

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



DISSERTAÇÃO

**Ação do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) encapsulado em
fibras ultrafinas de proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína no
controle antimicrobiano *in situ***

Francine Tavares da Silva
Tecnóloga em Alimentos

Pelotas, 2018

Francine Tavares da Silva

**Ação do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) encapsulado em fibras
ultrafinas de proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína no
controle antimicrobiano *in situ***

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)

Dr^a Shanise Lisie Mello El Halal (UFPel)

Pelotas, 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586a Silva, Francine Tavares da

Ação do óleo essencial de gengibre (*Zingiberofficinale*) encapsulado em fibras ultrafinas de proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína no controle antimicrobiano in situ / Francine Tavares da Silva ; Alvaro Renato Guerra Dias, orientador ; Elessandra da Rosa Zavareze, Shanise Lisie Mello El Halal, coorientadoras. — Pelotas, 2018.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Óleo essencial de gengibre. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Encapsulação. 4. *Listeria monocytogenes*. 5. Queijo minas frescal. I. Dias, Alvaro Renato Guerra, orient. II. Zavareze, Elessandra da Rosa, coorient. III. Halal, Shanise Lisie Mello El, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Banca examinadora:

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

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

Dr^a Luciana Prietto – DCTA/UFPEL

**Ao meu bisavô Azambuja, e minha
vó Marilda (*In memorian*) dedico.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por guiar meu caminho sempre!

Aos meus pais e minhas irmãs, por toda união, por sempre me incentivarem a lutar pelos meus sonhos e nunca deixarem me faltar nada.

Ao meu sobrinho Otávio, por me fazer sorrir sempre em todos os momentos.

Ao meu vô Zé por todo carinho e apoio!

À minha bisavó Venilda por todo amor e ensinamentos, por tudo que eu sou.

À minha vó Marilda e meu bisavô Azambuja que não estão mais presentes fisicamente, mas de coração.

Ao meu namorado Thiago, pelo companheirismo, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos!

À minha sogra por todo apoio e carinho!

À toda minha família por todo apoio!

Às minhas grandes amigas, Fernanda, Júlia, Indira, Emanuelle e Marla, obrigada por toda amizade, por sempre estarem do meu lado!

Às minhas amigas e colegas de graduação, Tailise, Suzana, Luciana e Jéssica, obrigada por todo apoio e incentivo sempre!

Ao meu orientador, Álvaro, por todos os ensinamentos, e apoio.

À minha coorientadora, Elessandra, por toda atenção e ensinamentos.

À minha coorientadora e amiga Shanise, por todo ensinamento, boa vontade, e dedicação, sem palavras suficientes para te agradecer, és um exemplo de pessoa.

Aos meus colegas da equipe nano, Laura, Mari, Grazi e Jean, por todo incentivo, vocês fizeram toda diferença para que tudo desse certo, me incentivando sempre a seguir em frente. Meus anjos.

À todas minhas colegas de laboratório que tornaram os meus dias mais alegres!

A todos os colegas do labgrãos por todo carinho e ensinamentos! Cada um foi especial de alguma forma para mim.

Aos colegas de pós-graduação Rosane, Guilherme e Claudio. Por toda ajuda, vocês fizeram toda diferença para que esse trabalho fosse concretizado.

À colega Kamila, do Labmicro, pela parceria de trabalho.

A todos os estagiários do LabGrãos, o qual tenho muito carinho! Em especial ao colega João, por toda ajuda e momentos de muitas risadas.

A todos os professores do Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Muito obrigada!

RESUMO

SILVA, Francine Tavares. **Ação do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) encapsulado em fibras ultrafinas de proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína no controle antimicrobiano *in situ***. 2018. 66p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O controle do crescimento microbiano é de fundamental importância na indústria de alimentos, uma vez que assim pode-se preservar a qualidade do produto e/ou garantir a segurança do alimento. Muitos óleos essenciais foram relatados por possuírem forte atividade antimicrobiana e quando encapsulados podem ser aplicados em embalagens ativas antimicrobianas para alimentos. Embalagens ativas interagem com o alimento diretamente ou pelo espaço livre que com a finalidade de assegurar a qualidade e a segurança durante a vida útil do alimento. O estudo teve como objetivo produzir e caracterizar fibras ultrafinas de proteína isolada de soja (PIS), poli (óxido de etileno) (POE) e zeína, com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (OEG) (*Zingiber Officinale* Roscoe), pela técnica de *electrospinning*, bem como aplicá-las em embalagem para controle de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal. A atividade antimicrobiana foi avaliada contra cinco bactérias (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa*). O OEG, em diferentes concentrações (0, 3, 6, 9 e 12%, v / v) foi encapsulado em fibras ultrafinas utilizando uma mistura polimérica de proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína em uma proporção de 1:1:1 (v/v/v) pela técnica de *electrospinning*. As fibras foram avaliadas quanto à sua morfologia, propriedades térmicas, grupos funcionais, cristalinidade relativa e atividade antimicrobiana por micro-atmosfera. A partir de testes preliminares da análise antimicrobiana a fibra com 12% de OEG foi selecionada para aplicação *in situ* (queijo minas frescal) contra *L. monocytogenes*. O óleo essencial de gengibre teve um rendimento de 3,7% em base úmida, e foi um antimicrobiano efetivo contra todas as bactérias em teste. As fibras produzidas, independentemente da concentração do óleo essencial encapsulado, apresentaram atividade antimicrobiana contra *L.monocytogenes*, e demonstraram morfologia homogênea sem a presença de beads. A adição do OEG alterou ligeiramente as propriedades térmicas das fibras e diminuiu a cristalinidade relativa. O OEG encapsulado em fibras ultrafinas foi eficaz no controle de *L. monocytogenes* em queijo minas frescal por micro-atmosfera durante o armazenamento refrigerado de 12 dias, demonstrando grande potencial de aplicação embalagem ativa de alimentos.

