

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



DISSERTAÇÃO

**PRODUÇÃO DE FIBRAS ULTRAFINAS DE ZEÍNA INCORPORADAS COM
COMPLEXO DE INCLUSÃO DE β -CICLODEXTRINA E ÓLEO ESSENCIAL DE
EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*) COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, PELA
TÉCNICA DE *ELECTROSPINNING***

Mariana Dias Antunes

Química de Alimentos

Pelotas, 2016

Mariana Dias Antunes

Produção de fibras ultrafinas de zeína incorporadas com complexo de inclusão de β -ciclodextrina e óleo essencial de eucalipto (*eucalyptus citriodora*) com atividade antimicrobiana, pela técnica de *electrospinning*

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

Comitê de orientação: Prof. Dr. Álvaro Renato Guerra Dias (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Vânia Zanella Pinto (UFFS)

Dr^a Shanise Lisie Mello El Halal (UFPel)

Pelotas, 2016.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111p Antunes, Mariana Dias

Produção de fibras ultrafinas de zeína incorporadas com complexo de inclusão de β -ciclodextrina e óleo essencial de eucalipto (*eucalyptus citriodora*) com atividade antimicrobiana, pela técnica de electrospinn / Mariana Dias Antunes ; Alvaro Renato Guerra Dias, Elessandra da Rosa zavareze, orientadores ; Vânia Zanella Pinto, Shanise Lisie Mello El Halal, coorientadoras. — Pelotas, 2016.

63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Fibras ultrafinas. 2. Eletrofiação. 3. Complexo de inclusão. 4. Eucalipto. 5. Atividade antibacteriana. I. Dias, Alvaro Renato Guerra, orient. II. zavareze, Elessandra da Rosa, orient. III. Pinto, Vânia Zanella, coorient. IV. Halal, Shanise Lisie Mello El, coorient. V. Título.

CDD : 664

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini – UFPEL

Prof^a. Dr^a. Caroline Bastos – CCQFA/UFPEL

Dr^a Luciana Prietto – DCTA/UFPEL

**Aos meus pais Realda e Nilson, por serem a
minha base e ao meu noivo Paulo Ricardo Júnior,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por sempre me guiar e me acompanhar em todos os momentos.

Aos meus pais, Realda e Nilson, por sempre me escutarem e me aconselharem! Obrigada por acreditarem em mim! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Gabriela e Cassiano, por todo amor e carinho dedicado a mim, mesmo estando distante. Amo vocês!

Ao meu noivo, Paulo Ricardo Júnior, pelo companheiro maravilhoso e atencioso que és, por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis! Te amo meu amor!

À minha Laikinha, filha de quatro patas, sempre tornando os meus dias mais alegres e divertidos! Minha companheirinha que me oferece um amor incondicional! Te amo minha vidinha!

Ao meu orientador, Álvaro, pelos ensinamentos, sempre válidos.

À minha coorientadora, Elessandra, pela pessoa maravilhosa que és, exemplo de Ser Humano! Obrigada pela ajuda, paciência e atenção toda vez que precisei! És uma profissional excelente!

À minha colega e amiga, Shanise, pela boa vontade em ajudar sempre que precisei! És uma colega como poucas!

À minha ex-colega e amiga, e agora professora universitária, Vânia, por todo incentivo no trabalho e por sempre acreditar que tudo ia dar certo!

Às minhas amigas e colegas, Luciana e Jarine, pelos momentos únicos que vivemos, pelo carinho e aprendizado nesses últimos tempos. Vocês tornaram os meus dias mais alegres!

Às minhas amigas e colegas, Graziella, Franciene, Francine, Laura, Rosane e Nathália, pelas conversas, amizade e carinho. Com certeza vocês fizeram diferença nos meus dias!

Ao colega Guilherme, do labmicro, pela ajuda nas análises de micro.

À todos os colegas do LabGrãos, pelo acolhimento e carinho nesse período.

À todos os professores do Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Agradeço!

**“As grandes ideias surgem da
observação dos pequenos detalhes”**

RESUMO

ANTUNES, Mariana Dias. Produção de fibras ultrafinas de zeína incorporadas com complexo de inclusão de β -ciclodextrina e óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) com atividade antimicrobiana, pela técnica de *electrospinning* 2016. 63p. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.**

O controle microbiano é uma preocupação constante na indústria de embalagens para alimentos. As embalagens ativas são capazes de inibir o crescimento microbiano nos alimentos. Além disso, o uso de polímeros biodegradáveis tem sido amplamente estudado. A zeína é um polímero biodegradável que possui um grande potencial na indústria de embalagens, podendo encapsular compostos bioativos em sua matriz polimérica. Os óleos essenciais (OE) são compostos bioativos de ocorrência natural decorrente do metabolismo secundário de algumas plantas e têm sido estudado como agentes antimicrobianos em embalagens ativas. No entanto, torna-se necessário a complexação com alguma molécula a fim de reduzir algumas características indesejáveis, como a alta volatilidade. As ciclodextrinas são moléculas em forma de cone capazes de acomodar no seu interior moléculas apolares, como os óleos essenciais. Uma tecnologia eficaz capaz de incorporar compostos bioativos em nanomateriais, é a técnica de *electrospinning*. Com isso, o objetivo desse estudo foi produzir fibras ultrafinas de zeína incorporando um complexo de inclusão (CI) entre β -Ciclodextrina (β -CD) e óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) (OEE) através da técnica de *electrospinning* a fim de se obter membranas antimicrobianas como embalagens ativas para alimentos. O OEE foi caracterizado quanto a composição química e atividade antimicrobiana contra 7 bactérias de importância em alimentos. O CI foi avaliado quanto aos grupos funcionais, morfologia e propriedades térmicas. As soluções poliméricas de zeína pura, em diferentes concentrações, foram avaliadas quanto a viscosidade aparente e condutividade elétrica e as membranas resultantes após o processo de *electrospinning* foram avaliadas quanto a morfologia e distribuição de diâmetro. As soluções de zeína 30% (p/v) foram adicionadas de CI nas concentrações de 6, 12, 18 e 24% (p/v), sendo estas caracterizadas quanto a viscosidade aparente e condutividade elétrica. Após o processo de *electrospinning* das soluções com CI, estas membranas foram avaliadas quanto a morfologia e distribuição de diâmetro, propriedades térmicas, grupos funcionais e atividade antimicrobiana em micro-atmosfera contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Os resultados indicaram atividade antimicrobiana do OEE contra as bactérias testadas. Através da análise dos grupos funcionais e da morfologia, pode-se observar uma efetiva complexação do OEE e da β -CD. As fibras obtidas com 30% (p/v) de zeína na solução polimérica apresentaram melhores características morfológicas. Todas as membranas formadas com CI reduziram o crescimento microbiano de *S. aureus* e *L. monocytogenes*. A concentração de 24% (p/v) de CI foi a que se obteve maior percentual de redução de crescimento, em micro-atmosfera, com 24,3% e 28,5% para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente. As membranas antimicrobianas apresentaram características para possível aplicação como embalagens ativas para alimentos.

Palavras-chave: Fibras ultrafinas, *eletrofiação*, complexo de inclusão, eucalipto, atividade antibacteriana.

Abstract

Microbial control is a constant concern in the food packaging industry. Active packaging is capable of inhibiting microbial growth in food. In addition, the use of biodegradable polymers has been extensively studied. Zein is a biodegradable polymer that has great potential in the packaging industry and can encapsulate bioactive compounds in its polymer matrix. Essential oils (EO) are naturally occurring bioactive compounds due to the secondary metabolism of some plants and have been studied as antimicrobial agents in active packaging. However, complexation with some molecule is necessary in order to reduce some undesirable characteristics, such as high volatility. Cyclodextrins are cone-shaped molecules capable of accommodating apolar molecules such as essential oils. An effective technology capable of incorporating bioactive compounds into nanomaterials is the electrospinning technique. The objective of this study was to produce ultrafine zein fibers by incorporating an inclusion complex (IC) between β -Cyclodextrin (β -CD) and eucalyptus essential oil (EO) through the electrospinning technique in order to Antimicrobial membranes as active food packaging. The EEO was characterized by the chemical composition and antimicrobial activity against 7 bacteria of importance in food. CI was evaluated for functional groups, morphology and thermal properties. Polymer solutions of pure zein at different concentrations were evaluated for apparent viscosity and electrical conductivity and the resulting membranes after the electrospinning process were evaluated for morphology and diameter distribution. The 30% (w/v) zein solutions were added with IC at concentrations of 6, 12, 18 and 24% (w/v), which were characterized for apparent viscosity and electrical conductivity. After the electrospinning process of IC solutions, these membranes were evaluated for morphology and diameter distribution, thermal properties, functional groups and micro-atmosphere antimicrobial activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes*. The results indicated antimicrobial activity of EEO against all tested bacteria. Through the analysis of functional groups and morphology, an effective complexation of EEO and β -CD can be observed. The fibers obtained with 30% (w/v) zein in the polymer solution showed better morphological characteristics. All membranes formed with IC reduced the microbial growth of *S. aureus* and *L. monocytogenes*. The concentration of 24% (w/v) IC was obtained with the highest percentage of growth reduction in micro-atmosphere, with 24.3% and 28.5% for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively. The antimicrobial membranes showed characteristics for possible application as active food packaging.

Key-words: Ultrafine fibers, *electrospinning*, inclusion complex, eucalyptus, antibacterial activity.

Lista de Figuras

Figura 1 - Modelo de estrutura secundária da proteína zeína, aminoácidos apolares organizados em estrutura circular repetidos pela união dos segmentos polares (hélices). As nove hélices unidas em figura plana, sendo 'Up' a direção do término NH ₂ para COOH da cadeia dos aminoácidos, enquanto 'Dn' indica a direção oposta (a) e arranjo das proteínas através do empilhamento dos planos por interações de resíduos de glutamina, parte polar estendidas nas extremidades da cadeia molecular (b).....	19
Figura 2 - Modelo de uma estação de electrospinning para a formação de fibras poliméricas.	21
Figura 3 - Defeito em fibras produzidas pelo electrospinning, fibras com beads.....	22
Figura 4 – Folhas de Eucalyptus citriodora.	24
Figura 5 – Representação esquemática da molécula de β -Ciclodextrina.....	25
Figura 6 - Atividade antimicrobiana de OEE por ação de voláteis sobre o crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i> . Os resultados são expressos como média (n = 2) e a barra nas colunas é o desvio padrão.	41
Figura 7 - Espectro FTIR de β -Ciclodextrina (β -CD), óleo essencial de eucalipto (OEE), mistura física (MF) e complexo de inclusão (CI).	42
Figura 8 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de β -CD pura (a, b), mistura física de β -CD e OEE (c, d) e CI- β -CD/OEE (e, f) em ampliações de 800x (a, c, e) e 2000x (b, d, f)	44
Figura 9 – Curvas de DSC de β -Ciclodextrina (β -CD), óleo essencial de eucalipto (OEE), mistura física (MF) e complexo de inclusão (CI).	45
Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e distribuição de diâmetro de fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de zeína. (a, b) 20% (p/v), (c, d) 30% (p/v) e (e, f) 40% (p/v).	48
Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e distribuição de diâmetro de fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de complexo de inclusão (CI) OEE/ β -CD. (a, b) fibras ultrafinas de zeína com CI 6% (p/v); (c, d) fibras ultrafinas de zeína com CI 12% (p/v); (e, f) fibras ultrafinas de zeína com CI 18% (p/v); (g, h) fibras ultrafinas de zeína com CI 24% (p/v);.....	51

Figura 12 - Espectro ATR-FTIR de fibras ultrafinas de zeína pura e com CI em diferentes concentrações.	54
Figura 13 - Redução do crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i> por ação dos voláteis do OEE nas fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de CI, em comparação com o controle (fibras sem CI). Os resultados são expressos como média (n = 4) e a barra nas colunas é o desvio padrão.	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial <i>Eucalyptus citriodora</i>	38
Tabela 2: Atividade antimicrobiana por disco difusão, CIM e CBM do OEE frente a diferentes bactérias.	40
Tabela 3: Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções de zeína com diferentes concentrações.	47
Tabela 4: Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções de zeína 30% (m/v) com diferentes concentrações de complexo de inclusão OEE/ β -CD.	49
Tabela 5: TGA dos constituintes das fibras ultrafinas e das fibras ultrafinas de zeína pura e incorporados com complexo.	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Polímeros - Polímeros naturais	18
3.2 Nanotecnologia	19
3.3 Electrospinning.....	20
3.4 Óleos essenciais como agentes antimicrobianos	22
3.5 Embalagens ativas	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Material.....	28
4.2 Métodos.....	28
4.2.1 Extração do óleo essencial de eucalipto (OEE)	28
4.2.2 Caracterização do OEE.....	28
4.2.2.1 Composição química	28
4.2.2.2 Atividade antimicrobiana do OEE	29
4.2.3 Preparo do complexo de inclusão	31
4.2.4 Preparo da mistura física	31
4.2.5 Caracterização do complexo de inclusão e da mistura física.....	32
4.2.5.1 Grupos funcionais.....	32
4.2.5.2 Morfologia.....	32
4.2.5.3 Propriedades térmicas por DSC	32
4.2.5.4 Propriedades térmicas por análise termogravimétrica (TGA)	32
4.2.6 Preparo e avaliações das soluções poliméricas de zeína utilizadas para o	

electrospinning	33
4.2.7 Produção de fibras ultrafinas de zeína pela técnica de electrospinning	33
4.2.8 Avaliações das fibras ultrafinas de zeína	34
4.2.8.1 Morfologia e distribuição de diâmetro	34
4.2.9 Preparo e avaliações das soluções poliméricas com a incorporação do complexo de inclusão.....	34
4.2.10 Produção de fibras ultrafinas de zeína com a incorporação do complexo de inclusão	35
4.2.11 Avaliações das fibras ultrafinas de zeína com a incorporação do complexo de inclusão.....	35
4.2.11.1 Morfologia e distribuição de diâmetro.....	35
4.2.11.2 Propriedades térmicas por análise termogravimétrica (TGA).....	35
4.2.11.3 Grupos funcionais.....	35
4.2.11.4 Atividade antimicrobiana das fibras ultrafinas com CI, em micro-atmosfera	36
4.3 Análise estatística	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Caracterização do óleo essencial de eucalipto	36
5.1.1 Composição química.....	36
5.1.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto	39
5.1.2.1 Difusão em ágar, CIM e CBM.....	39
5.1.2.2 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera.....	40
5.2 Caracterização do complexo de inclusão e da mistura física	41
5.2.1 Grupos funcionais	41
5.2.2 Morfologia	43
5.2.3 Propriedades térmicas por DSC.....	44
5.3 Avaliações das soluções poliméricas de zeína	45

5.3.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica	45
5.4 Avaliações das fibras ultrafinas de zeína	47
5.4.1 Morfologia e distribuição do diâmetro	47
5.3 Avaliações das soluções poliméricas com complexo de inclusão	49
5.3.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica	49
5.4 Avaliações das fibras ultrafinas de zeína com complexo de inclusão	50
5.4.1 Morfologia e distribuição do diâmetro	50
5.6.3 Propriedades térmicas por TGA.....	52
5.6.4 Grupos funcionais	53
5.6.5 Atividade antimicrobiana das fibras ultrafinas de zeína com complexo de inclusão, em micro-atmosfera	54
6 Conclusões	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

O controle microbiano é uma preocupação constante na indústria de embalagens para alimentos. Embalagens contendo substância antimicrobiana anexada e/ou imobilizada no material de embalagem são chamadas de embalagens ativas antimicrobianas as quais são capazes de inibir o crescimento microbiano nos alimentos. Essas embalagens são promissoras, uma vez que compostos antimicrobianos atuam de forma controlada, estendendo assim a vida útil do produto sem alterar as características sensoriais do alimento (SOARES et al., 2009; WEN et al., 2016b).

