
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Jessica Marcos dos Santos

**AVALIAÇÃO DE BIOGEL PRODUZIDO COM
QUITOSANA COM DIFERENTES GRAUS DE
DESACETILAÇÃO NA INCORPORAÇÃO DE
EUGENOL**

Rio Claro - SP
2025

Jessica Marcos dos Santos

**AVALIAÇÃO DE BIOGEL PRODUZIDO COM QUITOSANA COM
DIFERENTES GRAUS DE DESACETILAÇÃO NA INCORPORAÇÃO
DE EUGENOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e
Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Michel Brienzo

Coorientador(a): Melissa Machado Martins

Rio Claro - SP
2025

S237a

Santos, Jessica Marcos

Avaliação de biogel produzido com quitosana com diferentes graus de desacetilação na incorporação de eugenol / Jessica Marcos Santos.

-- Rio Claro, 2025

32 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Michel Brienzo

Coorientadora: Melissa Machado Martins

1. Polissacarídeos. 2. Compostos bioativos. 3. Essências e óleos

essenciais. I. Título.

Jessica Marcos dos Santos

**TÍTULO: AVALIAÇÃO DE BIOGEL PRODUZIDO COM QUITOSANA
COM DIFERENTES GRAUS DE DESACETILAÇÃO NA
INCORPORAÇÃO DE EUGENOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Michel Brienzo

Dra. Rayane Monique Sete da Cruz

Dr. Eddyn Gabriel Solorzano Chavez

Aprovado em: 10 de Novembro de 2025

Assinatura do discente

Assinatura do(a) orientador(a)

Assinatura do(a) coorientador(a)

AGRADECIMENTOS

Primeiro, quero agradecer a minha família: meu pai, Elson, minha mãe, Idalina, e meus irmãos, Elson e Fábio, sem o apoio de vocês eu não teria chegado tão longe, só tenho a agradecer por cada sacrifício feito, e principalmente, por confiarem em mim e não me deixarem desistir. Vocês são os pilares da minha vida, meu lugar de inspiração, e só tenho a agradecer por tudo que já fizeram e fazem por mim.

Agradeço à minha "república" (e aos agregados também), Reptwo, onde morei com pessoas incríveis que me ajudaram muito a passar por todos os momentos, os responsáveis por me mostrarem uma nova visão da vida e das pessoas.

Agradeço também aos meus amigos, que tornaram todo o percurso desafiador da faculdade um processo muito mais leve e divertido, obrigada por serem minha rede de apoio sempre que precisei, espero levar vocês comigo para o resto da vida.

Agradeço à moradia e à permanência estudantil, que sem esses auxílios eu não conseguiria me manter nos estudos. Agradeço à moradia por todas as vivências únicas que tive enquanto moradora.

Agradeço ao Professor Dr. Michel Brienzo, meu orientador, que sempre esteve presente, pela paciência em todo tempo que estive no laboratório, e também agradeço por ser parte do motivo da minha decisão em seguir para a pesquisa acadêmica.

Agradeço ao IPBEN, local de realização desse trabalho, que foi onde eu pude aprender enquanto pesquisadora, além de ter conhecido diversas pessoas maravilhosas que me ajudaram e que me inspiram todos os dias.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - 106739/2025-5.

RESUMO

A desacetilação da quitina é uma etapa fundamental para seu uso (quitosana) como gel ou bioplástico. Atualmente toda quitosana consumida no país é importada e muitos dos produtos não informam o grau de desacetilação. O presente projeto teve como objetivo produzir quitosana com diferentes graus de desacetilação, identificando a influência da desacetilação na formação de bioplástico/biogel e a atividade antimicrobiana contra *Xanthomonas citri*. A quitosana é um polissacarídeo candidato para preparar emulsão com compostos bioativos, para aplicação na agricultura. Uma quitina comercial (com baixo grau de desacetilação) foi submetida a desacetilação com diferentes condições em reator, produzindo quitosana com graus de desacetilação de 54%, 62%, 69% e 76%. Essas quitosanas foram empregadas na formulação de biogel para carrear eugenol. Como resultado, todas as amostras de emulsão apresentaram inibição bacteriana, além da formação de biofilmes translúcidos e homogêneos nos graus de desacetilação de 62%, 69% e 76%, reforçando a relação positiva entre o aumento do grau de desacetilação e a melhoria da qualidade do filme.

Palavras-chave: Polissacarídeo; biogel; compostos bioativos; óleos essenciais.

ABSTRACT

The deacetylation of chitin is a fundamental step for its use (as chitosan) in gels or bioplastics. Currently, all chitosan consumed in the country is imported, and many products do not provide information about the degree of deacetylation. The present project aimed to produce chitosan with different degrees of deacetylation, identifying the influence of deacetylation on the formation of bioplastic/biogel and on the antimicrobial activity against *Xanthomonas citri*. Chitosan is a polysaccharide considered a candidate for preparing emulsions with bioactive compounds for agricultural applications. A commercial chitin (with a low degree of deacetylation) was subjected to deacetylation under different reactor conditions, producing chitosan with degrees of deacetylation of 54%, 62%, 69%, and 76%. These chitosans were used in the formulation of biogel to carry eugenol. As a result, all emulsion samples showed bacterial inhibition, in addition to the formation of translucent and homogeneous biofilms at degrees of deacetylation of 62%, 69%, and 76%, reinforcing the positive relationship between the increase in the degree of deacetylation and the improvement in film quality.

Keywords: Polysaccharide; biogel; bioactive compounds; essential oils.

Title in english: Evaluation of Biogel Produced with Chitosan with Different Degrees of Deacetylation in the Incorporation of Eugenol.