Palavras-chave: óleo essencial de gengibre; atividade antimicrobiana; encapsulação; *Listeria monocytogenes*; queijo minas frescal.

Abstract

SILVA, Francine Tavares. **Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in ultrafine fiber of isolated soybean protein, poly (ethylene oxide) and zein in the antimicrobial control *in situ*.** 2018. 66p. Dissertation (Master degree)– Graduate Program in Food Science and Technology, Agronomy School Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas

The growth control of pathogenic and deteriorating microorganisms is important in the food industry. This control can preserve the quality of the product and / or guarantee the food safety. Several essential oils have been reported for its high antimicrobial activity and, can be applied in active antimicrobial food packaging when encapsulated in fibers. Active packaging interacts with food to ensure the quality and safety during the food shelf life. The objective of this study was to produce and characterize ultrafine fibers from soy protein isolate, poly (ethylene oxide) and zein, with different concentrations of ginger essential oil (GEO (*Zingiber Officinale* Roscoe)), by electrospinning, as well as apply the fibers in the packaging of Minas Frescal cheese for the control of *Listeria monocytogenes*. The antimicrobial activity was evaluated against five bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 01571H7, *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa*). The OEG, in different concentrations (0, 3, 6, 9 and 12%, v/v) was encapsulated in ultrafine fibers using a polymer blend of soy protein isolate, poly (ethylene oxide) and zein in a ratio of 1 : 1: 1 (v/v/v) by electrospinning. The ultrafine fibers were evaluated for its morphology, thermal properties, functional groups, relative crystallinity and micro-atmosphere antimicrobial activity. The fiber selected for application *in situ* (fresh Minas cheese) against *L. monocytogenes* by preliminary tests of the antimicrobial analysis was the fiber with 12% of GEO. The GEO presented yield of 3.7% on wet basis, and showed antimicrobial activity against all bacteria under test. The ultrafine fibers produced, regardless of the concentration of the encapsulated GEO, presented homogeneous morphology without beads. The addition of GEO slightly altered the thermal properties of the fibers and decreased relative crystallinity. Ultrafine fibers encapsulated OEG were effective in *Listeria monocytogenes* control in fresh Minas cheese by micro-atmosphere during refrigerated storage of 12 days, demonstrating great potential to be applied in active food packaging.

Keywords: ginger essential oil; antimicrobial activity; encapsulation, *Listeria monocytogenes*; fresh minas cheese.

Lista de Figuras

Figura 1- Vista geral da planta e das flores de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	19
Figura 2- Modelo de uma estação de <i>electrospinning</i>	22
Figura 3- Estrutura química do poli (óxido de etileno).....	26
Figura 4- Atividade antimicrobiana do OEG por ação de voláteis sobre o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> . Os resultados são expressos como média (n=3) e a barra nas colunas é o desvio padrão.....	42
Figura 5- Morfologia e distribuição de diâmetro das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (a, b) 0%, (c, d) 3%, (e, f) 6%, (g, h) 9% e (i, j) 12%.....	45
Figura 6- Espectro ATR- FTIR dos (a) polímeros constituintes e das (b) fibras ultrafinas de proteína isolada de soja (PIS) – poli (óxido de etileno) (POE)- zeína com diferentes concentrações de OEG.....	49
Figura 7- DRX dos (a) constituintes e das (b) fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEG.....	51
Figura 8- Atividade antimicrobiana <i>in situ</i> das fibras ultrafinas contendo óleo essencial de gengibre, contra <i>L. monocytogenes</i> em queijo Minas frescal.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1- Composição química do óleo essencial de gengibre (<i>Zingiber Officinale</i> Roscoe).....	38
Tabela 2- Atividade antimicrobiana por difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do OEG frente à diferentes bactérias.....	41
Tabela 3- Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas e das soluções poliméricas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (OEG).....	43
Tabela 4- Análises termogravimétricas (TGA) e suas primeiras derivadas (DTG) dos constituintes das fibras ultrafinas e das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEG.	47