Com a crescente preocupação com o meio ambiente e a fim de minimizar o uso de recursos não-renováveis, o uso de polímeros biodegradáveis para embalagens tem sido amplamente estudado (SIRIPATRAWAN e VITCHAYAKITTI, 2016). A zeína é um polímero biodegradável de alto grau de polimerização e não tem sido utilizada para o consumo humano, devido ao seu balanço nitrogenado negativo e sua baixa solubilidade em água. É a principal proteína de armazenagem do milho, correspondente a cerca de 50% do teor total de proteína e tem um grande potencial na indústria de embalagens, pois possui boa elasticidade, capacidade de formação de filme e hidrofobicidade (TORRES-GINER, GIMENEZ, LAGARON, 2008; MORI et al., 2014). A partir dessas características a zeína tem sido alvo de pesquisas, principalmente, no ramo de embalagens e revestimentos para alimentos, assim como encapsulamento de compostos bioativos (LUO et al., 2011; NEO et al., 2013; MORI et al., 2014).

Entre os compostos bioativos, encontram-se os óleos essenciais (OE), de ocorrência natural decorrente do metabolismo secundário de algumas plantas, os quais possuem ampla ação antimicrobiana. Os OE têm sido uma alternativa eficaz no uso de aditivos alimentares naturais em embalagens ativas. No entanto, OE puros possuem algumas características indesejáveis como alta volatilidade, insolubilidade em água, além do seu sabor e odor muito característico da planta de origem. Uma alternativa para proteger os compostos voláteis do OE é a complexação com β -ciclodextrina, a qual possui uma estrutura em forma de cone com uma cavidade lipofílica e alta capacidade de hospedar moléculas apolares, tais como OE (AYTAC et al., 2016).

O *Eucalyptus* é uma planta pertencente a família Myrtaceae cultivada em todas as regiões do Brasil sendo conhecidas cerca de 800 espécies (Elaiissi et al., 2011). Das folhas de algumas espécies, através de hidrodestilação, é extraído um óleo essencial, o qual possui diferentes composições químicas. A espécie *Eucalyptus citriodora* já é conhecida por seu óleo essencial possuir propriedade antimicrobiana, devido sua composição química, contra diversos microorganismos (SINGH et al., 2012).

Existem vários estudos sobre incorporação de compostos ativos em nanomateriais e suas aplicações na produção de embalagens utilizando diferentes tecnologias. O *electrospinning* é uma técnica relativamente simples, de baixo custo, podendo ser utilizado uma ampla variedade de polímeros para fabricação de nanofibras. Estes materiais nanoestruturados estão sendo cada vez mais utilizados em várias aplicações, tais como biossensores, engenharia de tecidos e na indústria de alimentos e embalagens. Esta técnica possibilita produzir nanofibras com alta área superficial devido à grande porosidade e estrutura nanométrica, sendo muito conveniente para obter uma liberação controlada do agente antimicrobiano da embalagem para o alimento (NEO et al., 2013).

Alguns autores têm reportado a incorporação de agentes antimicrobianos naturais em nanofibras produzidas por *electrospinning*. Wen et al. (2016a) obtiveram nanofibras de poli(ácido láctico) (PLA) incorporadas com óleo essencial de canela para utilização como embalagem ativa antimicrobiana. Mori et al. (2014) produziram nanofibras de zeína incorporadas de taninos, em diferentes concentrações, extraídos da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e avaliaram as propriedades destas membranas. Em outro estudo, Neo et al. (2013) incorporaram ácido gálico, em diferentes concentrações, em nanofibras de zeína para obtenção de nanofibras funcionais com atividade antioxidante. No entanto, não foram encontrados estudos sobre a incorporação de óleo essencial de eucalipto na forma de complexo de inclusão com β -ciclodextrina para proteção e liberação controlada dos voláteis em fibras ultrafinas de zeína produzidas por *electrospinning*. Portanto, o objetivo do estudo foi produzir fibras ultrafinas de zeína, incorporando um complexo de inclusão de óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) e β -ciclodextrina, com ação antimicrobiana, através da técnica de *electrospinning*. O óleo essencial de eucalipto (OEE) foi caracterizado pela composição química e atividade antimicrobiana contra 7 bactérias de importância em alimentos. As fibras ultrafinas

de zeína contendo diferentes concentrações do complexo de inclusão foram caracterizadas pela morfologia, propriedades térmicas, grupos funcionais e ação antimicrobiana dos voláteis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar fibras ultrafinas de zeína, com complexo de inclusão entre β -ciclodextrina e óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) pela técnica de *electrospinning*, e avaliar sua atividade antibacteriana.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar o óleo essencial de folhas de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*);
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas;
- Preparar um complexo de inclusão entre β -ciclodextrina e óleo essencial de eucalipto (CI- β -CD/OEE)
- Caracterizar o complexo de inclusão (CI) quanto aos grupos funcionais, morfologia e propriedades térmicas;
- Elaborar e caracterizar soluções poliméricas de zeína quanto a viscosidade aparente e condutividade elétrica;
- Produzir e avaliar fibras ultrafinas de zeína pela técnica de *electrospinning* quanto a morfologia e distribuição de diâmetro;
- Elaborar e caracterizar soluções poliméricas de zeína com diferentes concentrações de CI quanto a viscosidade aparente e condutividade elétrica;
- Produzir e avaliar fibras ultrafinas de zeína com CI pela técnica de *electrospinning* quanto a morfologia e distribuição de diâmetro, propriedades térmicas, grupos funcionais e atividade antimicrobiana em micro-atmosfera.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polímeros - Polímeros naturais

Nos últimos anos tem sido alvo de pesquisas a utilização de polímeros naturais em diversos setores, com ênfase na indústria de embalagens para alimentos. Polímeros naturais são aqueles formados a partir de organismos vivos, ou seja, sua síntese envolve, na maioria das vezes, reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros ativados, os quais são formados no interior das células por processos metabólicos complexos (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). Estes polímeros são, em alguns casos, alterados em suas propriedades, através de métodos químicos ou físicos, com o intuito de apurar características desejáveis à aplicação (MILLÁS, 2012). Um grande empenho para estender a vida útil e aprimorar a qualidade dos produtos alimentícios, diminuindo os resíduos de embalagens, vem incentivando a pesquisa de novos materiais de embalagem de base biológica, como os filmes comestíveis e biodegradáveis a partir de fontes renováveis (WESLEY; RAJA; TIROUTCHELVAMAE, 2014).

Zeína é a proteína mais abundante do milho (cerca de 80%) sendo um co-produto da moagem úmida dos grãos. É conhecida por suas características como alta hidrofobicidade, devido aos resíduos de aminoácidos que a compõe, sendo três quartos lipofílicos (prolina, isoleucina, alanina, fenilalanina, metionina, valina, leucina) e um quarto hidrofílicos (treonina, cisteína, tirosina, asparagina, histidina, ác. glutâmico, arginina, glutamina, glicina), boa elasticidade, alta resistência térmica e barreira ao oxigênio e capacidade de formação de filme. A partir dessas características ela tem sido alvo de pesquisas, principalmente, no ramo de embalagens e revestimentos para alimentos, assim como encapsulamento de compostos bioativos (LUO, et al., 2011; NEO, et al., 2013; MORI, et al., 2014).

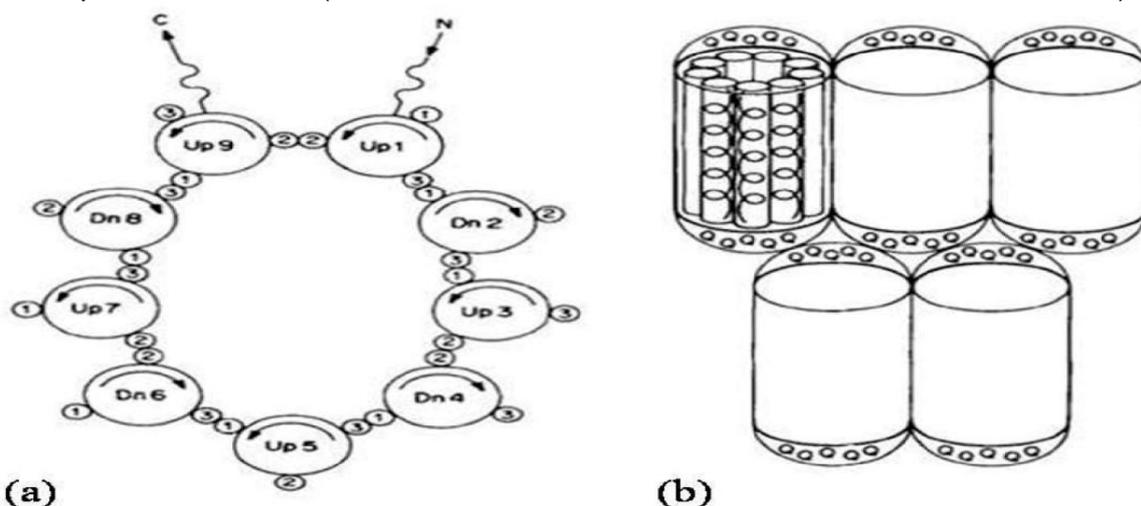


Figura 1 - Modelo de estrutura secundária da proteína zeína, aminoácidos apolares organizados em estrutura circular repetidos pela união dos segmentos polares (hélices). As nove hélices unidas em figura plana, sendo 'Up' a direção do término NH₂ para COOH da cadeia dos aminoácidos, enquanto 'Dn' indica a direção oposta (a) e arranjo das proteínas através do empilhamento dos planos por interações de resíduos de glutamina, parte polar estendidas nas extremidades da cadeia molecular (b)

Fonte: ARGOS, et al., 1982

Recentemente muitas pesquisas têm sido realizadas utilizando a zeína como polímero para produção de fibras/nanofibras, para diversas aplicações, como embalagens ativas ou inteligentes para alimentos, através de variadas técnicas, em especial *electrospinning* (TORRES-GINER, GIMENEZ, LAGARON, 2008; KAYACI e UYAR, 2012; NEO et al., 2013; MORI, et al., 2014;).

3.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma grande área da pesquisa a qual envolve a caracterização, fabricação e/ou a manipulação de estruturas, dispositivos ou materiais que têm pelo menos uma dimensão de aproximadamente 1-100 nm de diâmetro. Quando o tamanho da partícula é reduzido abaixo deste valor, o material resultante apresenta suas propriedades físicas e químicas significativamente diferentes das propriedades de materiais em macroescala constituídos pela mesma substância (SILVESTRE; DURACCIO; CIMMINO, 2011). Devido as suas proporções nanométricas, estes materiais possuem alta relação de superfície e atividade de superfície em relação ao volume total. Quando adicionados aos polímeros compatíveis, os nanomateriais podem aumentar eficientemente as propriedades do material dos nanocompósitos resultantes, como uma melhor resistência mecânica, maior estabilidade térmica, maior condutividade elétrica, entre outras (USKOKOVIC, 2007). Assim, esses nanomateriais são muito promissores para melhorar as propriedades mecânicas e de barreira de embalagens de alimentos, bem como o desenvolvimento de estruturas avançadas para aplicações de ativos e inteligentes (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014)

Apesar do interesse em torno da nanotecnologia e do alto investimento, uma área que tem sido lenta para utilizar esses recursos é a indústria de alimentos. Isso não é inesperado, uma vez que o público tem tido preferência por produtos alimentícios "naturais" a implementação de tecnologias alimentares emergentes tem

sido inibida, e a nanotecnologia não foi exceção. Assim, a opinião pública sobre aplicações gerais da nanotecnologia varia de indiferente a ligeiramente positivo, sendo que alguns estudos sugerem que os consumidores continuam cautelosos sobre "nanoalimentos" (DUNCAN, 2011).

O conceito do alimento que interage com o consumidor é permitir que este possa alterar características do alimento em função da sua necessidade de nutrição e sabor. A concepção de "nanoalimentos" são nanocápsulas que contenham modificadores de cor, odor, sabor ou ainda elementos essenciais, como vitaminas, os quais continuariam inalterados no interior do alimento e só depois seriam liberados pela sua ação (MARTINS, et al., 2016).

Até 2020 as pesquisas em nanotecnologia prometem atingir pelo menos 6 milhões de reais em toda economia global, pois o uso, principalmente, de revestimentos de proteção e embalagens para alimentos tornou-se de grande importância para a indústria de alimentos devido sua alta capacidade em estender a vida útil dos produtos (WESLEY; RAJA; TIROUTCHELVAMAE, 2014).

3.3 *Electrospinning*

O *electrospinning* é uma técnica a qual permite a produção de fibras poliméricas com dimensões em escala nanométrica bem como o encapsulamento de compostos bioativos sensíveis. A técnica utiliza a aplicação de forças eletrostáticas na solução através da aplicação de alta voltagem, onde um eletrodo conectado a uma fonte de alta tensão positiva ou negativa é acoplado a ponta da agulha que passará a solução polimérica, desta forma essas cargas são induzidas no interior da solução. Em um primeiro momento a solução é mantida sob a forma de uma gota na extremidade da agulha, devido a sua tensão superficial. Com o aumento gradativo da tensão elétrica ocorre a amplificação da gota, formando um cone, conhecido como cone de Taylor. Quando as forças eletrostáticas superam a tensão superficial, um jato da ponta do cone é ejetado em direção a região de potencial mais baixo, sendo na maioria das vezes um coletor metálico aterrado. No momento em que o jato é transportado, ocorre a evaporação do solvente e assim o polímero solidifica-se, produzindo uma membrana composta de nanofibras que são depositadas no coletor. Durante o transporte do jato da solução polimérica, ocorre a alongação deste, tornando-o muito comprido e fino (RAMAKRISHNA et al., 2005; SATO, 2011).