SUMÁRIO

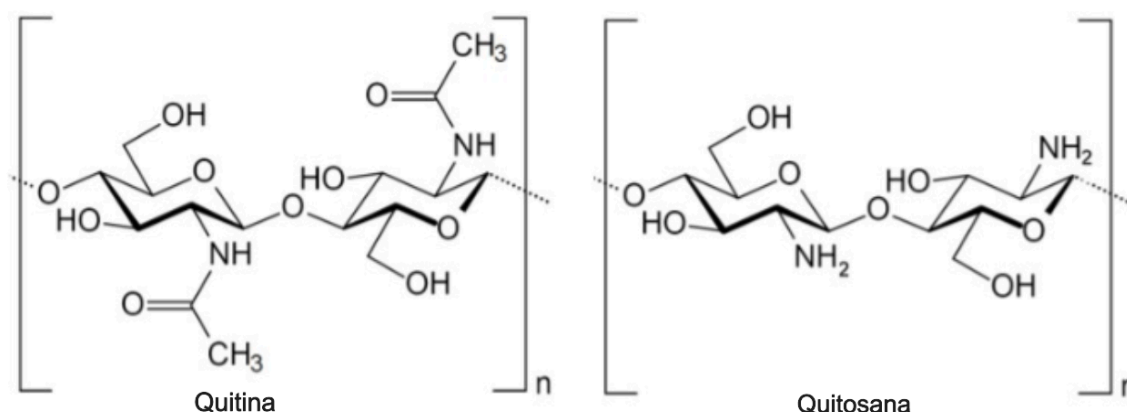
1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Quitina e quitosana.....	6
1.2 Eugenol.....	7
1.3 Xanthomonas citri subsp. citri e o cancro cítrico.....	8
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Desacetilação da quitina.....	12
3.2 Grau de desacetilação.....	13
3.3 Formação de biofilme em placa.....	14
3.4 Caracterização do biofilme em placa.....	15
3.4.1 Espessura.....	15
3.4.2 Opacidade.....	15
3.4.3 Solubilidade em água.....	15
3.4.4 Umidade do biofilme.....	15
3.4.5 Resistência mecânica.....	15
3.5 Teste de inibição bacteriana contra Xanthomonas citri.....	16
3.6 Análise estatística.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Desacetilação da quitina e determinação do grau de desacetilação.....	17
4.2 Formação e secagem dos biofilmes.....	18
4.3 Caracterização dos biofilmes em placa.....	20
4.3.1 Espessura, opacidade e resistência mecânica.....	21
4.3.2 Solubilidade e umidade.....	22
4.4 Teste de inibição bacteriana contra Xanthomonas citri.....	23
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quitina e quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural obtido a partir da desacetilação da quitina, que possui na sua cadeia um grupo amino no carbono 2, e é constituído por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina. Pouco solúvel em água, a solubilização é feita através de um polycation obtido a partir de ácidos (minerais ou orgânicos) em função da protonação dos grupos aminos livres da cadeia polimérica. Assim, a amina primária da quitosana é responsável pela obtenção dos compostos derivados, que por sua vez estão diretamente ligados ao grau de desacetilação (parâmetro mais importante no aspecto químico) (LLANOS *et al.*, 2021).

Figura 1 - Estrutura química da quitina e da quitosana.



Fonte: Adaptado de Younes & Rinaudo, 2015.

A quitina é o segundo polímero mais abundante depois da celulose, sendo encontrada principalmente em cascas de crustáceos, como o camarão e o caranguejo, e também em paredes celulares de fungos, tendo uma produção anual estimada em 10^{10} e 10^{12} toneladas em todo o mundo (SAGAR *et al.*, 2025). Para seu processamento, a quitina é extraída da casca dos crustáceos por tratamento ácido para dissolver o carbonato de cálcio, seguido por uma etapa de extração alcalina e posterior descoloração (RINAUDO, 2006). A quitina é infusível e apresenta baixa solubilidade. Por apresentar baixa solubilidade, gera limitações relevantes no

desenvolvimento de métodos de processamento, uso e caracterização (YOUNES & RINAUDO, 2015).

A quitosana apresenta aplicações comerciais em indústrias alimentícias, químicas e biomédicas, além disso, tem um potencial uso como conservante natural de alimentos graças a sua propriedade antimicrobiana contra diversos microrganismos como fungos, bactérias e leveduras (EDO; YOUSIF; AL-MASHHADANI, 2025). Outras propriedades da quitosana incluem a biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade, versatilidade de formas de uso como gel, soluções e membranas (FLAUZINO JUNIOR, 2021).

A desacetilação da quitina envolve a remoção de grupos acetil da cadeia molecular, resultando na quitosana. O grau de desacetilação (GD) da quitosana é definido como a razão numérica de unidades de D-glucosamina para a soma de unidades de N-acetilglucosamina e D-glucosamina (WEISSPFLOG *et al.*, 2021).

A única empresa brasileira que produzia quitosana fechou, tornando necessária a importação deste produto. Contudo, algumas quitosanas disponíveis no mercado não apresentam em suas fichas técnicas informações relevantes, como o grau de desacetilação. Essa informação é essencial para pesquisas científicas voltadas à produção de bioplásticos e biogéis. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência do grau de desacetilação da quitosana na produção de biogéis, os quais têm como finalidade carrear compostos ativos, sendo utilizado, neste caso, o eugenol, substância que tem demonstrado eficácia no controle do cancro cítrico.

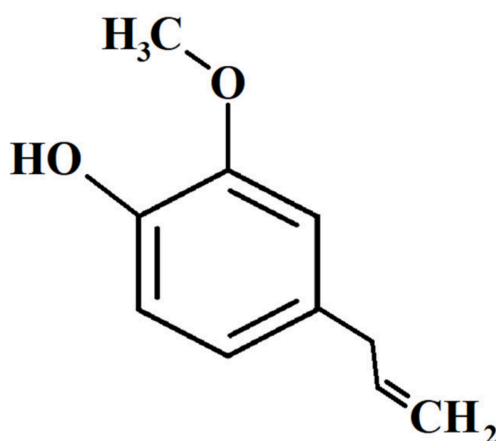
1.2 Eugenol

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é o principal componente do óleo de cravo, um composto aromático, com propriedades analgésicas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas (DA SILVA *et al.*, 2018). O eugenol foi isolado pela primeira vez em 1929 como uma substância volátil de *Eugenia caryophyllata* (cravo da Índia), e sua produção comercial iniciou nos EUA em 1940 (CHEN *et al.*, 2025; ULANOWSKA & OLAS, 2021; DA SILVA *et al.*, 2018).

Esse composto pode ser obtido a partir de óleos essenciais de plantas das famílias *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* e *Myristicaceae* (ULANOWSKA & OLAS,

2021), é um líquido amarelo-claro, de consistência oleosa e aroma característico de cravo. De acordo com Ulanowska e Olas (2021), o potencial antimicrobiano do eugenol tem sido atribuído ao grupo hidroxila (-OH) livre de sua estrutura, como mostra a Figura 2, danificando a membrana de bactérias Gram-negativas. No interior da célula, esse composto é capaz de alterar sua estrutura, promovendo o extravasamento dos componentes intracelulares (TAVVABI-KASHANI *et al.*, 2024). O eugenol apresenta um mecanismo de ação antimicrobiana comum, capaz de penetrar em membranas lipídicas, inibindo a proliferação de diversos microrganismos, como bactérias, fungos e vírus (CHEN *et al.*, 2025).

Figura 2 - Estrutura química do eugenol.



Fonte: ULANOWSKA & OLAS, 2021

O eugenol tem diversas aplicações na indústria, como aromatizante de alimentos, em produtos farmacêuticos, odontológicos, agrícolas e cosméticos (TAVVABI-KASHANI *et al.*, 2024). Tradicionalmente usado por suas propriedades antissépticas e analgésicas, atualmente o eugenol tem seu uso até mesmo em embalagens de alimentos, onde atua como agente antimicrobiano, prevenindo a contaminação e estendendo a vida útil de alimentos, principalmente por sua capacidade antioxidante (HYDERI *et al.*, 2025).