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Óleos essenciais e suas atividades antimicrobianas.....	18
3.2 Encapsulação.....	20
3.3 <i>Electrospinning</i>	21
3.4 <i>Polímeros para produção de fibras por electrospinning</i>	23
3.4.1 Proteína isolada de soja	23
3.4.2 Zeína	25
3.4.3 Poli (óxido de etileno) (POE)	25
3.5 Embalagens ativas antimicrobianas	26
3.6 Micro-organismos em alimentos.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Material.....	29
4.2 Métodos.....	30
4.2.1 Extração do óleo essencial de gengibre (OEG)	30
4.2.2 Caracterização do óleo essencial de gengibre.....	30
4.2.2.1 Composição química.....	30
4.2.2.2 Atividade antimicrobiana	31
4.2.2.2.1 Difusão em ágar	31
4.2.2.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)	31
4.2.2.2.3 Concentração bactericida mínima (CBM).....	32
4.2.2.2.4 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera.....	32

4.2.3 Preparo das soluções poliméricas e das fibras ultrafinas pela técnica de <i>electrospinning</i>	33
4.2.4 Caracterização das soluções poliméricas	33
4.2.4.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica	33
4.2.5 Caracterização das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre	34
4.2.5.1 Morfologia e distribuição de diâmetro.....	34
4.2.5.2 Estabilidade térmica	34
4.2.5.3 Espectroscopia com Transformada de Fourier (FTIR) das fibras ultrafinas.....	35
4.2.5.4 Cristalinidade relativa	35
4.2.6 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas.....	35
4.3 Aplicação de óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas em queijo Minas Frescal	36
4.3 Análise estatística	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Caracterização do óleo essencial de gengibre.....	37
5.1.1 Composição química.....	37
5.1.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre.....	39
5.1.2.1 Difusão em ágar, CIM e CBM.....	39
5.1.2.2 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera.....	41
5.2 Caracterização das soluções poliméricas	42
5.2.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas	42
5.3 Caracterização das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre	44
5.3.1 Morfologia e distribuição de diâmetro.....	44
5.3.2 Propriedades térmicas.....	46

5.3.3 Espectroscopia com Transformada de Fourier (FTIR) das fibras ultrafinas	47
5.3.4 Cristalinidade relativa	50
5.3.5 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas	52
5.4 Atividade antimicrobiana <i>in situ</i> do óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas	52
6 CONCLUSÕES	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são compostos extraídos de plantas aromáticas e alguns são considerados inibidores eficazes do crescimento de micro-organismos em alimentos. O óleo essencial de gengibre (OEG) é extraído da raiz da planta *Zingiber officinale* Roscoe, uma das especiarias mais utilizadas em todo o mundo, e apresenta atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (EL-BAROTY et al., 2010, NOORI; ZEYNALI; ALMASI, 2018). Apesar dos óleos essenciais terem sido relatados como potenciais antimicrobianos naturais seu uso direto na preservação de alimentos é limitado devido à sua insolubilidade em água, instabilidade a condições ambientais adversas como altas temperaturas e sabor e aroma característico que pode alterar as propriedades sensoriais dos alimentos (WEN et al., 2016). Com isso, a encapsulação desses compostos em fibras é uma alternativa eficaz para suprir suas desvantagens (ANTUNES et al., 2017), uma vez que melhora a solubilidade, estabilidade, e possibilita a liberação controlada de compostos (RESTUCCIA et al., 2010).

Entre as técnicas de encapsulação, o *electrospinning* se destaca por ser uma técnica simples, de baixo custo e possibilita a produção de fibras em escala nanométrica, com elevada área superficial. Além disso, o processo é altamente versátil e permite a produção de fibras a partir de vários polímeros ao mesmo tempo. Biopolímeros tais como, polissacarídeos e proteínas foram utilizados para produzir fibras (KONG; ZIEGLER, 2014, LEE et al., 2009, WANG et al., 2015, ANTUNNES et al., 2017; MOOMAND; LIM, 2014, VEGA-LUGO; LIM, 2012, XU et al., 2012) .