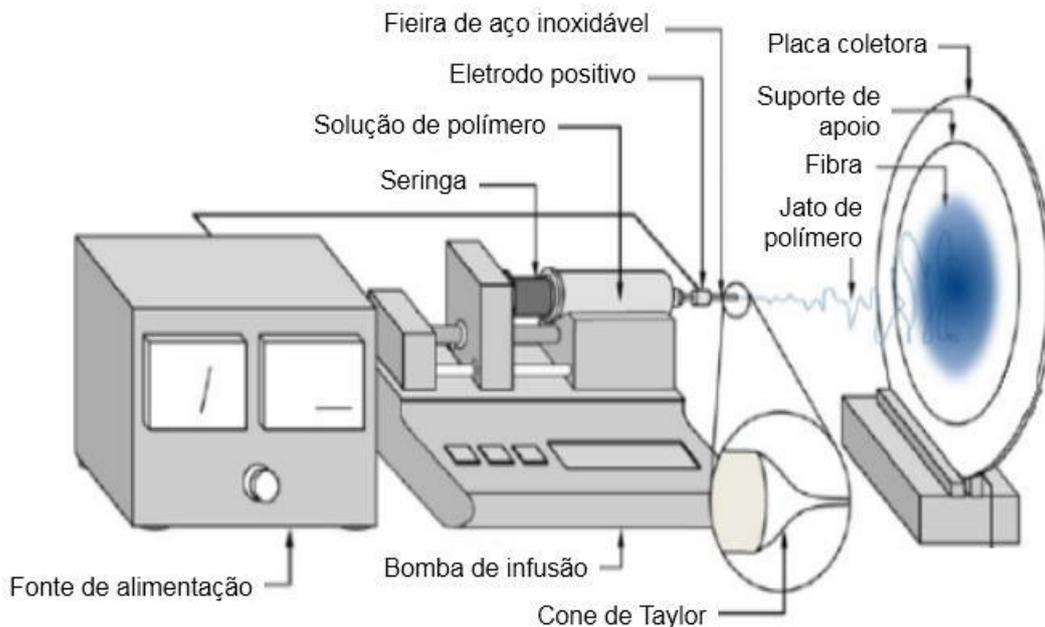


Figura 2 - Modelo de uma estação de *electrospinning* para a formação de fibras poliméricas.

Fonte: MIHINDUKULASURIYA & LIM, 2013.

A partir de diferentes polímeros e parâmetros do processo pode-se obter uma variedade de formas e tamanhos de fibras pela técnica de *electrospinning*. Estudos mostram diferentes morfologias de fibras poliméricas, como fibras ramificadas, achatadas, cilíndricas e dobradas. A ramificação na fibra pode estar relacionada com o processo de quebra das gotículas, devido ao alto nível de carga na solução. Já, seções transversais circulares apontam que a fibra estava no estado sólido no momento da colisão com o alvo. Fibras com geometria em forma de fita são devidas ao colapso de um fio ou gel dessa solução após o impacto. Outras formas não circulares podem ser devidas a contração da solução na solidificação, após o impacto, quando a fibra já não está sob tensão (TORRES-GINER, GIMENEZ, LAGARON, 2008; LUO et al., 2011)

Variações no processo de *electrospinning* também resultam em diferentes tamanhos de diâmetro das fibras, além de defeitos estruturais, como o aparecimento de esferas ou *beads*. O surgimento desses *beads* na estrutura das fibras se deve ao desnivelamento desigual da fibra durante o processo de estiramento, sendo que os

principais fatores que influenciam a formação destes são a viscosidade da solução, a tensão superficial e a densidade da carga líquida transportada pelo jato. O campo eletrostático submetido e a condutividade da solução polimérica controlam a densidade de carga desse líquido transportado durante o processo. Uma alternativa para reduzir a tensão superficial e eliminar o número de fibras com *beads*, é adicionando surfactante a solução (TORRES-GINER, GIMENEZ, LAGARON, 2008).

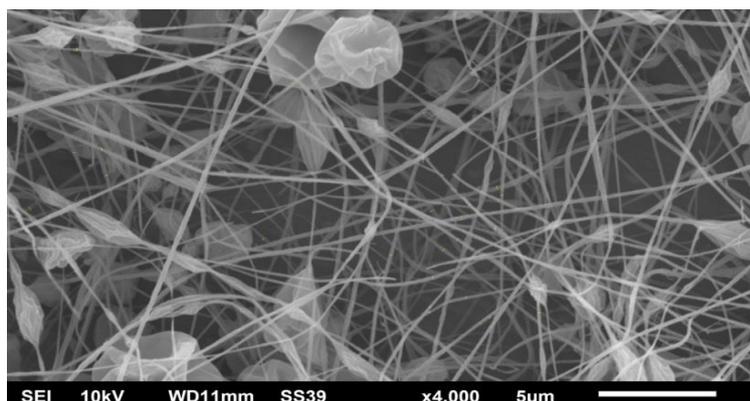


Figura 3 - Defeito em fibras produzidas pelo *electrospinning*, fibras com *beads*.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os principais parâmetros que afetam o processo de *electrospinning* são as propriedades da solução polimérica (viscosidade aparente, condutividade elétrica, tensão superficial), condições do processamento (voltagem aplicada, taxa de fluxo, distância do coletor) e ambientais (umidade relativa do ar, temperatura ambiente). Com isso, torna-se fundamental compreender como esses parâmetros influenciam a morfologia e diâmetro das fibras. Assim, a técnica de *electrospinning* é promissora para o encapsulamento de compostos bioativos alimentares em fibras, pois possui vantagens como liberação controlada, processo em temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), encapsulamento eficaz e maior estabilidade do composto bioativo obtido a partir de polímeros de qualidade alimentar ou biopolímeros, além de poder controlar o tamanho do produto resultante através da manipulação dos parâmetros de processamento (GHORANI e TUCKER, 2015)

3.4 Óleos essenciais como agentes antimicrobianos

Óleos essenciais são substâncias aromáticas e voláteis derivadas do metabolismo secundário de plantas, formados em células especiais, e normalmente

encontram-se concentrados em uma certa região, como folhas, frutos ou casca. São constituídos de misturas complexas de compostos, podendo conter mais de 60 tipos de componentes, e são caracterizados pela presença de um, dois ou até três compostos majoritários, que, geralmente, determinam a sua propriedade biológica. Porém, existem declarações de que os compostos minoritários presentes desempenham uma função importante na atividade antimicrobiana do óleo essencial, possivelmente pelo seu efeito sinérgico com os outros componentes (DELAQUIS et al, 2002)

Diversos estudos têm relatado sobre a atividade antimicrobiana destes óleos essenciais. Porém, muitas vezes verifica-se uma diferença significativa nessa atividade antimicrobiana em uma mesma espécie, o que está relacionado, principalmente, com a localização geográfica, época da coleta, genótipo e condições climáticas, sendo então necessário a caracterização da composição química desses óleos essenciais (SINGH, et al., 2012)

Alguns possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos foi elucidado em alguns estudos. Porém, o exato mecanismo ainda não foi definido. Como já é conhecida, uma importante característica dos óleos essenciais é a sua hidrofobicidade, o que lhes permite alterar a permeabilidade da membrana celular e mitocondrial, tornando-as mais permeáveis e susceptíveis a perdas de íons e moléculas (CARSON, et al, 2002).

Outra característica são a presença dos compostos fenólicos, onde é possível supor que o efeito destes compostos seja dependente da concentração, assim, baixas concentrações influenciam a atividade enzimática, enquanto que altas concentrações podem acarretar na desnaturação protéica. Outras alterações que os compostos fenólicos podem causar são a modificação da permeabilidade da membrana celular, ocasionando a perda de macromoléculas, e também podem interagir com proteínas da membrana celular causando desorganização na sua estrutura e funcionalidade (FUNG, TAYLOR e KAHAN, 1977; BAJPAI, RAHMAN e KANG, 2008)

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e possui diversas espécies, sendo conhecidas mais de 400, e é encontrado em todas as regiões do Brasil. A partir da hidrodestilação das suas folhas obtém-se um óleo essencial com diferentes composições químicas, os quais são aprovados para uso como aditivos alimentares e também em formulações cosméticas (SILVEIRA, et al., 2012)

A espécie *Eucalyptus citriodora* já foi reportada por vários autores quanto a sua ação antimicrobiana (ESTANISLAU, et al., 2001; ELAISSI, et al., 2011; TOLBA, et al., 2015;). A sua composição química, em geral, tem como composto majoritário o citronellal, porém alguns estudos relatam o 6-octenal e α -pinene como constituintes majoritários (SINGH, et al., 2012).



Figura 4 – Folhas de *Eucalyptus citriodora*.

Fonte: ARAÚJO, 2005.

Devido a sua alta volatilidade, insolubilidade em água e odor forte, torna-se interessante a realização de uma forma de proteger os compostos voláteis do óleo essencial, como através da complexação com alguma molécula, por exemplo, as ciclodextrinas, que o proteja minimizando esses fatores indesejáveis.

3.5 Ciclodextrinas e complexo de inclusão

As ciclodextrinas são uma família de compostos formados por moléculas de glicose unidas em um anel. A β -ciclodextrina (β -CD) é constituída por 7 unidades de glucopiranosídeo. Apresenta uma cavidade interna hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica. As ciclodextrinas têm sido muito utilizadas para preparar complexos de inclusão com óleos essenciais visando melhorar a estabilidade e solubilidade destes compostos. Esses complexos podem ser explicados como a interação dos compostos no qual uma molécula hóspede menor, como óleos essenciais, se encaixa no interior da outra molécula, as ciclodextrinas, e é envolvida por esta (ZHU, et al., 2014). Já foi relatado por vários autores a melhora das propriedades físicas dos óleos essenciais quando complexados com β -ciclodextrina,

além de manter ou até mesmo aumentar as atividades antimicrobiana e antioxidante dos mesmos (ARANA-SÁNCHEZ, et al., 2010; WEISHEIMER et al., 2010; HILL, GOMES & TAYLOR, 2013; KFOURY et al., 2014;).

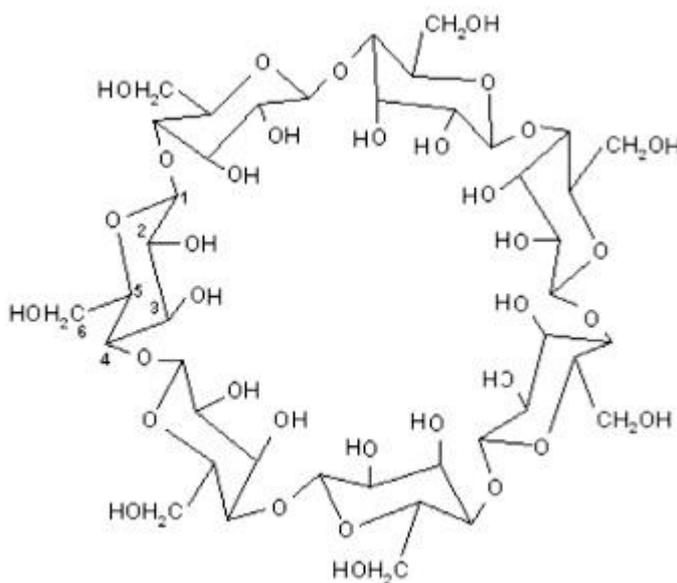


Figura 5 – Representação esquemática da molécula de β -Ciclodextrina.

Fonte: FRACETO, et al. 2007.

Gong et al. (2016) estudaram a atividade antifúngica de um complexo de inclusão entre eugenol e β -ciclodextrina, em frutos frescos de lichia e verificaram que tanto nos ensaios *in vitro*, contra fungos, quanto nos *in vivo*, nos frutos, houve uma inibição significativa do crescimento das colônias. Além disso, resultados de ressonância magnética demonstraram mudanças químicas da molécula de β -ciclodextrina indicando a inclusão do eugenol na cavidade lipofílica da β -ciclodextrina.

Já Wen et al. (2016a) estudaram a incorporação de complexo de inclusão entre óleo essencial de canela e β -ciclodextrina em nanofibras de poli(ácido láctico) (PLA) através da técnica de *electrospinning*, para utilização como nanofilme antimicrobiano em alimentos, e verificaram uma melhora na estabilidade do óleo essencial de canela, após a complexação com β -ciclodextrina, através da técnica de espectroscopia na região do infravermelho, sendo também demonstrado, através de imagens de microscopia eletrônica de varredura, uma formação bem sucedida do complexo de inclusão. Estes mesmos autores também compararam a atividade antibacteriana dos nanofilmes com complexo de inclusão e apenas com o óleo

essencial, e os resultados mostraram uma melhora desta atividade nos nanofilmes com complexo de inclusão, demonstrando a importância desta etapa.

3.5 Embalagens ativas

As embalagens são uma forma de proteger os produtos garantindo assim a qualidade destes durante o transporte e armazenamento. São utilizados diversos materiais para produção de embalagens, como papel, polímeros, metais, além da combinação destes. Porém, com o passar dos anos e a grande perda de alimentos no mundo, faz-se necessário o desenvolvimento de novas embalagens que diminuam essas perdas aumentando a vida útil do alimento (FERREIRA, 2012)

As embalagens ativas são um tipo de embalagem na qual alteram suas condições internas, a fim de aumentar a segurança, melhorar as propriedades sensoriais, com o objetivo de estender a vida útil do produto embalado, ou seja, estas embalagens interagem de forma intencional com o alimento (ROONEY, 2005)

Um exemplo de embalagem ativa é a embalagem antimicrobiana, a qual possui algum composto ativo no interior da sua matriz, desta forma este composto migra lentamente para a superfície do produto embalado e, através da sua ação no alimento, estende o período de validade do produto.

O sistema de embalagens antimicrobianas pode ser de dois diferentes tipos: contato direto da embalagem com o produto ou sem contato direto, contendo um espaço livre na embalagem. São utilizados vários agentes antimicrobianos para incorporação na embalagem, entre eles os óleos essenciais. Os óleos essenciais por serem altamente voláteis são ideais para compor embalagens ativas antimicrobianas na qual não entra em contato direto com o alimento. Neste caso, a principal etapa do mecanismo de migração do composto ativo da embalagem para o produto, é a evaporação ou distribuição equilibrada do composto antimicrobiano através do espaço livre no interior da embalagem (QUINTAVALA & VICINI, 2003).

Existem alguns estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana de membranas poliméricas incorporadas de complexo de inclusão entre β -ciclodextrina e óleos essenciais, como por exemplo, Wen et al. (2016b) que estudaram a atividade antimicrobiana de nanofibras de PVA Poli(acetato de vinilo) e complexo de inclusão entre β -ciclodextrina e óleo essencial de canela contra *E. coli* e *S. aureus*, através da técnica de disco-difusão, e obtiveram resultado de diâmetro da zona de inibição de

28,9 mm para e *Escherichia coli* e 30,5 mm para *Staphylococcus aureus*, sendo mais eficiente que o controle positivo com sulfato de kanamicina com 28,2 e 24,1 mm, respectivamente.

