amido de milho se destaca para uma posterior embalagem de alimentos que requerem uma melhor visualização do alimento embalado.

**Tabela 1** - Resultados dos parâmetros de aspectos visuais, táteis e cor dos filmes de amido.

Parâmetros	Filme de amido de milho
Continuidade	+++
Homogeneidade	++++
Transparência	+++
Flexibilidade	++++
Resistência	+++
Espessura (mm)	0,18 ± 0,08
ΔE	3,00

### 3.2 Aplicação dos filmes bioativos com amido de milho e óleo essencial de limão como revestimento em tomates cereja

O uso de revestimento com filme a base do amido de milho e óleo essencial da casca do limão Taiti reduziu os níveis de contaminação dos tomates revestidos com o filme AM+OEL por coliformes totais (até o 10º dia) e bactérias aeróbias mesófilas (até o 2º dia) conforme observado nos gráficos apresentados na Figura 2.



**Legenda:** Tomate IN (Tomate in natura após sanitização, sem revestimento), Filme AM+OEL (Tomate revestido com filme de amido de milho e óleo essencial de limão).

**Figura 2-** Contagem de microrganismos nos tomates *in natura* (IN) e revestidos com filme bioativo de amido de milho e óleo essencial de limão (AM+OEL) durante 16 dias de armazenamento na temperatura ambiente. A) Coliformes totais, B) Bactérias aeróbias mesófilas e C) Fungos.

A contaminação por fungos reduziu nos tomates revestidos com os filmes AM+OEL em 1 Log<sub>10</sub> (UFC/g) em comparação aos tomates IN até o 14º dia de armazenamento na temperatura ambiente (média de 27,5°C). Além disso, é possível verificar que os tomates revestidos com os filmes bioativos não apresentaram visualmente crescimento de fungos filamentosos no final do período de armazenamento (16º dia). A redução na contagem dos microrganismos nos tomates AM+OEL comprova a eficácia do óleo essencial da casca de limão no controle do crescimento microbiano e demonstra que esse óleo pode ser utilizado como um aditivo bioativo de baixo custo em filmes poliméricos.

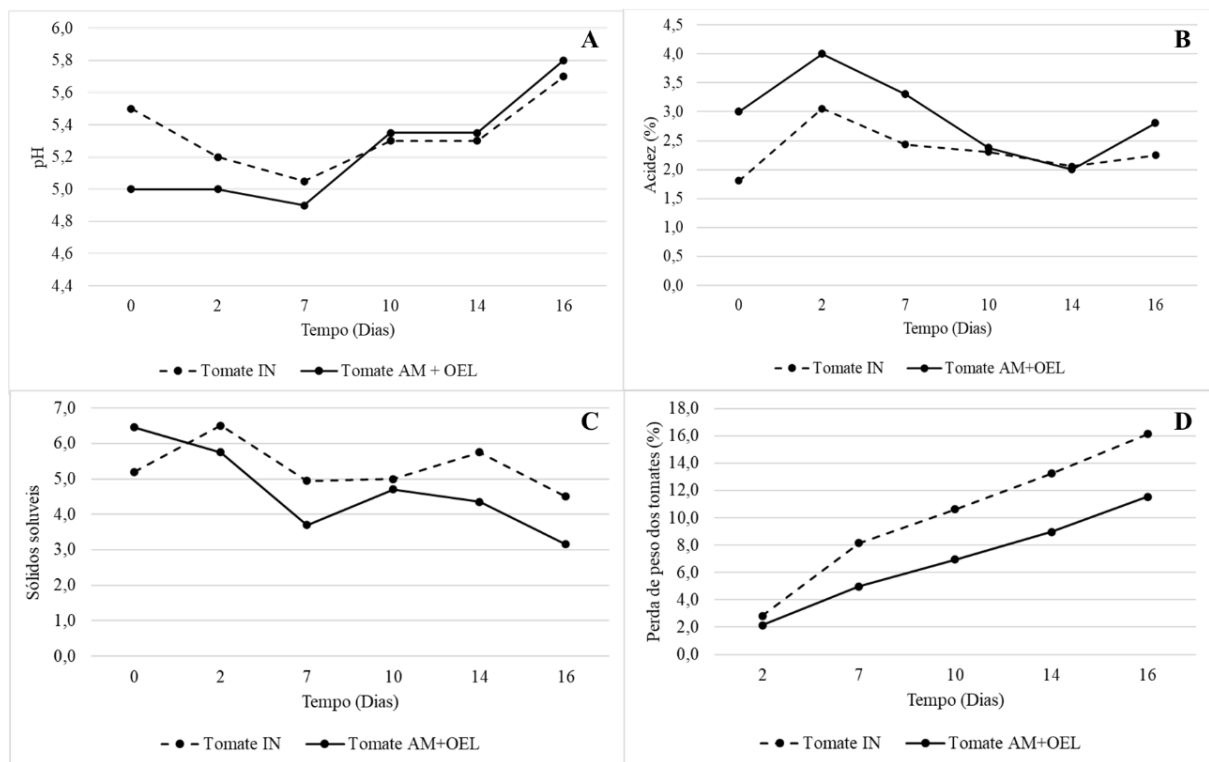
A Figura 3 apresenta os resultados das análises físico-químicas realizadas no tomate *in natura* e nos tomates revestidos com filme bioativo de amido de milho e óleo



essencial da casca de limão Taiti. O pH manteve-se estável até o 7º dia de armazenamento nos tomates revestidos com o filme AM+OEL, variando de 5,0 a 5,8.