1.3 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e o cancro cítrico

A citricultura é uma atividade de grande importância mundial, sendo economicamente relevante em mais de 80 países, distribuídos em diferentes

regiões, em especial nas zonas tropicais e subtropicais (SENTELHAS, 2005). Os líderes na produção mundial desses produtos são a China, com foco na tangerina e grapefruit, o México lidera na produção de lima e limão enquanto o Brasil assume a liderança mundial na produção de laranja doce (CITRUSBR, 2022). As primeiras exportações de laranja brasileira datam de 1962 e desde então tornaram-se grande potencial econômico no país, cerca de 98% de toda a produção brasileira é destinada ao comércio de suco mundial (NEVES, 2020). Além de grande importância no comércio externo, o setor citrícola possui uma grande geração de empregos. Segundo o Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Caged), a indústria citrícola é o setor agrícola que mais emprega no estado de São Paulo, com uma taxa de 1 empregado para cada 9 hectares cultivados. Para comparativo, o setor da cana possui taxa de 1 empregado para cada 80 hectares cultivados (CAGED, 2018).

Apesar de ser um grande exportador de suco concentrado de laranja, o Brasil enfrenta diversas barreiras, desde fatores climáticos e mercadológicos até fatores legislativos e fitossanitários por parte de grandes importadores, tal como os EUA e a União Europeia (FUNDECITRUS, 2018). Isto se deve ao fato de que o Brasil não é uma região livre de doenças, tal como o cancro cítrico dentre outras infecciosas que atacam os pomares de citros. O cancro cítrico é uma doença de origem asiática causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, uma bactéria Gram-negativa com formato de bastão e aeróbia, provoca lesões em folhas, ramos e frutos (Figura 3). A forma mais comum e disseminada da doença causada pela *X. citri* é a cancriose do tipo “A” ou asiática, forma esta mais severa e agressiva. Para combater os efeitos do cancro cítrico os agricultores aplicam soluções a base de cobre fixo, que visam impedir a entrada e disseminação da bactéria, mas sem efeito curativo algum (FUNDECITRUS, 2018).

Figura 3 - Lesões causadas pelo cancro cítrico (*X. citri*) em laranjas.



Fonte: Fundecitrus.

Apesar do cobre se mostrar eficaz no controle do cancro cítrico, existem diversas evidências de que sua aplicação tenha efeitos negativos ao meio ambiente (BEHLAU *et al.*, 2017). Para reduzir os impactos causados pela pulverização do cobre nos pomares, já foram realizadas diversas pesquisas com possíveis substitutos para controle do cancro cítrico. O zinco mostrou certa eficácia no controle, mas não é tão eficiente quanto o cobre (GRAHAM *et al.*, 2016). Além dos compostos inorgânicos, foram testados compostos orgânicos tal como o ácido hexanóico, que mostrou resultados satisfatórios (CACCALANO *et al.*, 2021). Pesquisas mais recentes apostam na utilização de compostos naturais ou de moléculas de origem natural que possuem agentes bioativos com capacidade bactericida (CAVALCA, 2018; MORÃO, 2018; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021; JOSHI *et al.*, 2021; NG *et al.*, 2021). A vantagem da utilização dos agentes bioativos é a capacidade bactericida com baixa toxicidade e mecanismos de ação específicos para microrganismos procariontes (CAVALCA, 2018; MORÃO, 2018; POLAQUINI *et al.*, 2019; MORÃO *et al.*, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Neste trabalho foi estudado em reator de aço inox a produção de quitosana com diferentes graus de desacetilação. Além disso, foi avaliado a incorporação de eugenol nos biogéis e sua atividade antimicrobiana.

2.2 Objetivos específicos

- a) Desacetilar quitina em reator de aço inox determinando condições para produzir quitosana com diferentes graus de desacetilação;
- b) Avaliar a formação de biogel/bioplástico com as quitosanas com diferentes graus de desacetilação;
- c) Avaliar a atividade antimicrobiana do biogel com as quitosanas com diferentes graus de desacetilação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A quitina comercial empregada no estudo foi adquirida da empresa Paralab (Brasil), produto de procedência da China e predominante no mercado brasileiro, possui baixo grau de desacetilação, entre 10 e 15% (GD) conforme testes potenciométricos.

3.1 Desacetilação da quitina

Os testes de desacetilação da quitina iniciaram conforme o método de Souza (2017). Realizou-se duas séries de testes. Na primeira série, diluiu-se 200 g de hidróxido de sódio (NaOH) em água destilada até completar 400 mL de volume, para obter a proporção de 50% (m/v), e em seguida foi adicionado 4 g de quitina (LAVORGNA *et al.*, 2010). Utilizou-se um reator de aço inox sob medida com capacidade total de 600 mL, com agitação magnética, temperatura e pressão (Figura 4).

Figura 4 - Reator de aço inox.



Fonte: Autor.

A amostra foi submetida a 800 rpm de agitação, sob temperaturas de 130, 135 e 140 °C durante 3 horas. Após o término da reação a amostra foi transferida para um cadinho e submetida à filtração com água destilada utilizando uma bomba de sucção à vácuo para remoção do NaOH. Após a neutralização do pH, a amostra foi levada à estufa sob temperatura de 65 °C durante 24 horas.

Na segunda série dos testes utilizou-se um copo de teflon com capacidade de 200 mL de volume dentro do copo de alumínio do reator. Diluiu-se 100 g de hidróxido de sódio (NaOH) em água destilada até completar 200 mL, em seguida foi adicionado 2 g de quitina (LAVORGNA *et al.*, 2010). A amostra foi submetida a 800 rpm de agitação, sob temperaturas de 120, 125, 130, 135 e 140 °C durante 2 e 3 horas.

3.2 Grau de desacetilação

Para a determinação do grau de desacetilação, utilizou-se a metodologia de Tan *et al.* (1998) a fim de padronizar a determinação do grau de desacetilação (GD) das amostras.

Dissolveu-se 0,05 g de quitosana (GD≈75%) em 20 mL de HCl 0,1 mol/L mais 10 mL de água destilada. A solução de quitosana foi homogeneizada no agitador magnético por 40 minutos e, em seguida, titulada com NaOH 0,1 mol/L. A partir do registro dos valores de pH, conferidos a cada 0,25 mL de NaOH adicionados, gerou-se uma curva de titulação potenciométrica, com dois pontos de inflexão. O volume de NaOH em cada ponto foi aplicado à equação 1 (TAN *et al.* 1998).

$$DD = 100 - [A / (W - 204A) / 161 + A] \times 100 \quad (1)$$

Onde:

DD: Grau de desacetilação

A: Quantidade de GlcNAc determinada / 204

W: Massa da amostra de quitosana utilizada.

Os testes para confirmar a metodologia foram feitos em triplicata e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 1. Os valores do grau de

desacetilação obtidos nas três titulações estão próximos entre si. Além disso, se aproximam do valor fornecido pelo fabricante ($GD \approx 75\%$), o que confirma a metodologia de Tan *et al.* (1998).

Tabela 1 - Teste potenciométrico.

Amostra	Grau de desacetilação (GD) (%)
1	73,0
2	74,6
3	74,6

Fonte: Autor.