Sendo assim, os compostos ativos utilizados para compor as embalagens ativas antimicrobianas para alimentos devem ser autorizados pela regulamentação vigente como produtos aprovados para contato com alimentos. Nas embalagens antimicrobianas onde ocorre a migração do composto para o alimento, alterando sua composição, estes devem estar presentes na lista de aditivos de grau alimentício, garantindo assim a segurança do produto embalado (JONG, et al., 2005)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Zeína e β -ciclodextrina (99%) foram adquiridos de Sigma Aldrich, (Brasil). Álcool etílico absoluto 99,5% P.A. foi adquirido da CRQ Produtos Químicos LTDA. A matéria prima utilizada para a extração do óleo essencial foram folhas de eucalipto, coletadas no mês de junho de 2015 de árvores adultas classificadas como pertencentes à espécie *Eucalyptus citriodora*, localizadas na região sul do Rio Grande do Sul, no município de Canguçu (latitude: 31° 23' 44"/longitude: 52° 41' 11"). Os meios de cultura utilizados foram Müller Hinton (MH) e Brain Heart Infusion (BHI), adquiridos de Sigma Aldrich. Todos os reagentes utilizados foram de alta pureza.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração do óleo essencial de eucalipto (OEE)

Para o processo de extração do óleo essencial as folhas de eucalipto foram congeladas e trituradas, objetivando um aumento da superfície de contato que resulta em um maior rendimento do processo. O método utilizado foi o de hidrodestilação em equipamento *clevenger* seguindo as especificações definidas por Dannenberg et al., (2016). Em um balão com capacidade para 2L foram adicionados cerca de 300 g das folhas de eucalipto trituradas e 1L de água destilada, o balão foi então conectado ao equipamento *clevenger* e aquecido até temperatura de ebulição (100°C) por uma manta de aquecimento durante 2h. Após sua obtenção o óleo essencial de eucalipto foi desidratado por filtração em funil com Sulfato de sódio (Na_2SO_4), e armazenado a -20°C (± 2) em frasco de vidro âmbar devidamente vedado com parafilme, até o momento das análises.

4.2.2 Caracterização do OEE

4.2.2.1 Composição química

A composição química do OEE foi realizada utilizando-se um vial de 1,5 mL onde foram misturados 20 μL do óleo essencial de eucalipto com 480 μL de hexano

e 50 µL de uma solução de 1-nonanol em hexano (5 mg.mL⁻¹). A amostra foi preparada em duplicata e cada replicata foi injetada duas vezes em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectro de massas (GC-MS) (SHIMADZU QP2010 Ultra, Japan, 2010) utilizando um autoinjeter AOC-20i) e a biblioteca de espectro de massas National Institute of Standards and Technology (NIST, 2011). Os parâmetros de injeção, cromatografia e espectrometria de massas foram configurados segundo Juliani e Simon (2008). Uma alíquota de 1 µL de amostra foi injetada com temperatura do injetor a 200 °C, no modo splitless. Hélio como gás carreador com fluxo de 1,08 mL.min⁻¹ e velocidade linear como modo de controle de fluxo foram utilizados. A coluna capilar utilizada foi Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com programação isotérmica por 1 min a 60 °C, rampa de temperatura de 5 °C.min⁻¹ até 180 °C mantida por 1 min. A temperatura da fonte de íons e interface foram ajustadas em 200 °C, e a faixa de varredura de massas foi de 40 a 450 m/z e 0,2 escaneamentos por segundo. Para determinação do índice de tempo de retenção foi utilizada uma série homóloga de alcanos e o cálculo do índice de retenção foi realizado automaticamente pelo software do equipamento. A quantificação foi realizada em relação ao padrão interno (1-nonanol).

4.2.2.2 Atividade antimicrobiana do OEE

A atividade antimicrobiana do OEE foi avaliada frente a 7 bactérias de relevância em alimentos, sendo 3 Gram positivas: *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778); e 4 Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442).

4.2.2.2.1 Difusão em ágar

O espectro de ação do OEE foi avaliado pela técnica de disco difusão (CLSI, 2012a). Placas com Agar Mueller-Hinton (MH - Oxoid®) foram inoculadas em superfície com suspensões celulares das bactérias (aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC.g⁻¹ - 0,5 McFarland). Discos de papel estéreis (Laborclin®) foram dispostos

sobre o ágar e impregnados com 10 µL do OEE. O sistema foi incubado por 24 horas a 37 °C, e o diâmetro dos halos de inibição foram aferidos com paquímetro digital (King.tools®). Um controle negativo com os discos adicionados de água destilada foi utilizado. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.2.2.2 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEE foi determinada através do teste de micro-diluição em caldo utilizando placas estéreis com 96 poços (CLSI, 2012b). O OEE foi diluído em caldo Brain Heart Infusion (BHI-Oxoid®) adicionado de 3% de tween 80 (Vetec®), obtendo concentrações de 50 a 0,10 µL.mL⁻¹. As bactérias foram inoculadas obtendo a concentração final de 10⁴ UFC.mL⁻¹, por poço de placa. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e a leitura dos resultados realizada em espectrofotômetro de placas (Robonik® Readwel plate) a 625 nm, considerando como CIM a maior diluição onde não houve crescimento celular. Como controle negativo de crescimento foi utilizado BHI com OEE (50 µL/mL) sem a inoculação da bactéria, e como controle positivo de crescimento foi utilizado BHI inoculando as bactérias sem a adição do OEE. (Ojeda-Sana et al., 2013).

4.2.2.2.3 Concentração bactericida mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada inoculando alíquotas de 10 µL de cada poço da placa de microdiluição onde houve inibição no teste da CIM (Item 4.2.2.2.2) em ágar BHI. Considerando como CBM a menor concentração onde não houve crescimento neste meio após 24 h a 37 °C (Ait-Ouazzou et al., 2011).

A partir dos resultados das análises anteriores foram selecionadas 2 bactérias mais sensíveis a ação do OEE (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*), ou seja, as bactérias com menor CBM, para continuar as análises seguintes.

4.2.2.2.4 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

A atividade antimicrobiana por ação dos voláteis foi determinada pela técnica de micro-atmosfera proposta por Ghabraie et al., (2016). Alíquotas de 0,1 mL de suspensões celulares (10^3 UFC.mL⁻¹) de *L. monocytogenes* e *S. aureus* foram inoculadas na superfície de placas com Agar BHI (15 mL – camada de 6 mm). Na tampa de cada placa foram posicionados discos de papel estéreis nos quais foram adicionados diferentes volumes do OEE (50, 30, 20, 10, 5, e 2 µL), as placas foram imediatamente fechadas de modo invertido (tampa para baixo), e incubadas a 37 °C por 24 h. A ação antimicrobiana foi expressa pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos com o OEE comparados com um controle contendo água estéril. A análise foi realizada em triplicata.

4.2.3 Preparo do complexo de inclusão

O complexo de inclusão (CI) entre o óleo essencial de *Eucalypto citriodora* (OEE) e β-ciclodextrina (β-CD) foi preparado conforme Bhandari, D'Arcy e Bich, (1998) e Petrović et al. (2010), com algumas modificações. Pesaram-se aproximadamente 2 g de β-CD e dissolveu-se em 50 mL de água destilada à 35°C mantida sobre uma placa de aquecimento. Em seguida cerca de 1,5 g de OEE foi adicionado à solução de β-CD quente (35°C). A mistura foi mantida sob agitação magnética constante por 3 h a 35°C. Após a temperatura da solução diminuir espontaneamente até a temperatura ambiente (23 ± 2°C) esta foi refrigerada a 4°C por 24 h. O precipitado da solução fria (4°C) foi então lavado com álcool etílico 99% e posto em estufa a 40°C para secagem por 24 h. O complexo obtido foi armazenado em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração.

4.2.4 Preparo da mistura física

A mistura física (MF) do OEE e β-CD foi preparada na mesma proporção do complexo de inclusão (75:100, respectivamente), homogeneizada com auxílio de gral e pistilo.

4.2.5 Caracterização do complexo de inclusão e da mistura física

4.2.5.1 Grupos funcionais

A espectroscopia de infravermelho da β -CD, OEE, MF e do CI foi investigada utilizando espectrômetro com transformada de Fourier (IRPrestige21, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras foram preparadas utilizando a técnica de discos de KBr (Brometo de potássio). A análise dos espectros foi feita na região do infravermelho médio com intervalo de número de onda de 4000-5000 cm^{-1} e resolução espectral de 4 cm^{-1} . Os sinais foram processados utilizando o software GRAMS (Galactic Industries Corp., Salem, NH, EUA).

4.2.5.2 Morfologia

A morfologia das amostras de β -CD, OEE, MF e CI foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6610LV, USA). Uma pequena porção das amostras foi colocada na superfície de um *stub* e subsequentemente revestida com ouro através de um revestidor por crepitação. As imagens foram analisadas no microscópio eletrônico utilizando uma voltagem de aceleração de 10kV e uma ampliação de 800x e 2000x.

4.2.5.3 Propriedades térmicas por DSC

As propriedades térmicas das amostras de β -CD, OEE, MF e CI foram investigadas através da análise por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC model 2010, TA Instruments, New Castle, USA) ao qual identifica a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_f) e os valores de fusão (ΔH_f) do CI em comparação com o OEE, β -CD e a MF. A análise foi realizada sob atmosfera com nitrogênio gasoso a uma taxa de fluxo de 50 mL/min e taxa de aquecimento de 10°C/min com uma massa de aproximadamente 3,0 mg. As amostras foram seladas em painéis de alumínio fechadas hermeticamente e aquecidas a partir de 30°C até 300°C.

4.2.5.4 Propriedades térmicas por análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica da β -CD, OEE, MF e da CI foi observada através de um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). A amostra (cerca de 5 mg) foi aquecida em cápsulas de platina numa faixa de 30 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e um fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹. Uma cápsula de platina vazia foi utilizada como referência.

4.2.6 Preparo e avaliações das soluções poliméricas de zeína utilizadas para o *electrospinning*

Soluções de zeína foram preparadas dissolvendo-se 2, 3 e 4 g de polímero em 10 mL de etanol aquoso 70% (v/v), obtendo-se soluções com concentrações de 20, 30 e 40% (p/v), respectivamente. Em seguida deixou-se sob agitação por 1 h utilizando agitador magnético (FISOTOM, MODELO 752/6). Para a avaliação da viscosidade aparente das soluções foi utilizado um viscosímetro digital Brookfield (Model DV – II, USA). As soluções (aproximadamente 9 mL) foram colocadas em recipiente de aço inoxidável do viscosímetro e este foi acoplado ao equipamento utilizando um spindle n°18. A condutividade elétrica das soluções foi determinada através de um condutivímetro (Medidor CON500) expresso em μ S/cm. Todas as medidas foram feitas a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e em triplicata.

4.2.7 Produção de fibras ultrafinas de zeína pela técnica de *electrospinning*

Foram feitos testes preliminares para avaliação dos melhores parâmetros de produção das fibras ultrafinas. Os parâmetros testados foram: taxa de alimentação da bomba infusora, distância da ponta da agulha ao coletor, tamanho da agulha e tensão aplicada. As fibras ultrafinas obtidas foram avaliadas em microscópio ótico, com o objetivo de verificar a homogeneidade e presença de *beads* nas fibras. A taxa de alimentação de 1 mL/h, a distância da agulha até o coletor de 15 cm, diâmetro de agulha de 0,7 mm e a tensão em torno de 20kV foram os parâmetros mais adequados para a produção de fibras ultrafinas sem *beads* e homogêneas. A partir disto, esses foram os parâmetros utilizados para a produção de fibras ultrafinas com diferentes concentrações de zeína. As soluções poliméricas foram colocadas em seringas de 1 mL e uma bomba de infusão de seringa (kd Scientific) controlou a taxa

de fluxo da solução polimérica. O processo de *electrospinning* foi realizado através da utilização de um eletrodo positivo, conectado a uma fonte de alta tensão com corrente contínua (INSTOR – Projetos & Robótica), com uma tensão de cerca de 20kV, ao qual foi acoplado diretamente na ponta da agulha metálica na saída da seringa e um eletrodo negativo foi conectado a um alvo metálico coberto com folha de alumínio posicionado no sentido horizontal à bomba de infusão a uma distância de 15 cm da ponta da agulha até o alvo, para a deposição das fibras. No decorrer do processo a temperatura ambiente foi controlada a 23 ± 2 °C pelo condicionador de ar e a umidade relativa ficou em $45 \pm 2\%$ controlada por um desumidificador. As fibras ultrafinas foram formadas em função da atração e transporte da solução polimérica ao alvo metálico.

4.2.8 Avaliações das fibras ultrafinas de zeína

4.2.8.1 Morfologia e distribuição de diâmetro

A morfologia das fibras ultrafinas foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6610LV, USA). Uma pequena porção das nanofibras foi colocada na superfície de um *stub* e subsequentemente revestida com ouro através de um revestidor por crepitação. As imagens foram analisadas no microscópio eletrônico utilizando uma voltagem de aceleração de 10kV e uma ampliação de 1000x e 3000x. O diâmetro médio e a distribuição do diâmetro das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de zeína foram avaliados a partir das imagens do MEV, sendo medidas cerca de 50 fibras, através do programa *ImageJ*.

4.2.9 Preparo e avaliações das soluções poliméricas com a incorporação do complexo de inclusão

Para as soluções com o complexo de inclusão adicionou-se este, em diferentes concentrações (6, 12, 18 e 24% (p/v)), diretamente na solução de zeína escolhida como padrão pelos melhores resultados na formação de fibras ultrafinas. Soluções de zeína foram preparadas dissolvendo-se 3 g de polímero em 10 mL de etanol aquoso 70% (v/v), obtendo-se soluções com concentrações 30% (p/v). Em seguida adicionou-se o complexo de inclusão nas concentrações de 6, 12, 18 e 24% (m/v) e deixou-se sob agitação por 1 h utilizando agitador magnético (FISOTOM,

MODELO 752/6 SERIE 1521638). A viscosidade aparente das soluções foi avaliada através de viscosímetro digital Brookfield (Model DV – II, USA). As soluções (aproximadamente 9mL) foram colocadas em recipiente de aço inoxidável do viscosímetro e este foi acoplado ao equipamento utilizando um spindle nº18. Todas as medidas foram feitas em triplicata e a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). A condutividade elétrica das soluções foi determinada através de um condutivímetro (Medidor CON500) expresso em $\mu\text{S}/\text{cm}$. Todas as medidas foram feitas a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e em triplicata.

4.2.10 Produção de fibras ultrafinas de zeína com a incorporação do complexo de inclusão

Conforme descrito no item 4.2.7

4.2.11 Avaliações das fibras ultrafinas de zeína com a incorporação do complexo de inclusão

4.2.11.1 Morfologia e distribuição de diâmetro

Conforme o item 4.2.8.1

4.2.11.2 Propriedades térmicas por análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das fibras ultrafinas, assim como dos compostos puros (zeína pó, β -CD e OEE), foi avaliada através de um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras (aproximadamente 5 mg) foram aquecidas em cápsulas de platina numa faixa de 30 a 600 $^\circ\text{C}$, com taxa de aquecimento de 10 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ um fluxo de nitrogênio de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Uma cápsula de platina vazia foi utilizada como referência.