A acidez inicial dos frutos indica que as frutas estavam em estágio de maturação, e a partir do 2º dia de armazenamento a acidez reduziu. Almeida (2014) explica que o uso de revestimento na superfície de tomates pode reduzir o processo respiratório dos frutos, devido ao preenchimento parcial dos poros pelo filme e ocasionar um aumento da acidez. Além disso, o aumento da acidez dos frutos pode ocorrer pelo processo de amadurecimento dos tomates que aumenta a formação de ácidos, pela perda de água que favorece o aumento da concentração dos ácidos.

Entre o 2º e o 14º dia de armazenamento houve uma redução do pH, demonstrando que o revestimento não afetou o processo de respiração dos frutos. De fato, observa-se que o conteúdo de sólidos solúveis também reduziu nos tomates revestidos com o filme AM+OEL, variando de 5,8 a 3,2 °Brix.



**Legenda:** Tomate IN (Tomate *in natura*, sem revestimento), Filme AM+OEL (Tomate revestido com filme de amido de milho e óleo essencial de limão).

**Figura 3-** Análises físico-químicas dos tomates *in natura* e revestidos com filme bioativo de amido e óleo essencial de limão: pH (A), teor de acidez (B), sólidos solúveis (C) e perda de peso dos tomates (D).

Os tomates revestidos com os filmes AM+OEL apresentaram menor perda de peso durante 14 dias de armazenamento nas condições ambientes em relação aos tomates IN. A perda de massa de tomates é uma das causas de depreciação desse produto, ocorrendo perda de turgor celular e consequentemente murchamento dos tecidos, tornando o produto inadequado para a comercialização (CHITARRA; CHITARRA, 2005; ALMEIDA, 2014). Os tomates analisados nesse estudo mantiveram valores de perda de massa inferiores a 7%, durante 10 dias de armazenamento em condições ambientes, estando dentro dos padrões recomendados.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O uso do óleo essencial de limão como substância bioativa em filmes com amido de milho mostrou-se eficiente no controle microbiano e no aumento do tempo de prateleira dos tomates cereja e consequentemente, uma alternativa promissora para a indústria de alimentos na redução dos impactos ambientais, por ser um polímero de fonte renovável.

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica, ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão Campus São Luís - Maracanã e a Universidade Federal do Maranhão Campus - Bacanga, pela estrutura dos laboratórios para a concretização dessa pesquisa.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMEIDA, D. M. Tomate revestido com filme de fécula de batata e óleos de sálvia e manjerona. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 4, p. 289 - 296, out-dez, 2014. Disponível em: <http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS>. Acesso em: 20 abr. 2024.

ALTUN, M.; YAPICI, B. M. Determination of chemical compositions and antibacterial effects of selected essential oils against human pathogenic strains. In: **Anais da**

**Academia Brasileira de Ciências.** n. 94, v.1, 2022. DOI 10.1590/0001-3765202220210074

CAVALCANTE, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de Candida. **Revista de Odontologia Brasileira Central**, v. 20, n. 52, 2011.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2nd, Lavras: UFLA, 785p., 2005.

CLAIRE, I. G. L.; SARANTÓPOULOS, R. A. R. (Eds.). **Brasil Pack Trends 2020**. 1. ed. Campinas: ITAL, 2012. 231 p.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganism in foods: Microbiology ecology of food commodities**. 2. Ed. Plenum Publishers, 2005.

JORGE, N. **Embalagens para alimentos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2013. Disponível em: <http://www.santoandre.sp.gov.br/pesquisa/ebooks/360234.PDF>. Acessado em: 21 mar. 2023.

LANA, M. M.; MOITA, A. W.; SOUZA, G. S.; NASCIMENTO, E. F.; MELO, M. F. **Identificação das causas de perdas pós-colheita de tomate no varejo em Brasília-DF**. Brasília : Embrapa Hortaliças, 2006. 25 p.

MROCKZKOWSKA, M.; CULLITON, D.; GERMAINE, K.; NEVES, A. Comparison of Mechanical and Physicochemical Characteristics of Potato Starch and Gelatine Blend Bioplastics Made with Gelatines from Different Sources. **Clean Technologies**. 2021, 3, 424–436. <https://doi.org/10.3390/cleantechnol3020024>

PLASTICSEUROPE. **Plastics – the Facts 2021**. Disponível em: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>. Acesso em: 20/04/2023.

RITA et al. Atividade antimicrobiana de biofilme com óleos essenciais para conservação pós-colheita de tomate cv Rasteiro. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindústria**, v. 05, p. 466-474, 2011. D.O.I: 10.3895/S1981-36862011000100010S1

SANTOS, A. S.; ALVES, S. de M.; FIGUEIRÊDO, J. F. C.; ROCHA NETO, O. G. da. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. Belém-PA: Comunicado Técnico. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27902/1/com.tec.99.pdf>. Acessado em: 22 mar. 2023

SOUZA, F. S., MOUCHREK, A. N., SERRA, J. L., MENDONÇA, C. DE J. S., BORGES, K. R. A., MENDONÇA, S. DE J. R., SANTOS, A. M. C. M., FILHO, V. E. M., & SILVA, F. C. Ocimum campechianum essential oil: chemical composition and antifungal activity against filamentous fungi. **Brazilian Journal of Development**, n. 8, v. 9, 62056–62073, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n9-107>. Acessado em: 26 mar. 2023.

YUN, D.; LIU, J. Recent advances on the development of food packaging films based on citrus processing wastes: A review. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 9, 2022.