3.3 Formação de biofilme em placa

Para a formação do biogel seguido do filme, foi estabelecida uma proporção de 1 g para 100 mL, no caso 0,4 g de quitosana desacetilada para 40 mL de ácido acético 2%. A amostra foi agitada a 600 rpm durante 2 horas (CHEN *et al.*, 2009; LAVORGNA *et al.*, 2010). Após a solubilização da quitosana, adicionou-se 25% de eugenol em relação à massa de quitosana, equivalente a 0,1 mL, seguido de 10% de Tween 80 em relação à massa de eugenol, equivalente a 0,01 mL. Nos últimos 30 minutos de agitação, foi adicionado 20% de glicerina em relação à massa de quitosana, equivalente a 0,08 mL/L. A amostra foi deixada em repouso durante 24 horas para remover as bolhas de ar. Posteriormente, foi adicionado aproximadamente 38 g do material em placa de Petri de plástico redonda e levado à incubadora DBO a 30 °C para secagem durante 2 dias (FAKHOURI, *et al.*, 2007; SILVA, 2011).

3.4 Caracterização do biofilme em placa

3.4.1 Espessura

Para a determinação da espessura, foi necessário um micrômetro e o valor final foi a média aritmética de seis medidas aleatórias em diferentes partes do biofilme (FAKHOURI, *et al.*, 2007).

3.4.2 Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada em espectrofotômetro. Os filmes foram cortados em retângulos e aderidos à parede interna da cubeta de vidro. A leitura foi realizada em triplicata, com um comprimento de onda de 450 nm (MATTEI, *et al.*, 2013). Com o valor de absorbância, calculou-se a opacidade como uma relação entre a absorbância e a espessura do filme.

3.4.3 Solubilidade em água

Foram cortadas amostras de 2 cm de diâmetro e colocadas em estufa a 105 °C durante 24 horas, em seguida, foram pesadas, obtendo-se a massa inicial da amostra. As amostras secas foram inseridas em Becker contendo 50 mL de água destilada, e agitadas lentamente a 25 °C por 24 horas. Após esse período, a amostra foi colocada em estufa a 105 °C durante 24 horas, para sua secagem e posterior pesagem para obter a massa final (FAKHOURI *et al.*, 2007; SILVA, 2011).

3.4.4 Umidade do biofilme

Foram cortadas amostras de 2 cm², pesadas e inseridas em estufa a 105 °C durante 24 horas. Após secas, as amostras foram pesadas novamente, sendo determinado seu percentual de umidade (SILVA, 2011).

3.4.5 Resistência mecânica

A tensão de tração na carga máxima e o alongamento na ruptura - stress - do bioplástico foram medidos no DMA 850 Discovery, TA Instruments com corpos de prova com 3 cm de comprimento e 3,9 mm de largura. A espessura foi previamente medida em regiões diferentes e aleatórias por um micrômetro digital (0-25 mm com resolução de 0,001 mm, Mitutoyo 293-230).

3.5 Teste de inibição bacteriana contra *Xanthomonas citri*

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foram realizadas duplicatas, utilizando o método de difusão em disco em meio sólido, adaptado de Villamizar *et al.*, (2020). A cepa bacteriana *X. citri*, com densidade óptica (DO_{600}) = 0,5, correspondente a 10^{15} UFC/mL, foi adicionada em meio NYG (Nutriente, Extrato de Levedura e Glicerol). Foram adicionados 200 μ L da suspensão bacteriana sobre a superfície do meio de cultura, distribuído uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. Discos de papel filtro estéreis (6 mm de diâmetro) foram previamente posicionados no meio de cada quadrante das placas. Em seguida, foram adicionados 30 μ L de amostra de cada emulsão (54, 62, 69, 76 e 75%) sobre os discos. As placas foram incubadas a 27 °C durante 72 horas. Após o período de incubação, foi realizada a medição dos halos de inibição ao redor dos discos com o auxílio de um paquímetro digital e o software ImageJ, a fim de possibilitar a comparação e garantir maior precisão. A presença e o diâmetro dos halos foram utilizados como indicativo da atividade antibacteriana. A taxa de inibição para cada amostra foi calculada conforme a equação 2, utilizando-se os valores médios dos diâmetros dos halos de inibição, expressos em milímetros.

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = \frac{\text{DIAM da amostra} - \text{Controle}}{\text{DIAM da amostra máxima}} \times 100 \quad (2)$$

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos passaram pelo teste estatístico ANOVA (com grau significativo de $p < 0,05$) para a comparação entre diferentes médias. Essas análises foram realizadas no software BioEstat, versão 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desacetilação da quitina e determinação do grau de desacetilação

Na primeira série dos testes (Tabela 2), os valores mostram que não houve variação do grau de desacetilação entre as temperaturas de 130 e 135 °C, e a maior eficiência foi a partir de 140 °C que apresentou 62% de desacetilação – o que foi abaixo do esperado. Além disso, verificou-se que os materiais recuperados apresentaram coloração vermelho escuro, diferente do material inicial, o que indicou suposta contaminação da amostra pela corrosão da parede interna do reator devido à alta concentração de hidróxido de sódio (NaOH).

Tabela 2 - Processo alcalino de desacetilação da quitina.

NaOH (%)	Massa de quitina (g)	Temperatura do reator (°C)	Tempo de reação (h)	Volume de H ₂ O gasto (L)	Massa recuperada (g)	GD (%)
50	4	130	3	6,5	1,6	54
		135				54
		140				62

Fonte: Autor.

Na segunda série dos testes (Tabela 3), os resultados obtidos mostraram que foi possível obter diferentes graus de desacetilação da quitosana a partir da desacetilação da quitina comercial, inclusive alcançar o GD da quitosana comercial da Sigma-Aldrich. Comparando-se com a metodologia previamente utilizada (SOUZA 2017; LAVORGNA *et al.*, 2010), que operava entre 95 °C e 110 °C por 3 horas, verificou-se que a nova abordagem permitiu alcançar GDs elevados em menor tempo, mas com temperaturas mais elevadas, especialmente nas condições de 130 °C e 135 °C por 2 horas, segundo Ismail *et al.* (2023), esse efeito pode estar relacionado ao fato de que, em temperaturas mais altas, as interações moleculares favorecem a ruptura dos grupos acetil, promovendo maior conversão de quitina em quitosana. Foi a partir desses resultados (Tabela 3) que foram selecionados os biofilmes para os testes de caracterização.

Observou-se também uma diminuição no volume de água para lavar o material, o que já era esperado uma vez que a massa de quitina utilizada no

processo de desacetilação reduziu 50% do primeiro (Tabela 2) para o segundo (Tabela 3). Entretanto, a redução mais significativa foi a massa final recuperada que caiu de 40% para 15% em relação ao primeiro teste (Tabela 2) que utilizava 4 g de quitina.

Tabela 3 - Processo alcalino de desacetilação da quitina.