4.2.11.3 Grupos funcionais

A interação entre a zeína, β -CD, OEE nas fibras ultrafinas foi investigada utilizando espectrômetro com transformada de Fourier (FTIR – ATR) (IRPrestige21, Shimadzu, Japão). A análise dos espectros foi feita na região do infravermelho

médio com intervalo de número de onda de 4000-5000 cm^{-1} e resolução espectral de 4 cm^{-1} . Os sinais foram processados utilizando o software GRAMS (Galactic Industries Corp., Salem, NH, EUA).

4.2.11.4 Atividade antimicrobiana das fibras ultrafinas com CI, em micro-atmosfera

A atividade antimicrobiana das fibras ultrafinas foi avaliada pela técnica de micro-atmosfera (Ghabraie et al., 2016). Placas contendo ágar BHI foram inoculadas com suspensões celulares (10^3 UFC.mL^{-1}) de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Nas tampas das placas foram dispostas aproximadamente 200 mg de cada fibra. As placas foram fechadas e invertidas (tampa para baixo) evitando o contato da fibra ultrafina com o ágar e incubadas a 37°C por 24 h. Os resultados foram expressos em percentual de inibição, calculados pelas diferenças entre as contagens de UFC dos tratamentos e do controle sem fibra ultrafina.

4.3 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do óleo essencial de eucalipto

5.1.1 Composição química

A análise de CG-MS do óleo essencial de eucalipto revelou a presença de 29 compostos químicos (Tabela 1). O constituinte majoritário do óleo essencial foi o citronellal (63,77%) seguido do isopulegol (14,09%), citronellol (13,67%), β -pinene (1,76%) e cyclohexanol-5-methyl (1,04%), sendo que o restante dos compostos encontrados ficou abaixo de 1%. Singh et al. (2012) ao realizarem cromatografia gasosa também do óleo essencial de *E. citriodora* encontraram resultados semelhantes a este estudo. Por outro lado, Elaissi et al. (2012) ao analisar a composição química de 20 espécies diferentes de eucalipto, incluindo *E. citriodora*, encontraram 1,8-cineol (54%) e α -pineno (23%) como principais constituintes deste

óleo essencial. Vários são os fatores que determinam a composição química de um óleo essencial, assim como seu composto majoritário, de uma mesma espécie como localização, tipo de solo, idade das folhas e o método de extração do óleo essencial.

A Tabela 1 apresenta os compostos químicos encontrados no óleo essencial de eucalipto (*E. citriodora*) e seus respectivos tempos de retenção.

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial *Eucalyptus citriodora*.

Composto químico	Tempo de retenção (min)	Concentração (%)
Hexanal	2,96	0,129
3-methylcyclopentanol	3,54	0,038
<i>trans</i> -2-hexenal	3,70	0,842
1-hexanol	3,91	0,246
propanoic acid	4,75	0,2
α -pinene	5,24	0,323
β -phellandrene	6,10	0,058
β -pinene	6,20	1,76
Limonene	7,45	0,239
Eucalyptol	7,53	0,317
2,6-dimethyl-5-heptenal	8,07	0,233
γ -terpinene	8,24	0,136
4-carene	9,06	0,129
1,6-octadien-3-ol	9,32	0,492
tetrahydro-4-methyl	9,65	0,207
Isopulegol	1,72	14,09
Citronelal	11,00	63,77
5-caranol	11,62	0,343
α -terpineol	11,97	0,136
citronellol	13,01	13,67
7-octenoic acid	15,31	0,129
cyclohexanol-5-methyl	15,97	1,04
2 6-dimethyl-2 cis-6-octadiene	16,42	0,155
<i>trans-p</i> -menthane-3,8-diol	16,55	0,233
citronellic acid	17,46	0,22
2-phenylethyl 2-methylpropanoate	17,63	0,097
<i>cis</i> -3-methyl-2-(2-pentenyl)-2-cyclopenten-1-one	17,77	0,071
2,8,8-trimethyl-4-methylene-2-vinylbicyclo[5.2.0]nonane	18,39	0,667

5.1.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto

5.1.2.1 Difusão em ágar, CIM e CBM

O OEE apresentou atividade antimicrobiana para as 7 bactérias testadas (Tabela 2), com halos de inibição de até 39,64 mm de diâmetro (*P. aeruginosa*), e com atividade bacteriostática na concentração mínima de 0,20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (*L. monocytogenes*). As bactérias Gram positivas foram mais sensíveis a ação do OEE do que as Gram negativas. Dentre as Gram positivas, *L. monocytogenes* foi a mais sensível, com CBM de 0,78 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, enquanto *P. aeruginosa* foi a mais sensível dentre as Gram negativas, que apresentou CBM de 12,50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (Tabela 2).

A maior sensibilidade das bactérias Gram positivas, quando comparada às Gram negativas, é uma característica relatada na grande maioria dos trabalhos realizados com óleos essenciais, e se explica pelas diferenças existentes entre a parede celular destes dois grupos de bactérias. Bactérias Gram negativas possuem uma dupla camada fosfolipídica externa, composta por lipopolissacarídeos, conseqüentemente pelo caráter hidrofóbico desta estrutura, os compostos apolares dos óleos essenciais encontram dificuldade para penetrar na célula bacteriana. Enquanto nas bactérias Gram positivas 90 a 95% da parede celular é composta por peptidoglicano, facilitando a penetração de componentes apolares (NAZZARO et al., 2013).

A Tabela 2 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana por disco difusão, CIM e CBM do OEE frente a diferentes bactérias patogênicas.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana por disco difusão, CIM e CBM do OEE frente a diferentes bactérias.

Bactéria	ATCC	Halo de inibição (mm)	CIM (µL/mL)	CBM (µL/mL)
Gram positivas:				
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	21,52 ± 0,41	0,20	0,78
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	32,71 ± 3,19	0,78	1,56
<i>Bacillus cereus</i>	11778	19,66 ± 0,50	1,56	1,56
Gram negativas:				
<i>Escherichia coli</i>	8739	14,37 ± 0,64	6,25	50,00
<i>Salmonella Typhimurium</i>	14028	12,59 ± 0,36	6,25	> 50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442	39,64 ± 0,31	3,13	12,50
<i>Shigella dysenteriae</i>	13313	15,65 ± 0,41	6,25	25,00

Resultados expressos em média ± desvio padrão, para o halo de inibição.

CIM = Concentração inibitória mínima

CBM = Concentração bactericida mínima

5.1.2.2 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

No ensaio de atividade antimicrobiana em micro-atmosfera, o OEE mostrou-se ativo contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Figura 6), promovendo reduções significativas ($p \leq 0,05$) no desenvolvimento destes patógenos sem a necessidade de um contato direto, agindo exclusivamente por ação dos voláteis. Concentrações de 0,03, 0,06 e 0,13 µL/cm³ de OEE nas placas de petri, promoveram reduções de 34, 37 e 63 % nas contagens de células viáveis de *S. aureus*, e de 27, 37 e 47% para *L. monocytogenes*, respectivamente. Enquanto que as concentrações de 0,25, 0,38 e 0,63 µL/cm³ do OEE resultaram em reduções de 100% nas contagens de células viáveis de ambos os patógenos.

Em micro-atmosfera, os componentes antimicrobianos dos óleos essenciais volatilizam formando uma fase de vapor, a qual atinge as células bacterianas diretamente sem necessidade de difusão no meio em que a bactéria se encontra (ágar). Nos ensaios em meio sólido e líquido (ágar e caldo), existe a interferência da capacidade de difusão/dispersão dos componentes do óleo essencial no meio, que não é favorável para óleo essencial, uma vez que são constituídos por substâncias apolares enquanto os meios usuais (ágares e caldos) são formados por base aquosa (GHABRAIE et al., 2016). A atividade antimicrobiana demonstrada pelo OEE em fase de vapor permite prospectar sua aplicação em polímeros, como as

nanofibras de zeína, visando a utilização deste sistema como “sachê” antimicrobiano para alimentos em embalagens fechadas.

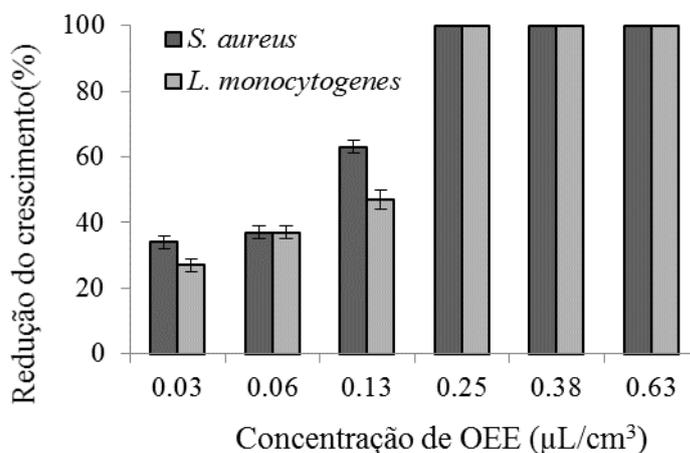


Figura 6 - Atividade antimicrobiana de OEE por ação de voláteis sobre o crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Os resultados são expressos como média ($n = 2$) e a barra nas colunas é o desvio padrão.

5.2 Caracterização do complexo de inclusão e da mistura física

5.2.1 Grupos funcionais

O espectro FTIR da β -CD, OEE, CI e da MF estão apresentados na Figura 7.

O espectro FTIR da β -CD pura (Figura 7) apresentou bandas características em 3408 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} correspondentes a vibrações de alongamento de grupos O-H e C-H, respectivamente. Bandas de absorção em 1652 cm^{-1} , 1153 cm^{-1} , 1031 cm^{-1} e 934 cm^{-1} correspondem a flexão de H-O-H, estiramento de grupos C-O, estiramento simétrico de C-O-C e vibrações de alongamento de ligações α -1,4, respectivamente (AGUIAR et al., 2014; WEN et al., 2016b; ABARCA, et al., 2016).

Para o OEE puro, o espectro FTIR exibiu bandas características em 3441 cm^{-1} correspondente ao estiramento de O-H dos componentes alcoólicos do óleo essencial. Em 2721 cm^{-1} e 1725 cm^{-1} correspondem a modos de estiramento de C-H e C=O, respectivamente, do citronelal. As bandas de absorção em 1647 cm^{-1} e 1448 cm^{-1} podem estar associadas a vibrações de alongamento de C=C de grupos olefínicos do óleo essencial e um duplete CH_3 e CH_2 de curvatura antissimétrica de tesoura. Várias bandas de absorção comuns a todos os componentes do óleo

essencial foram encontradas, como ligações duplas, grupos metil e metileno (MONTENEGRO et al., 2013).

O espectro referente a mistura física mostrou bandas características tanto da β -CD e do OEE, indicando praticamente nenhuma interação entre as moléculas. Já no espectro do complexo de inclusão pode ser observado que houve uma intensa diminuição das bandas em 2721 cm^{-1} e 1448 cm^{-1} , quando comparado ao espectro do óleo essencial e da mistura física, indicando que estas ligações estão envolvidas na constituição destes complexos (AGUIAR et al., 2014). Resultado semelhante foi encontrado por Galvão et al. (2015) ao realizar complexo de inclusão com β -CD e óleo essencial de laranja, que além da diminuição da intensidade de algumas bandas características do óleo essencial observou também o desaparecimento de outras, indicando a interação do óleo essencial no interior da cavidade da β -CD.

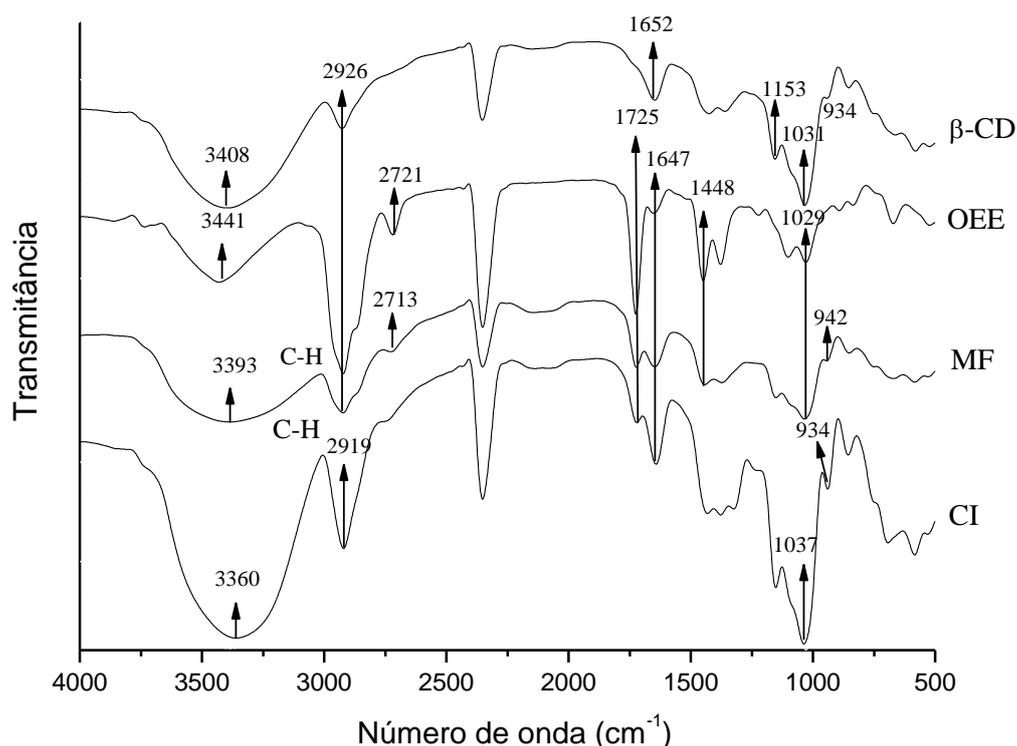


Figura 7 - Espectro FTIR de β -Ciclodextrina (β -CD), óleo essencial de eucalipto (OEE), mistura física (MF) e complexo de inclusão (CI).

5.2.2 Morfologia

A morfologia de superfície da β -CD, da MF e do CI estão apresentados na Figura 8. A β -CD possui uma cavidade hidrofóbica que lhe permite acomodar vários tipos de moléculas hóspedes para formar complexos de inclusão com diferente morfologia (ZHANG et al., 2015).

A β -CD pura apresenta o tamanho da partícula e a forma irregulares (Figura 8 a,b). Por outro lado, o complexo de inclusão (β -CD/OEE) mostrou mudanças na forma das partículas (Figura 8 e,f), indicando uma alteração da estrutura, o que pode indicar a formação de um complexo, o qual também difere da estrutura observada na mistura física (Figura 8 c,d). Em geral, na comparação das imagens observa-se que o complexo de inclusão é estruturalmente distinto da β -CD e da mistura física. Os tamanhos e formas de partículas da β -CD e da mistura física são visualmente diferentes daquelas do complexo de inclusão, o que confirma também a formação de complexo de inclusão entre o OEE e β -CD.

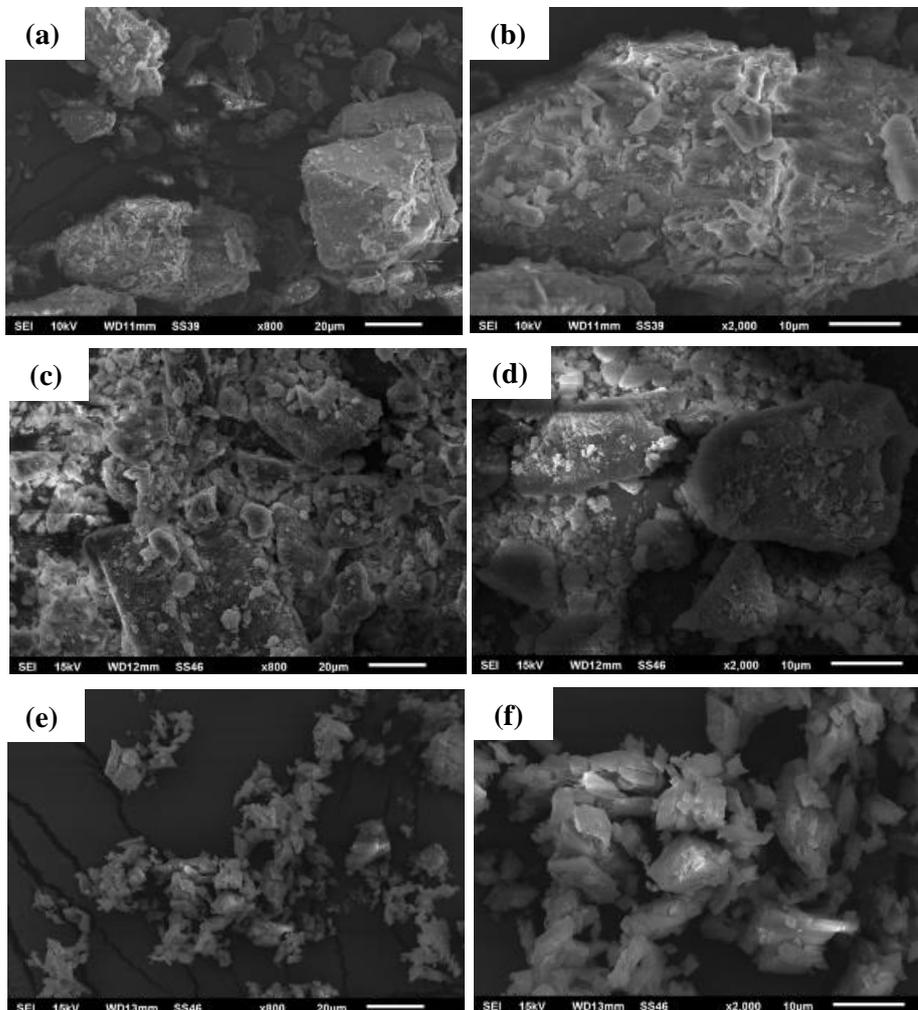


Figura 8 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de β -CD pura (a, b), mistura física de β -CD e OEE (c, d) e CI- β -CD/OEE (e, f) em ampliações de 800x (a, c, e) e 2000x (b, d, f)

Resultado similar foi encontrado por Galvão et al. (2015) que também avaliaram a morfologia de um complexo de inclusão entre β -CD e óleo essencial de laranja e observaram alterações na forma e tamanho de partículas quando comparado com a β -CD pura.

Wen et al. (2016a) estudaram a morfologia (MEV) de complexo de inclusão entre β -CD e óleo essencial de canela e relataram que a β -CD apresentou-se como partículas de diferentes tamanhos em blocos retangulares, enquanto que a amostra em relação ao complexo de inclusão apresentou-se sob a forma de um cristal em multi-camadas. Assim, os resultados mostraram que a morfologia do complexo de inclusão era relativamente diferente da β -CD, constatando a formação de um complexo de inclusão.

5.2.3 Propriedades térmicas por DSC

Análise térmica por DSC é amplamente utilizada para a avaliação de complexos de inclusão. As curvas DSC de todas as amostras são mostradas na Figura 9.

A amostra de β -CD pura apresentou um único pico endotérmico a 144,65°C, o que de acordo com Wang, Cao, Sun & Wang (2011) está relacionado com a perda de água dentro da cavidade hidrofóbica de β -CD. O complexo de inclusão de β -CD-OEE apresentou um pico de alta intensidade a 135,07°C, o que pode ser atribuído à evaporação do OEE (107,78°C), mostrando uma maior estabilidade térmica deste composto, comparado com o óleo essencial livre, e outro pico endotérmico a 145,14°C, atribuído à perda de moléculas de água de β -CD (WEN et al., 2016a). De acordo com Mura (2015), as modificações no pico de forma e temperatura da banda de desidratação da β -CD, coincidindo com o desaparecimento do pico de fusão da molécula convidada, estão relacionadas com a formação do complexo de inclusão.

Para a mistura física (MF), houve dois picos endotérmicos a 107,17°C e 143,19°C, que, segundo Galvão et al. (2015), se referem à evaporação de óleo essencial e liberação de moléculas de água da β -CD, respectivamente.

De acordo com Mura (2015), a presença de dois picos na curva DSC da mistura física referem-se à desidratação de β -CD e ao pico de fusão das moléculas dos outros compostos presentes.

O OEE mostrou um pico endotérmico intenso a 107,78 °C correspondente ao processo de evaporação de compostos de óleo essencial. No entanto, é de notar que as endotermias começam a partir de 66,69°C, coincidindo com a elevada volatilidade do composto (ABARCA, RODRIGUEZ, GUARDA, GALOTTO & BRUNA, 2016).

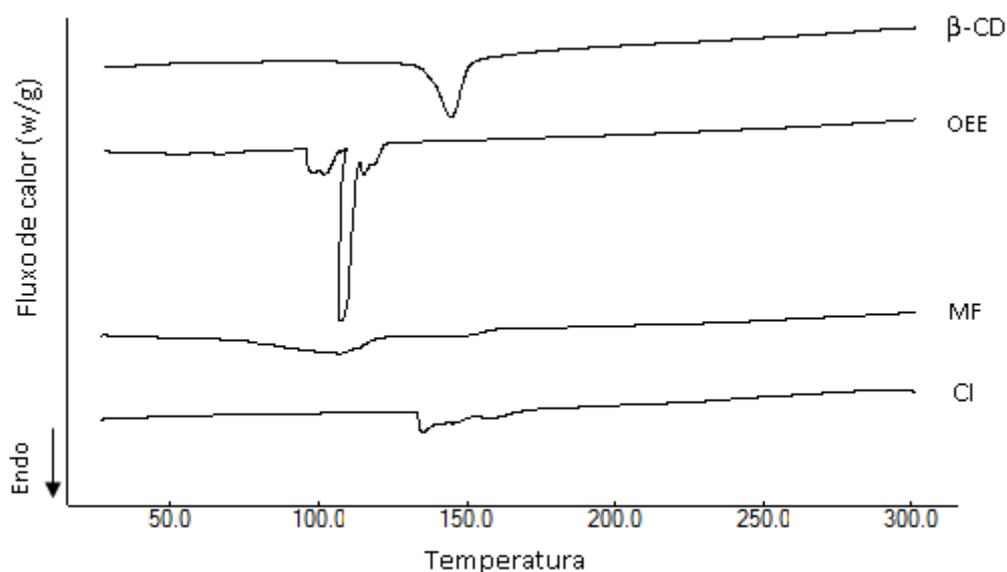


Figura 9 – Curvas de DSC de β -Ciclodextrina (β -CD), óleo essencial de eucalipto (OEE), mistura física (MF) e complexo de inclusão (CI).

5.3 Avaliações das soluções poliméricas de zeína

5.3.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica

Os valores de viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções de zeína em diferentes concentrações estão apresentados na Tabela 3.

A viscosidade das soluções aumentou conforme o aumento da concentração do polímero (Tabela 3). Estes resultados corroboram com os obtidos por Neo et al. (2012), que ao investigarem a influência da solução polimérica na produção de fibras de zeína observaram que quanto maior a concentração do polímero, maior a

viscosidade da solução. Estes autores reportaram que em uma concentração de 15% de polímero não foi possível a formação de fibras, pois a viscosidade é demasiadamente baixa (22,1 mPa) formando apenas microesferas, e com uma concentração de 35% de polímero formaram fibras muito espessas em razão da viscosidade muito elevada (358,0 mPa). Segundo esses autores, a influência da viscosidade da solução na formação de fibras pelo *electrospinning* pode ser explicada devido ao emaranhamento entre as moléculas que é forte suficientemente para estabilizar o jato eletrificado propiciando a formação de fibras ao invés de microesferas. Bhardwaj & Kundu (2010) resumiram em sua revisão dos efeitos da concentração do polímero e viscosidade sobre a morfologia fibras. O aumento da viscosidade da solução tende a evitar a formação de *beads*, enquanto que o diâmetro da fibra aumenta. O grau de emaranhamento da cadeia deve ser suficiente para manter o nível de viscosidade da solução para produzir um jato uniforme durante *electrospinning* e restringir os efeitos da tensão superficial, que desempenha um papel significativo na formação de *beads* em nanofibras pelo *electrospinning*.

Dhanalakshmi et al. (2015) relataram que uma viscosidade ideal é essencial para garantir a estabilidade do jato de solução durante o processo de *electrospinning*. Baixa viscosidade tende a produzir *beads* e não fibras. No presente estudo, a condição mais ideal para a formação de nanofibras de zeína foi com concentração de polímero de 30% e uma viscosidade de 123,4 cP (Tabela 3).

A condutividade elétrica também desempenha um papel fundamental na formação de fibras por *electrospinning*.

Verificou-se que o aumento da condutividade elétrica da solução ocasionou uma diminuição significativa no diâmetro das fibras ultrafinas.

Aumentando a concentração de zeína a condutividade elétrica da solução polimérica não foi afetada (Tabela 3). Geralmente, as proteínas dissolvidas em solução aquosa produzem íons, que são responsáveis para a condutividade elétrica da solução (RAMAKRISHNA et al., 2005). Em vista disso, o aumento na concentração de proteína pode aumentar a condutividade elétrica da solução, no entanto, este comportamento não foi observado no presente estudo.

Ramakrishna et al. (2005) relataram que para iniciar o processo de *electrospinning*, a solução polimérica deve ter carga estática suficiente para estabelecer a força de repulsão que deve exceder a tensão superficial da solução

polimérica. Além disso, o subsequente alongamento do jato do *electrospinning* também é dependente da capacidade da solução em transportar cargas.

Tabela 3: Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções de zeína com diferentes concentrações.

Concentração de zeína (%) ¹	Viscosidade aparente (cP)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
20	$38,9 \pm 2,3^c$	$205,0 \pm 12,5^a$
30	$123,4 \pm 5,7^b$	$192,3 \pm 11,0^a$
40	$373,9 \pm 7,0^a$	$203,6 \pm 7,3^a$

¹ Letras minúsculas distintas na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância.

5.4 Avaliações das fibras ultrafinas de zeína

5.4.1 Morfologia e distribuição do diâmetro

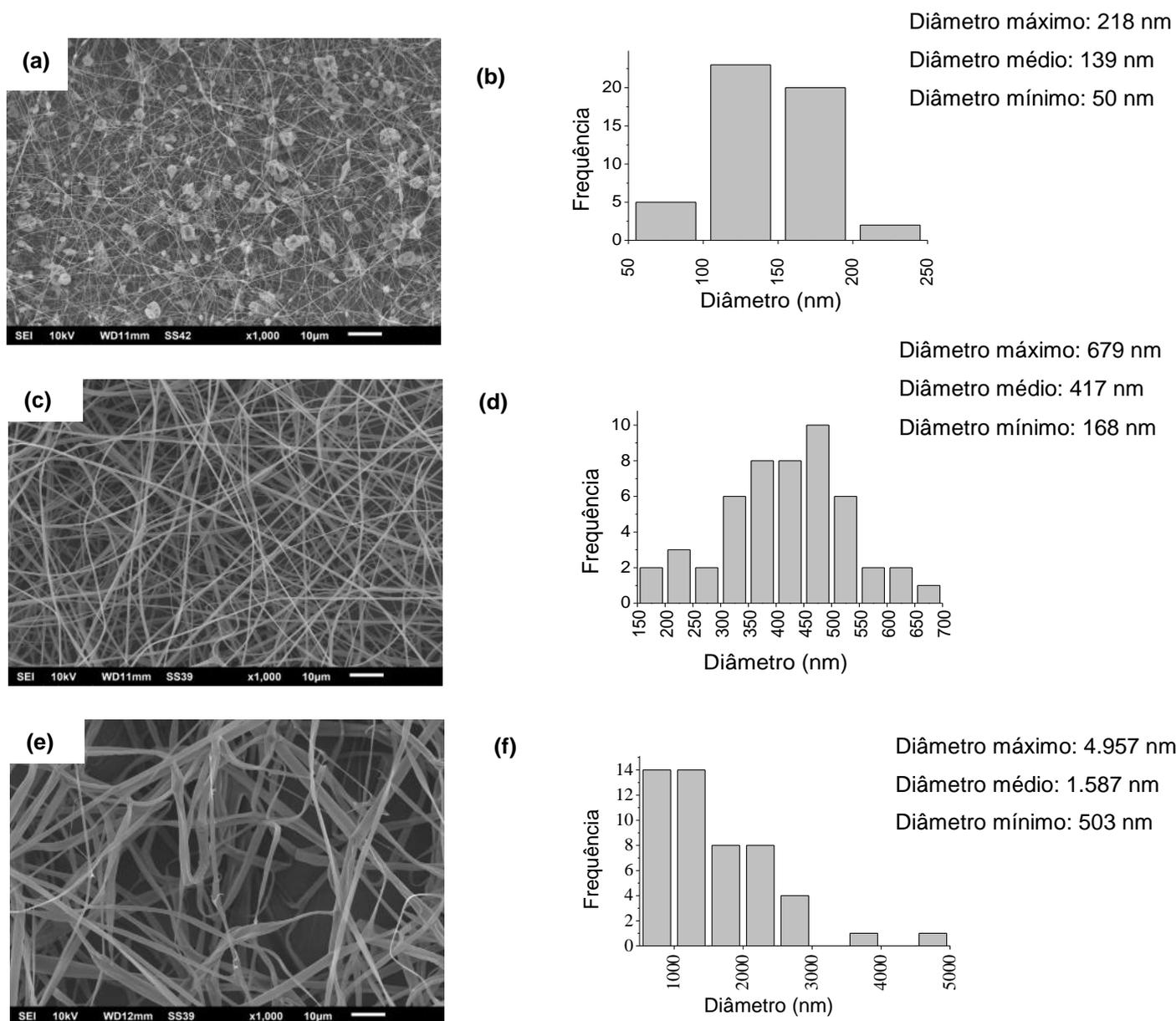


Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e distribuição de diâmetro de fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de zeína. (a, b) 20% (p/v), (c, d) 30% (p/v) e (e, f) 40% (p/v).