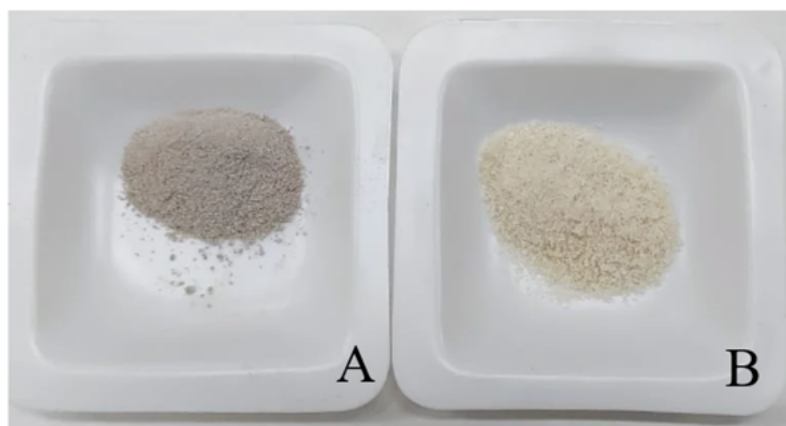
NaOH (%)	Massa de quitina (g)	Temperatura do reator (°C)	Tempo de reação (h)	Volume de H ₂ O gasto (L)	Massa recuperada (g)	GD (%)
50	2	120	2	3	0,3	54
		125	2	3		54
		130	2	3		69
		135	2	3		76
		140	2	3		54
		120	3	5		54
		125	3	4		62
		130	3	4		69
		135	3	3		69
		140	3	4		62

Fonte: Autor.

4.2 Formação e secagem dos biofilmes

A etapa de formação dos biofilmes teve início com a utilização da quitosana obtida a partir do processo de desacetilação da quitina (Figura 5A) e da quitosana comercial da Sigma-Aldrich (Figura 5B). O material desacetilado (Figura 5A) apresentou coloração acinzentada e aspecto granuloso mais fino quando comparado à quitosana comercial (Figura 5B), que possui tonalidade bege. Essa diferença decorre, possivelmente, da presença de impurezas do material primário ou das condições do processo de desacetilação, que podem influenciar na cor. Essas variações não comprometem necessariamente a funcionalidade do material, mas indicam que o material obtido por desacetilação apresenta características diferentes do padrão comercial.

Figura 5 - (A) Quitosana desacetilada com grau de desacetilação (GD) de 76%; (B) quitosana comercial da Sigma-Aldrich.



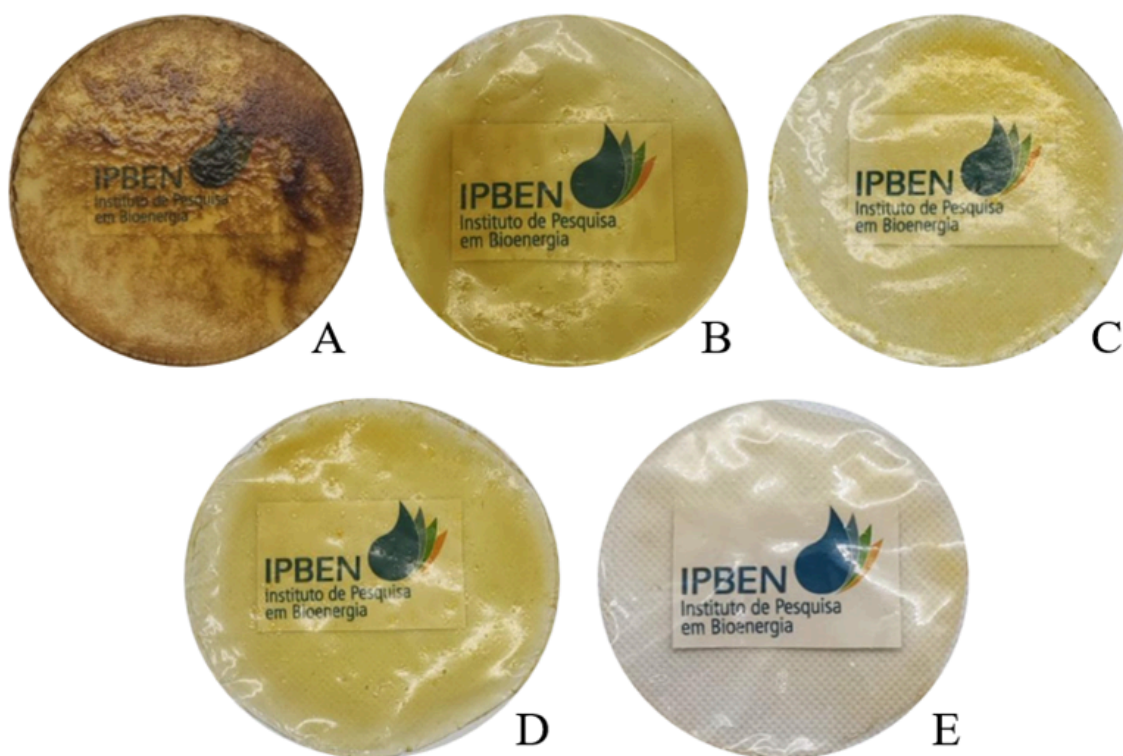
Fonte: Autor.

A Figura 6 apresenta imagens de filmes à base de quitosana desacetilada em diferentes graus (54%, 62%, 69%, 76%), além de uma amostra com quitosana comercial da Sigma-Aldrich (75%), com eugenol e Tween 80 como aditivos.

O filme de 54% de desacetilação (Figura 6A), apresentou coloração escura, o que indicou baixa qualidade do filme, possivelmente devido à menor solubilidade e interação dos grupos amino livres da quitosana com os demais componentes (eugenol e Tween 80). Além disso, é o único filme, entre as figuras, que está na placa Petri - não foi possível removê-lo sem ruptura. A aparência sugere instabilidade ou má formação do biogel devido ao baixo grau de desacetilação. O filme de 62% (Figura 6B) e 69% (Figura 6C), apresentaram mais translucidez e homogeneidade. Houve uma melhora visível na integridade e uniformidade do material com o aumento do grau de desacetilação, principalmente para deslocar o filme da placa Petri. Isso pode estar relacionado à maior disponibilidade de grupos amino na quitosana, que favorece interações intermoleculares e compatibilidade com os aditivos. O filme de 76% (Figura 6D), apresentou aspecto ainda mais uniforme e transparente, o que reforça a tendência de melhora da qualidade do filme com maior grau de desacetilação, podendo ser comparado com o filme de 75% (Figura 6E) (Sigma-Aldrich), que apresentou aparência semelhante ao filme de 76% (Figura 6D), ligeiramente mais claro e homogêneo. A quitosana comercial é

geralmente mais pura e padronizada, o que pode explicar a leve superioridade visual.

Figura 6 - Filmes a base de quitosana desacetilada com diferentes graus, eugenol e Tween 80, e quitosana comercial da Sigma-Aldrich: (A) 54%, (B) 62%, (C) 69%, (D) 76%, (E) 75% Sigma-Aldrich.



Fonte: Autor.

4.3 Caracterização dos biofilmes em placa

Para os testes de caracterização física, química e mecânica dos biofilmes, foram selecionados os filmes de 62, 69, 76 e 75% (GD) da Sigma-Aldrich, com exceção do filme de 54% que não pôde ser removido sem ruptura da placa de Petri por ter aderido à superfície.