A figura 10 apresenta a morfologia e distribuição de diâmetro para as fibras ultrafinas de zeína nas concentrações de 20, 30 e 40%.

As fibras na concentração de 20% (Figura 10a) de polímero apresentaram microesferas ou *beads*, já as fibras obtidas a partir da concentração de 40% (Figura 10c) de zeína apresentaram fibras achatadas. As fibras com 30% (Figura 10b) de polímero na solução, não houve o aparecimento de *beads* e nem de fibras achatadas, apresentando-se de forma cilíndrica e uniforme. A partir destes resultados, a concentração de 30% de zeína foi utilizada na próxima etapa do estudo, ou seja, para produção de nanofibras com diferentes concentrações do complexo de inclusão

5.3 Avaliações das soluções poliméricas com complexo de inclusão

5.3.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica

A viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções de zeína com diferentes concentrações de CI estão apresentadas na Tabela 4.

A adição do CI na solução polimérica de zeína com 30% (p/v) aumentou a viscosidade aparente ($p < 0,05$). O aumento da viscosidade é devido ao maior emaranhamento de cadeias de polímero em solução (AYTAC et al., 2016). Neo et al. (2013) também observaram comportamento semelhante ao incorporar diferentes concentrações de ácido gálico em soluções de zeína para produzir fibras pela técnica de *electrospinning*. Além disso, a condutividade elétrica das soluções diminuiu com o aumento da concentração de CI. A condutividade elétrica é um parâmetro que influencia a densidade da carga líquida transportada pelo jato no processo de *electrospinning*. À medida que essa densidade aumenta os *beads* tornam-se mais pequenos e o diâmetro das fibras menores (GHORANI e TUCKER, 2015). Segundo Wen et al. (2016b) em geral, uma viscosidade mais elevada e condutividade elétrica mais baixa, resulta em um menor estiramento do jato da solução, produzindo assim fibras mais espessas. Porém, no presente estudo, a condutividade elétrica não afetou a morfologia nem o diâmetro médio das fibras com diferentes concentrações de CI.

Tabela 4: Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções de zeína 30% (m/v) com diferentes concentrações de complexo de inclusão OEE/ β -CD.

Concentração de CI-OEE/ β -CD(%) ¹	Viscosidade aparente (cP)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
6	166,7 \pm 2,2 ^c	238 \pm 1,0 ^a
12	178,8 \pm 3,7 ^c	229 \pm 3,6 ^a
18	243,2 \pm 8,2 ^b	205,3 \pm 4,7 ^b
24	306,30 \pm 14,2 ^a	185,0 \pm 2,0 ^b

¹ Letras minúsculas distintas na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância.

5.4 Avaliações das fibras ultrafinas de zeína com complexo de inclusão

5.4.1 Morfologia e distribuição do diâmetro

As imagens de MEV para fibras ultrafinas de zeína com CI em concentrações de 6, 12, 18 e 24% (p/v) e a sua distribuição de diâmetro são mostrados na Figura 11. As fibras ultrafinas com diferentes concentrações de CI apresentaram morfologia homogênea com apenas alguns *beads* (Figuras 11a, 11c, 11e e 11g). Mori et al. (2014), ao incorporar taninos em fibras de zeína também observaram um pequeno número de *beads* ao longo das fibras. Como relatado anteriormente na Tabela 4, a viscosidade aparente das soluções de zeína aumentou com o aumento da concentração de CI. De acordo com Huang et al. (2003), um dos parâmetros que têm maior influência no diâmetro das fibras é a viscosidade da solução de polímero ou a concentração de polímero. Alguns resultados indicaram que uma maior viscosidade resulta num maior diâmetro médio da fibra, mas de acordo com Wen et al. (2016a), que estudaram o efeito da concentração de PLA poli(ácido láctico) sobre o diâmetro médio das fibras produzidas por *electrospinning*, não observaram relação diretamente proporcional entre o aumento da concentração de polímero e o aumento do diâmetro médio da fibra. Em fibras de zeína com CI em diferentes concentrações, o diâmetro médio não aumentou com o aumento de CI. O diâmetro médio mais baixo encontrado foi de 333 nm para fibras com 12% de CI e o diâmetro médio mais elevado foi de 389 nm para fibras com 6% de CI e 18% de CI (Figuras 11d, 11b e 11f).

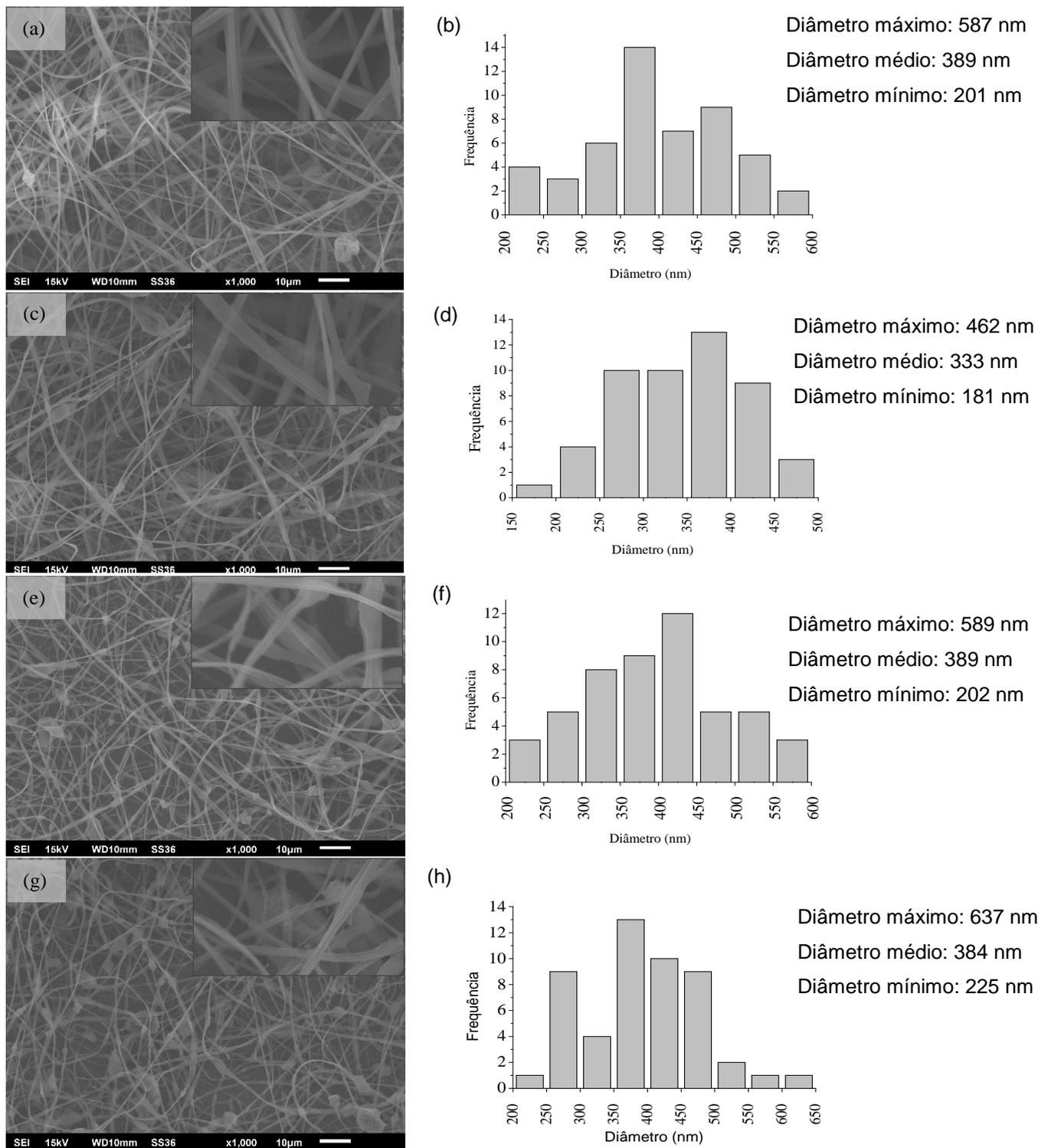


Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e distribuição de diâmetro de fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de complexo de inclusão (CI) OEE/ β -CD. (a, b) fibras ultrafinas de zeína com CI 6% (p/v); (c, d) fibras ultrafinas de zeína com CI 12% (p/v); (e, f) fibras ultrafinas de zeína com CI 18% (p/v); (g, h) fibras ultrafinas de zeína com CI 24% (p/v);

5.6.3 Propriedades térmicas por TGA

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para avaliar a estabilidade térmica das fibras. A Tabela 5 mostra as temperaturas iniciais de decomposição (DTi) e final (DTf) e a perda de massa. A incorporação de CI em fibras ultrafinas de zeína, independentemente da concentração, não influenciou o DTi de fibras ultrafinas de zeína pura. No entanto, em temperaturas entre 250-350°C, as fibras ultrafinas de zeína com 12% de CI exibiram maior perda de massa, ou eram instáveis a altas temperaturas em comparação com as fibras ultrafinas com 0% e 6% de CI.

Para a fibra ultrafina de zeína pura, a perda de massa pode ser atribuída à degradação da proteína (NEO et al., 2013) e clivagem de ligações peptídicas (GORRASSI & VERTUCCIO, 2016). A maior instabilidade térmica das fibras ultrafinas incorporadas de CI com maiores concentrações pode estar relacionada à facilidade de decomposição da β -ciclodextrina em relação à zeína. A β -ciclodextrina apresentou maior perda de massa em comparação com a zeína. Provavelmente, o óleo essencial não foi responsável pela instabilidade da fibra ultrafina após a incorporação do CI, pois este apresenta uma decomposição completa até 150°C (Tabela 5).

Tabela 5: TGA dos constituintes das fibras ultrafinas e das fibras ultrafinas de zeína pura e incorporados com complexo.

Constituintes das fibras ultrafinas	T _{di} (°C)	T _{df} (°C)	Perda de massa (%)
Zeína	256,89	470,31	66,83
β-CD	313,87	364,54	79,26
OEE	30,00	150,00	100,00
Fibras ultrafinas com diferentes Concentrações de CI (%)	T _{di}	T _{df}	Perda de massa de 250-350°C (%)
0	294,40	346,76	55,47
6	291,41	332,31	52,35
12	291,25	338,70	80,71
18%	288,97	329,80	72,09
24%	297,50	339,70	69,29

β-CD= Beta ciclodextrina OEE= Óleo essencial de eucalipto CI= Complexo de inclusão

T_{di}= Temperatura de decomposição inicial

T_{df} = Temperatura de decomposição final

5.6.4 Grupos funcionais

A interação entre a zeína e o complexo de inclusão nas fibras ultrafinas foi investigada através do espectro de FTIR-ATR (Figura 12).

A banda forte de estiramento axial em 3290 cm⁻¹, presente em todos os espectros, está associada às ligações O-H sobreposta à banda de estiramento da ligação N-H, característica das estruturas da molécula de zeína e de alguns grupos alcóolicos do óleo essencial no complexo de inclusão. Banda fraca de estiramento axial em 2.931 cm⁻¹ e 2.940 cm⁻¹, estão atribuídas a ligação C-H (WEN et al., 2016b).

As bandas de estiramento axial em 1645 cm⁻¹, deformação angular simétrica em 1534 cm⁻¹ (no espectro da fibra de zeína sem CI) e estiramento médio 1527 cm⁻¹ (nos espectros da fibra de zeína com CI) estão atribuídas a ligação C=O da amida I, ligação N-H e C-N da amida II, respectivamente. Pode-se observar que a banda em 1534 cm⁻¹ na fibra de zeína sem CI foi deslocada nas fibras com CI para região de 1527 cm⁻¹ mostrando que a aplicação de CI aumentou a estabilidade da estrutura fibrosa na região da ligação N-H e C-N referentes à amida II. Essas frequências da amida I e II dependem do tamanho da estrutura α-hélice, ou seja, quanto maior o comprimento helicoidal maior a estabilidade estrutural, o que faz com que haja um

deslocamento da banda para uma região de menor comprimento de onda, esta estabilidade está diretamente relacionada com o aumento das interações tipo ligações de hidrogênio ocorrendo no grupamento C=O (TORRES-GINER et al., 2008; MOOMAND; LIM, 2015; DASHDORJ et al., 2015). Neste espectro ainda observa-se bandas em 1160 – 1030 cm^{-1} referentes ao estiramento assimétrico da ligação C-O-C, e estiramento axial da ligação C-O, característica de estruturas polissacarídeas (DASHDORJ et al., 2015).

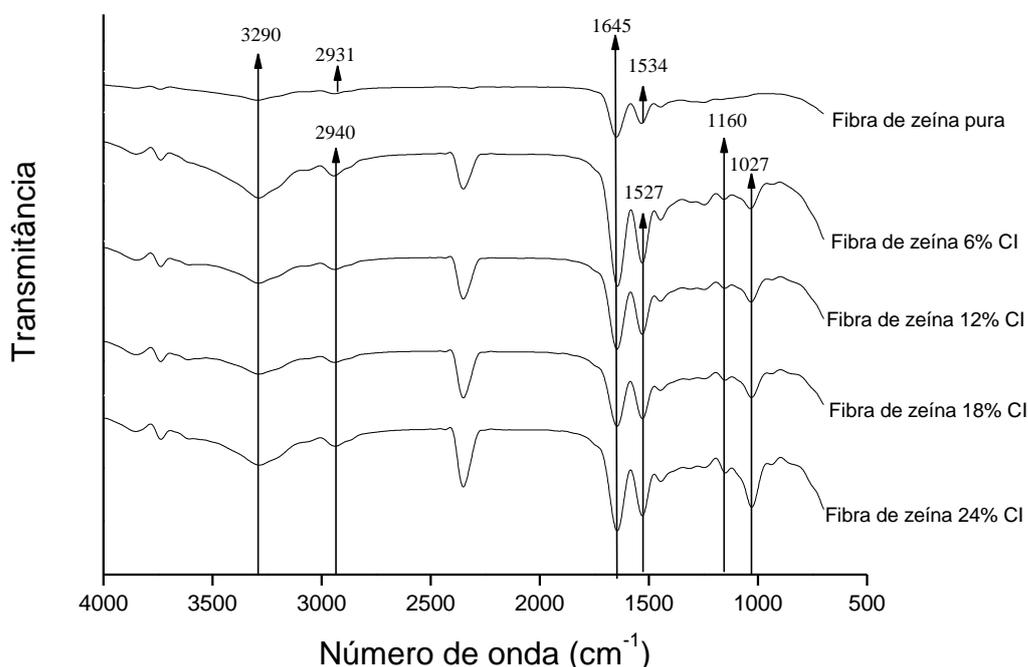


Figura 12 - Espectro ATR-FTIR de fibras ultrafinas de zeína pura e com CI em diferentes concentrações.

5.6.5 Atividade antimicrobiana das fibras ultrafinas de zeína com complexo de inclusão, em micro-atmosfera

A adição de CI em todas as concentrações testadas (6, 12, 18 e 24%) proporcionou atividade antibacteriana nas fibras ultrafinas para promover reduções significativas no crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Figura 13).

A fibra ultrafina de zeína, sem a adição de CI, não afetou o crescimento de bactérias avaliadas em micro-atmosfera. O aumento da concentração de CI resultou

em um aumento da porcentagem de inibição, atingindo reduções de 24,3% e 28,5% para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente, na concentração máxima avaliada de 24% de CI.

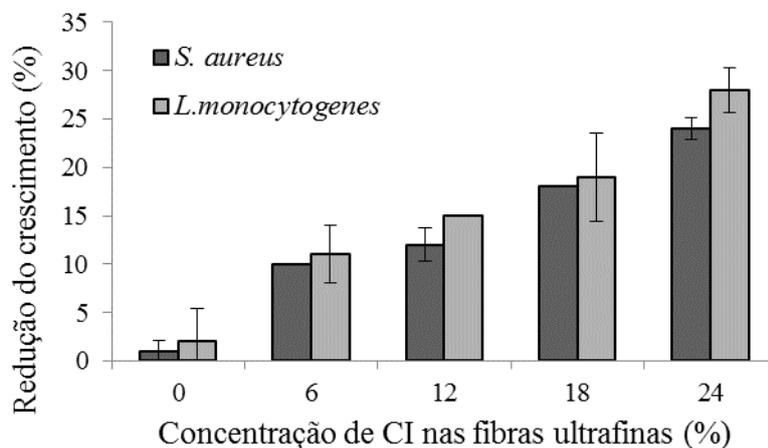


Figura 13 - Redução do crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* por ação dos voláteis do OEE nas fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de CI, em comparação com o controle (fibras sem CI). Os resultados são expressos como média (n = 4) e a barra nas colunas é o desvio padrão.

Wen et al. (2016a) realizaram testes antimicrobianos de disco difusão contra *E. coli* e *S. aureus* em nanofibras de PLA (poliácido láctico) e complexo de inclusão de β -ciclodextrina e óleo essencial de canela, produzido por eletrofiação e observaram que o aumento do complexo de inclusão (5, 10 e 15%) também aumentou a zona de inibição (1,6; 2,3 e 2,7 cm), sugerindo uma maior inibição do crescimento dos microrganismos testados. Deste modo, as fibras ultrafinas de zeína com CI- β -CD/OEE têm potencial de aplicação em embalagens ativas para alimentos, podendo ser utilizadas como sachê dentro da embalagem, uma vez que os voláteis mostraram atividade antimicrobiana.

6 Conclusões

Os resultados indicaram atividade antimicrobiana do OEE contra todas as bactérias Gram positivas e Gram negativas testadas, quando avaliadas pelos testes de disco difusão, CIM, CBM e micro-atmosfera.

Através da análise dos grupos funcionais e da morfologia, pode-se observar uma efetiva complexação do OEE e da β -CD, através da comparação com a mistura física e os compostos, separadamente.

A melhor concentração de zeína na solução polimérica para formação de fibras foi de 30% (p/v), uma vez que apresentaram as melhores características morfológicas.

As membranas formadas com CI em todas as concentrações testadas reduziram o crescimento das bactérias *S. aureus* e *L. monocytogenes*, sendo que a membrana com concentração de 24% (p/v) de CI foi a que proporcionou maior percentual de redução de crescimento, em micro-atmosfera, com 24,3% e 28,5% para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

As membranas antimicrobianas apresentaram características promissoras para possível aplicação como embalagens ativas antimicrobianas para alimentos, sendo necessários estudos futuros desta aplicação.

A partir dos resultados contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* pode-se sugerir uma aplicação em produtos de derivados lácteos, como queijo ou até mesmo carnes, pois estas são algumas das bactérias de maior incidência nesses produtos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, R. L., RODRÍGUEZ, F. J., GUARDA, A., GALOTTO, M. J., BRUNA, J. E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v. 196, p. 968-975, 2016.
- AGUIAR, U. N.; LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B.; ALMEIDA, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 50-55, 2014.
- ARANA-SÁNCHEZ, A., ESTARRÓN-ESPINOSA, M., OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N., PADILLA-CAMBEROS, E., SILVA-VÁZQUEZ, R., LUGO-CERVANTES, E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H.B.K.) with diferente composition when microencapsulated in beta-cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 585–590, 2010.
- ARAÚJO, P. Blog Dias com árvores. Disponível em: <<http://dias-com-arvores.blogspot.com.br/2005/01/eucalipto-com-aroma-de-limo.html>> Acesso em: 04 de dezembro de 2016.
- ARGOS, P.; PEDERSEN, K.; MARKS, M. D.; LARKINS, B. A. A structural model for maize zein proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 17, p. 9984-9990, 1982.
- AYTAC, Z., KUSKU, S. I., DURGUN, E., UYA, T. Encapsulation of gallic acid/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polylactic acid nanofibers: Release behavior and antioxidant activity of gallic acid. **Materials Science and Engineering**, v. 63, p. 231–239, 2016.
- BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.117-122, 2008.
- BHANDARI, B. R., D'ARCY, B. R., & BICH, L. L. T. Lemon oil to -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1494–1499, 1998.
- BHARDWAJ, N., KUNDU, S. C. *Electrospinning*: A fascinating fiber fabrication technique, **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325 – 347, 2010.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p.1914-1920, 2002.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard — Eleventh Edition, 2012a.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition, 2012b.

DANNENBERG, G. DA S., FUNCK, G.D., MATTEI, F.J., SILVA, W.P. DA, FIORENTINI, Â.M. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius Raddi*) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Inovative Food Science Emerging Technologies**, v. 36, p. 120–127, 2016.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101-109, 2002.

DHANALAKSHMI, M., LELE, A. K, JOG, J. P. *Electrospinning* of Nylon11: Effect of processing parameters on morphology and microstructure. **Materials Today Communications**, v. 3, p. 141-148, 2015.

DIAO, W., HU, Q., ZHANG, H., XU, J. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*). **Food Control**, v. 35, p. 109–116, 2014.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, p. 1-24, 2011.

ELAISSI, A., SALAH, K. H., MABROUK, S., LARBI, K. M., CHEMLI, R., HARZALLAH-SKHIRI, F. Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species' essential oils. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1427-1434, 2011.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FERREIRA, M. P. F. **Embalagens ativas para alimentos: Caracterização e propriedades**. 138 f. 2012. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

FRACETO, L. F.; GONÇALVES, M. M.; MORAES, C. M.; ARAÚJO, D. R.; Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 30 n.5, p. 1203-1207, 2007.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FUNG, D. Y. C.; TAYLOR, S.; KAHAN, J. Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Safety**, v. 1, p. 39-51, 1977.

GALVÃO, J. G., SILVA, V. F., FERREIRA, S. G., FRANÇA, F. R. M., SANTOS, D. A., FREITAS, L. S., ALVES, P. B., ARAÚJO, A. A. S., CAVALCANTI, S. C. H., NUNES, R. S. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14–19, 2015.

GHABRAIE, M., VU, K.D., TATA, L., SALMIERI, S., LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food Science Technology** v. 66, p. 332–339, 2016.

GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of *electrospinning* as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology – Review. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 227-240, 2015.

GONG, L.; LI, T.; CHEN, F.; DUAN, X.; YUAN, Y.; ZHANG, D.; JIANG, Y. An inclusion complex of eugenol into β -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical and antifungal characterization. **Food Chemistry**, v. 196 p. 324–330, 2016.

GORRASSI, G., VERTUCCIO, L. Evaluation of zein/halloysite nano-containers as reservoirs of active molecules for packaging applications: Preparation and analysis of physical properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 66-71, 2016.

HILL, L. E.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (*trans*-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 86-93, 2013.

JONG, A. R.; BOUMANS, H.; SLAGHEK, T.; VAN VEEN, J.; RIJK, R.; VAN ZANDVOORT, M.; **Food and additives and contaminants**, v. 22, n. 10, p. 975, 2005.

JULIANI, H. R.; SIMON, J. E. Chemical Diversity of Lippia multiflora Essential Oils from West Africa. **Journal Essential Oil**, v. 20, p. 49-55, 2008.

KFOURY, M., AUEZOVA, L., GREIGE-GERGES, H., RUELLAN, S., FOURMENTIN, S. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. **Food Chemistry**, v. 164, p. 454–461, 2014.

KAYACI, F.; UYAR, T. Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 558– 568, 2012.

LUO, Y.; ZHANG, B.; WHENT, M.; YU, L. L.; WANG, Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 85, 145–152, 2011.

MARTINS, P. R.; DULLEY, R. D.; RAMOS, S. de F.; NOGUEIRA, E. A.; BARBOSA, M. Z.; ASSUMPÇÃO, R. de; JUNIOR, S. N.; LACERDA, A. L. de S. *Nanotecnologias na indústria de alimentos*. Disponível em: http://www.pucsp.br/eitt/downloads/vi_ciclo_paulomartins_marisabarbosa_nano_puc.pdf. Acesso em: 29/08/2016.

MIHINDUKULASURIYA, S. D. F.; LIM, L. -T. Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 149-167, 2014.

MILLÁS, ANA LUIZA GARCIA. **Instalação da tecnologia de electrospinning para a produção e caracterização de nanofibras de celulose incorporadas com óleos naturais**. 2012. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de Campinas, Campinas, 2012.

MONTENEGRO, L. M. P., GRIEP, J. B., TAVARES, F. C., OLIVEIRA, D. H., BIANCHINI, D., & JACOB, R. G. Synthesis and characterization of imine-modified silicas obtained by the reaction of essential oil of Eucalyptus citriodora, 3-aminopropyltriethoxysilane and tetraethylorthosilicate. **Vibrational Spectroscopy**, v. 68, p. 272– 278, 2013.

MOOMAND, K., LIM, L.-T. Properties of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres under simulated in vitro conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, p. 431–444, 2015.

MORI, C. L. S. DE O.; PASSOS N. A.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C.; MORI, F. A.; CARVALHO, A. G.; FONSECA, A. DE S.; TONOLI, G. H. D. Electrospinning of zein/tannin bio-nanofibers. **Industrial Crops and Products**, 52, 298-304, 2014.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 226-238, 2015.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., MARTINO, L. DE. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, p. 1451–1474, 2013.

NEO, Y. P., RAY, S., EASTEAL, A. J., NIKOLAIDIS, M. G., & QUECK, S. Y. Influence of solution and processing parameters towards the fabrication of electrospun zein fibers with sub-micron diameter. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 645–651, 2012.

NEO, Y. P., RAY, S., JIN, J.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M., NIEUWOUDT, M. K.; LIU, D.; QUECK, S. Y. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1013–1021, 2013.

OJEDA-SANA, A.M., BAREN, C.M. VAN, ELECHOSA, M.A., JUÁREZ, M.A., MORENO, S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, v. 31, p. 189–195, 2013.

PETROV'IC, G. M., STOJANOVI'Ć, G. S., e RADULOVIC, N. S. Encapsulation of cinnamonoil in β - cyclodextrin. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 1382-1390, 2010.

QUINTAVALA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, n. 3, p. 373, 2003.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W.-E.; LIM, T.-C.; MA, Z. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers (5. ed.). Cingapura: **World Scientific**, 2005.

ROONEY, M. L. Blackie Glasgow. Overview of active food packaging. In: **Food packagin**, UK, p. 1-37, 1995.

SATO, J. A. P. **Fabricação e caracterização de sistemas poliméricos nanoestruturados obtidos por meio do uso da técnica de eletrofiação**. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Nanociências e Materiais Avançados) - Universidade Federal do ABC, Santo André, 2011.

SILVESTRE, C.; DURACCIO, C.; CIMMINO, S. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 1766–1782, 2011.

SINGH, H. P., KAUR, S., NEGI, K., KUMARI, S., SAINI, V., BATISH, D. R., KOHLI, R. K. Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (Lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 237-241, 2012.

SIRIPATRAWAN, U e VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films to be used as active food packaging by incorporation with própolis. **Food Hydrocolloids**, doi:10.1016/j.foodhyd.2016.06.001, 2016.

SOARES, N. DE F. F.; SILVA, W. A.; PIRES, A. C. DOS S.; CAMILLOTO, G. P.; SILVA, P. S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 370-378, 2009.

TOLBA, H.; MOGHRANI H.; BENELMOUFFOK A.; KELLOU D; MAACHI, R. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, p. 128-133, 2015.

TORRES-GINER, S.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M. Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 601–614, 2008.

USKOKOVIC, V. Nanotechnologies: what we do not know. **Technology in Society**, v. 29, p. 43-61, 2007.

WANG, J., CAO, Y., SUN, B., & WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1680-1685, 2011.

WEISHEIMER, V., MIRON, D., SILVA, C. B., GUTERRES, S. S., & SCHAPOVAL, E. E. Microparticles containing lemongrass volatile oil: Preparation, characterization and thermal stability. **Pharmazie**, v. 65, p. 885–890, 2010.

WEN, P., ZHU, D., FENG, K., LIU, F., LOU, W., LI, M., ZONG, M., & WU, H. Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. **Food Chemistry**, v. 196, p. 996-1004, 2016a.

WEN, P., ZHU, D.-H., WU, H., ZONG, M.-H., JING, Y.-R., HAN, S.-Y. (2016b). Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. **Food Control**, v. 59, p. 366-376, 2016b.

WESLEY, S. J.; RAJA, P.; RAJ, A. A.; TIROUTCHELVAMAE, D. Review on - Nanotechnology Applications in Food Packaging and Safety. **International Journal of Engineering Research**, v. 3, p. 645-651, 2014.

ZHANG, W.; LI, X.; YU, T.; YUAN, L.; RAO, G.; LI, D.; MU, C. Preparation, physicochemical characterization and release behavior of the inclusion complex of trans-anethole and β -cyclodextrin. **Food Research International**, v. 74, p. 55-62, 2015.

ZHU, G., XIAO, Z., ZHOU, R., ZHU, Y. Study of production and pyrolysis characteristics of sweet orange flavor- β -cyclodextrin inclusion complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 75–80, 2014.