4.3.1 Espessura, opacidade e resistência mecânica

Em relação à espessura (Tabela 4), observou-se que os filmes de 62%, 69% e 76% apresentaram valores entre $0,19 \pm 0,03$ mm e $0,24 \pm 0,05$ mm, sendo maior que a espessura do filme da comercial (75%), o que era esperado uma vez que a uniformidade entre as amostras do mesmo material não é facilmente alcançada por se tratar de material heterogêneo. A menor espessura do filme comercial pode estar associada à maior pureza da quitosana em sua fabricação.

Em relação à transmitância, o filme com 76% destacou-se por apresentar o maior valor ($0,53 \pm 0,15$), o que indicou maior transparência à passagem de luz. Em contrapartida, o filme comercial apresentou a menor transmitância ($0,21 \pm 0,01$), apesar de sua menor espessura, sugerindo que a composição do material exerce maior influência na propriedade óptica do que a espessura. A absorbância apresentou tendência inversa à transmitância. O filme com 69% apresentou a maior absorbância (0,71), seguido pelo filme comercial (0,67), enquanto o filme com 76% obteve o menor valor (0,27).

Em relação à resistência mecânica, observou-se que o filme de 62% apresentou o maior valor de tensão à ruptura ($8,48 \pm 2,33$ MPa), maior que o filme de 76% de desacetilação ($3,05 \pm 1,1$ MPa), que era esperado ser próximo do filme da quitosana comercial (75% Sigma-Aldrich – $30,38 \pm 8,23$ MPa). Esse resultado pode estar associado a uma melhor homogeneidade e sinergia entre os componentes da formulação do filme de 62%. Esperava-se que o filme de 76% apresentasse propriedades mecânicas superiores, devido ao maior grau de desacetilação, mas o desempenho inferior sugere que outros fatores, como a interação entre os constituintes, influenciaram mais o comportamento mecânico observado, além disso, a adição de óleo ao biofilme o torna mais maleável e flexível (MARZO ROJAS, 2010). De acordo com Llanos *et al.*, (2025), o filme de quitosana com aditivos de eugenol, tween 80, e glicerol teve um aumento de aproximadamente 30% em relação a resistência à tração mecânica, reforçando que outros fatores influenciaram a resistência do filme.

Tabela 4 - Média e desvio padrão de espessura, forças de tensão e opacidade dos filmes. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, sem análise estatística de comparação entre os grupos.

Filme (%)	Espessura (mm)	Transmitância	Absorbância	Tensão de Ruptura (MPa)
62	0,24 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,01	0,41	8,48 $\pm$ 2,33
69	0,19 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,01	0,71	5,22 $\pm$ 2,13
76	0,19 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,15	0,27	3,05 $\pm$ 1,00
75*	0,10 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,67	30,38 $\pm$ 8,23

* Sigma-Aldrich

Fonte: Autor.

4.3.2 Solubilidade e umidade

A Tabela 5 apresenta os resultados de solubilidade em água e umidade perdida dos filmes de quitosana desacetilada com diferentes graus de desacetilação (GD), incluindo uma amostra comercial da Sigma-Aldrich (75%).

Em relação à solubilidade, o filme com 69% de GD apresentou a maior solubilidade (79%), seguido pelo filme com 62% (73%). À medida que o grau de desacetilação aumenta, a solubilidade tende a diminuir (exemplo: 76% = 60%, Sigma-Aldrich 75% = 35%). Isso ocorre porque a desacetilação aumenta os grupos amino livres, o que pode reduzir a afinidade do polímero pela água. Em relação à umidade perdida, todos os filmes exibiram valores próximos (26–29%), indicando uma retenção de umidade semelhante.

Tabela 5 - Porcentagem de solubilidade em água e umidade perdida dos filmes.

Filme (%)	Massa inicial (sol.) (g)	Massa final (sol.) (g)	Massa solubilizada (g)	Solubilidade (%)	Massa inicial (umid.) (g)	Massa final (umid.) (g)	Umidade perdida (%)
62	0,046	0,012	0,034	73	0,065	0,046	29
69	0,034	0,007	0,027	79	0,048	0,034	29
76	0,033	0,013	0,02	60	0,047	0,033	29
75*	0,014	0,009	0,005	35	0,019	0,014	26

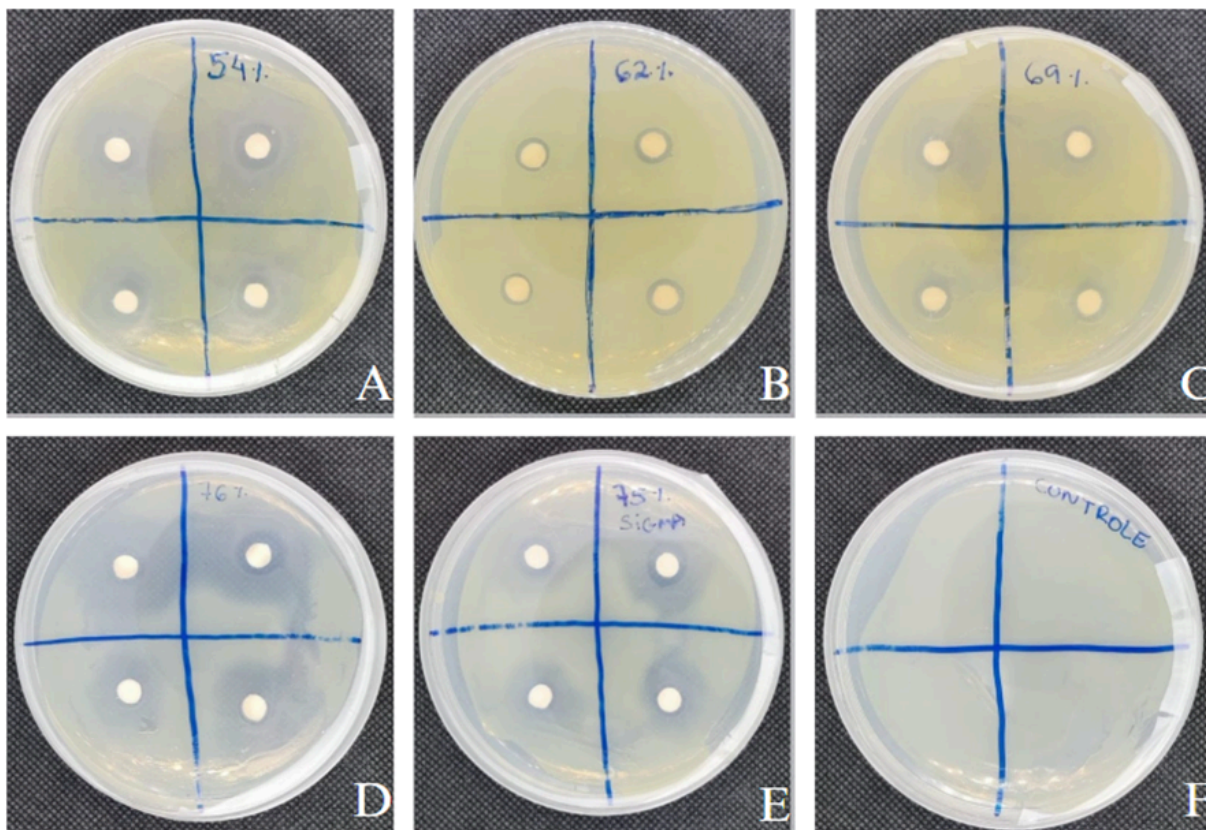
* Sigma-Aldrich

Fonte: Autor.

4.4 Teste de inibição bacteriana contra *Xanthomonas citri*

Na Figura 7 encontram-se as placas de Petri (A - F) apresentando o crescimento de *X. citri* no terceiro dia de incubação em meio NYG a 27 °C, com aplicação de diferentes emulsões de quitosana combinadas com eugenol sobre discos de papel filtro distribuídos em quadrantes. Embora a emulsão de 54% (GD) não tenha sido caracterizada por não descolar da superfície da placa Petri, foi aplicada e analisada enquanto emulsão. Após as 72 horas, observou-se um aumento significativo na dimensão e na visibilidade dos halos de inibição, presente em todas as placas com amostras da emulsão. A placa com amostra de 54% (Figura 7A) demonstrou o maior halo de inibição, com média de 9,08 mm (Tabela 6), entretanto, esse dado diverge do encontrado na literatura, de acordo com Ke *et al.* (2021), quanto maior o grau de desacetilação da quitosana, melhor é a atividade antimicrobiana, porém, outros fatores como pH e peso molecular também interferem nessa ação. Em seguida, destacaram-se as placas com amostras de 75% (Sigma-Aldrich) (Figura 7E) e 69% (Figura 7C), com média dos halos de 8,5 mm e 8,41 mm, respectivamente. Por outro lado, a placa de 62% (Figura 7B) apresentou o menor valor de halo de inibição, com média de 8,01 mm. A placa controle (Figura 7F), contendo apenas a bactéria sem emulsão, não apresentou halos de inibição, confirmando que o crescimento bacteriano ocorreu de maneira uniforme.

Figura 7 - Placas de Petri com *X. citri* e emulsão de quitosana após 72 horas. (A) Emulsão de 54%; (B) emulsão de 62%; (C) emulsão de 69%; (D) emulsão de 76%; (E) emulsão de 75% da Sigma-Aldrich; (F) controle.



Fonte: Autor.

Tabela 6 - Valores das médias $\pm$ desvio padrão do halo de inibição no paquímetro digital e software ImageJ.

Filme (%)	Paquímetro (mm)	ImageJ (mm)	Diferença (Paq – IJ) (mm)
Controle	0	0	0
54	$9,22 \pm 1,28$	$9,08 \pm 0,01$	0,14
62	$8,03 \pm 0,67$	$8,01 \pm 0,03$	0,02
69	$8,46 \pm 0,39$	$8,41 \pm 0,09$	0,05
76	$8,25 \pm 0,75$	$8,10 \pm 0,11$	0,15
75*	$8,63 \pm 1,00$	$8,50 \pm 0,10$	0,13

* Sigma-Aldrich

Fonte: Autor.

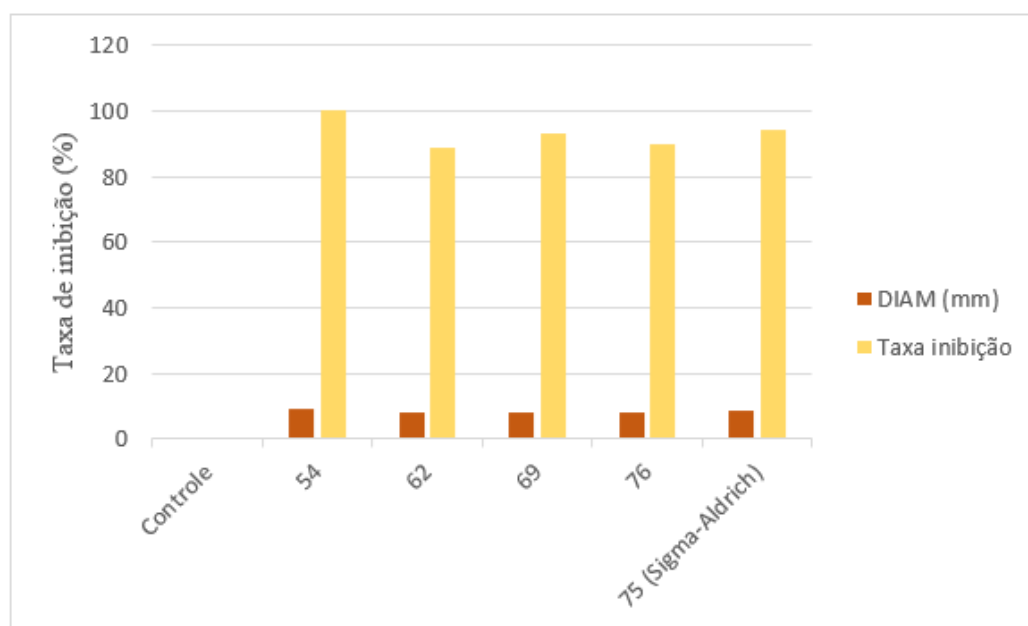
Tabela 7 - Valores da análise estatística - ANOVA

Fonte de variação	SQ (Soma dos Quadrados)	GL	QM (Quadrado Médio)	F calculado	p-valor
Entre grupos	6,56	4	1,6	2,15	0,0949
Dentro dos grupos	26,76	35	0,7	—	—
Total	33,32	39	—	—	—

Fonte: Autor.

A partir da Tabela 7, fica evidente que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos comparados, visto que o valor de $p > 0,05$.

A figura 8, elaborado a partir da equação 2, apresenta os valores de inibição em porcentagem de cada amostra analisada, foram utilizados os dados de diâmetro obtidos do software ImageJ devido a sua maior precisão nos valores. Observa-se que a amostra de 54% apresentou a maior taxa de inibição, atingindo 100%, enquanto a amostra de 62% registrou o menor valor, com aproximadamente 90%, evidenciando uma baixa variação entre as amostras, dado em concordância com o resultado $p = 0,095$ do teste ANOVA.

Figura 8 - Taxa de inibição do crescimento de *X. citri*.

Fonte: Autor.

A quitosana apresenta reconhecida atividade antimicrobiana, uma vez que seu grupo amino, carregado positivamente, interage com a membrana celular dos microrganismos, de carga negativa, provocando o extravasamento do conteúdo intracelular (YILMAZ ATAY, 2019), enquanto que o eugenol também gera extravasamento do conteúdo intracelular, além de ser bastante conhecido na literatura contra diversas bactérias gram-negativas, como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *S. flexneri*, dentre outras (HYDERI *et al.*, 2025), transmitidas principalmente por alimentos. O uso da emulsão de quitosana e eugenol contra a *X. citri* já indicava um potencial antimicrobiano esperado, visto que ambos os compostos apresentam, individualmente, atividade contra microrganismos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação ao processo de desacetilação da quitina, foi possível chegar ao grau de desacetilação da quitosana comercial (Sigma-Aldrich). Entretanto, observou-se baixa quantidade de massa do material recuperado, o que indica perda significativa durante a etapa de lavagem/filtração. Em relação à caracterização, sugere-se aumentar o tempo de agitação da emulsão e da intensidade, além de utilizar agitador mecânico, a fim de melhorar a interação entre os compostos da formulação. Essa adaptação pode contribuir para a formação de um filme mais estável e, conseqüentemente, com mais resistência mecânica, principalmente nas emulsões de quitosana com maiores graus de desacetilação (69% e 75% GD). Era esperado, também, que o desempenho do filme produzido com quitosana de 76% de desacetilação se aproximasse dos resultados observados no filme de quitosana comercial (75%) da Sigma-Aldrich nos testes de rompimento mecânico. Em relação à inibição bacteriana, todas as placas apresentaram boa inibição do crescimento de *X. citri*, com a formação de halos visíveis e média de valores próximos, indicando ação antimicrobiana a partir do uso das emulsões, sem variação estatística em relação ao grau de desacetilação utilizado, evidenciando que embora amostras com GDs menores não formem filme, o potencial antimicrobiano é mantido quando utilizados em forma de emulsão. Entretanto, visto que o valor do teste estatístico ficou próximo ao limiar ($p < 0,05$), sugere-se novos testes com maior quantidade de dados, para conferir maior poder estatístico.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>.
- BEHLAU, F.; SCANDELA, L. H. M.; DA SILVA, G. J. R.; LANZA, F. E. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 94, p. 185–191, 2017.
- CACCALANO, M. N.; DILARRI, G.; ZAMUNER, C. F. C.; DOMINGUES, D. S.; FERREIRA, H. Hexanoic acid: a new potential substitute for copper-based agrochemicals against citrus canker. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, p. 2488–2499, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.15125>.
- CAGED – Cadastro Geral de Empregados e Desempregados. Ministério do Trabalho, [s. l.], [s. d.].
- CAVALCA, L. B. Efeito bactericida do galato de hexila sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seu potencial no controle do cancro cítrico. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, 2018.
- CHEN, L. *et al.* Preparation and properties of chitosan/lignin composite films. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 27, n. 5, p. 739–746, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1142/S0256767909004448>.
- CHEN, M. *et al.* Antiviral properties of the natural product eugenol: A review. **Fitoterapia**, v. 185, p. 106674, 2025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X25002990>.
- CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. A produção de citros está em alta. **CitrusBr**, 8 ago. 2022. Disponível em: <https://citrusbr.com/noticias/a-producao-de-citros-esta-em-alta/>.
- DA SILVA, F. F. M. *et al.* Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 34, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0407-4>.
- EDO, G. I.; YOUSIF, E.; AL-MASHHADANI, M. H. An updated review on the modifications and food preservation applications of chitosan. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 558, p. 109667, 2025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621525002939>.
- FAKHOURI, F. M. *et al.* Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 369–375, 2007.

FLAUZINO JUNIOR, A. Nanocompósitos de lactato de quitosana e NPsAg com atividade antimicrobiana. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://repositorio.unifei.edu.br/jspui/handle/123456789/2571>.

FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura. Doenças: Cancro cítrico. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>.

GRAHAM, J. H. *et al.* Potential of nano-formulated zinc oxide for control of citrus canker on grapefruit trees. **Plant Disease**, v. 100, p. 2442–2447, 2016.

HYDERI, Z. *et al.* Eugenol: An essential oil with potential antimicrobial and antibiofilm activity against foodborne bacteria. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 112, p. 102644, 2025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X25001031>.

ISMAIL, R. *et al.* Investigating the effect of deacetylation temperature on the characterization of chitosan from crab shells as a candidate for organic nanofluids. **Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences**, v. 103, n. 2, p. 55-67, 2023.

JOSHI, T. *et al.* Molecular docking and molecular dynamics simulation approach to screen natural compounds for inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* by targeting peptide deformylase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, p. 823–840, 2021.

KE, C.-L. *et al.* Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. **Polymers**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 904, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/6/904>.

LAVORGNA, M. *et al.* Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 291–298, 2010.

LLANOS, J. H. R. *et al.* Active Chitosan-Eugenol Film Characterization for Microbial Control in Agroindustrial Packaging Applications. **Polymers for Advanced Technologies**, [s. l.], v. 36, n. 9, p. 70331, 2025. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pat.70331>.

LLANOS, J. R.; TADINI, C. C.; GASTALDI, E. New strategies to fabricate starch/chitosan-based composites by extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 290, p. 110224, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110224>.

MARZO ROJAS, I. Efecto del tipo y contenido de aceites esenciales sobre las propiedades mecánicas y barrera de películas comestibles basadas en zeína. [s. l.], 2010. Disponível em: <https://academica-e.unavarra.es/handle/2454/2203>.

MATTEI, D. *et al.* Análises das propriedades físicas e antimicrobianas de filmes a base de amido contendo óleo essencial de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd e *Rosmarinus officinalis* L. – Lamiaceae. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 16, n. 2, p. 129–136, 2013.

MORÃO, L. G. Chalconas e curcuminoides como novas alternativas para combater o cancro cítrico e alguns patógenos de interesse clínico. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, 2018.

MORÃO, L. G. *et al.* A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. **MicrobiologyOpen**, v. 8, p. e00683, 2019.

NEVES, M. F. *et al.* Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 166–174, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00378-1>.

NG, W. *et al.* Plant Natural Products for Mitigation of Antibiotic Resistance. **Sustainable Agriculture Reviews**, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-58259-3_3.

POLAQUINI, C. R. *et al.* Antibacterial activity of 3,3'-dihydroxycurcumin (DHC) is associated with membrane perturbation. **Bioorganic Chemistry**, v. 90, p. 103031, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103031>.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670006000530>.

SAGAR, B. M. *et al.* Utilização de fontes naturais e resíduos para síntese de celulose, quitina e quitosana para um ambiente sustentável. **RSC Advances**, [s. l.], v. 15, n. 32, p. 26276–26301, 2025. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=D5RA02896E>.

SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D. *et al.* (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico/Fundag, p. 319–341, 2005.

SILVA, E. M. Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SOUZA, J. Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em Engenharia de tecidos. 2017. 144 f. Dissertação (Mestrado) – [Instituição não informada].

TAN, S. C. *et al.* The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, p. 713–719, 1998.

TAVVABI-KASHANI, N. *et al.* Pharmacodynamic, pharmacokinetic, toxicity, and recent advances in Eugenol's potential benefits against natural and chemical noxious agents: A mechanistic review. **Toxicon**, v. 238, p. 107607, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010124000138>.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3671, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3671>.

VILLAMIZAR, S.; FERRO, J. A.; CAICEDO, J. C.; ALVES, L. M. C. Bactericidal effect of entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* against *Xanthomonas citri* reduces citrus canker disease severity. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1431, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01431>.

WEISSPFLOG, J. *et al.* Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state – Insights by various complimentary methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 171, p. 242–261, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021000246>.

YILMAZ ATAY, H. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. In: JANA, S.; JANA, Subrata (org.). **Functional Chitosan: Drug Delivery and Biomedical Applications**. Singapore: Springer, 2019. p. 457–489. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7_15.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4377977/>.