As proteínas vegetais como, as isoladas de soja e a zeína vêm sendo utilizada para produção de fibras por *electrospinning* pois são disponíveis de forma econômica e altamente biocompatível (REDDY; YANG, 2011). No entanto alguns polímeros naturais como a proteína isolada de soja possuem estrutura polieléctrolítica que impede a formação de fibras sem a utilização de um polímero auxiliar em conjunto. Com isso o poli (óxido de etileno) foi relatado por facilitar a formação de fibras dos polímeros com estas características (ALBORZI et al., 2010; VEGA-LUGO; LIM, 2012; WANG et al., 2013). Além disso, a combinação de proteínas hidrofóbicas com poli (óxido de etileno) podem ser promissoras para reduzir a

hidrofilicidade do POE para utilização em embalagens como para embalagens de alimentos com alta atividade de água (VEGA-LUGO; LIM, 2012 MOOMAND; LIM, 2014).

Os alimentos, principalmente de origem animal com alta atividade de água podem veicular diversos micro-organismos patogênicos e deteriorantes, sendo necessárias formas alternativas no controle antimicrobiano destes alimentos. Estudos recentes sugeriram o uso de antimicrobianos naturais para aplicação em embalagens ativas antimicrobianas para alimentos utilizando óleos essenciais de canela, Thymol e Limoneno, respectivamente, encapsulados pela técnica de *electrospinning* (WEN et al., 2016; AYTAC et al., 2017; KHOSHAKHLAGH et al., 2017).

Embora os materiais antimicrobianos em nano-escala produzidos por *electrospinning* tenham sido objeto de estudo em diversas pesquisas, não há relatos sobre a incorporação de óleo essencial de gengibre em fibras ultrafinas produzidas pela técnica de *electrospinning* para o controle de bactérias assim como aplicação dessas fibras no controle de *L. monocytogenes* em queijos. Neste estudo, a ação antimicrobiana do óleo essencial de gengibre contra as bactérias *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* 0157:H7, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* foi avaliada. Este óleo foi encapsulado em fibras ultrafinas, utilizando os polímeros proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) (PEO) e zeína, pela técnica de *electrospinning*, e aplicado em embalagem antimicrobiana no controle de *L. monocytogenes* em queijo minas frescal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar fibras ultrafinas de proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína, com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), pela técnica de *electrospinning*, bem como aplicá-las em embalagem de queijo Minas Frescal para o controle de *L. monocytogenes*.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar o óleo essencial de raízes de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe);
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre frente a bactérias Gram-positiva e Gram-negativa;
- Elaborar e Caracterizar as soluções poliméricas de proteína isolada de soja, PEO e zeína;
- Elaborar e Caracterizar as soluções poliméricas de proteína isolada de soja, PEO e zeína com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre;
- Produzir e caracterizar as fibras ultrafinas de proteína isolada de soja, POE e zeína com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre pela técnica de *electrospinning*;
- Avaliar as fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre quanto sua atividade antimicrobiana frente a *L.monocytogenes*;
- Avaliar a ação do óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas no controle de *L. monocytogenes* em queijo minas frescal armazenados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos essenciais e suas atividades antimicrobianas

Óleos essenciais são substâncias aromáticas e voláteis derivadas do metabolismo secundário das plantas e podem ser obtidos a partir de materiais vegetais, como flores, sementes, folhas, frutos ou casca. Quimicamente são compostos de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre. Esses compostos presentes em diferentes concentrações nos óleos essenciais, podem ser divididos em terpenos ou compostos de aroma (BAKKALI et al., 2008).

Nos últimos anos, estudos relataram propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais, (ANTUNES et al., 2017; DANNENBERG et al., 2017; ARTIGA-ARTIGAS, et al., 2017), e sugeriram a potencial utilização desses compostos como antimicrobianos alternativos. No entanto, seu(s) mecanismo(s) de ação ainda não foi completamente compreendido(s). Foram propostos diversos mecanismos para explicar as ações dos compostos químicos contidos nos óleos essenciais (BURT, 2004). A ação pode se relacionar com a habilidade de compostos fenólicos para alterar permeabilidade das células microbianas, danificar as membranas citoplasmáticas, interferir com o sistema de geração de energia celular (ATP) interromper a força motora do protão (BURT, 2004; FRIEDLY et al., 2009; LI et al., 2011).

O óleo essencial extraído do gengibre foi relatado por possuir forte atividade antimicrobiana (SINGH et al., 2008; EL-BAROTY et al., 2010; SRINIVASAN, 2017; NOORI; ZEYNALI; ALMASI, 2018). O gengibre pertence à família Zingiberaceae (Figura 1) que consiste de 47 gêneros e 1400 espécies, sendo que o gênero *Zingiber* compreende cerca de 150 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia (RAVINDRAN et al., 2005).

Os principais componentes do óleo de gengibre relacionadas à sua atividade antimicrobiana são os componentes voláteis hidrocarbonetos, terpênicos como principalmente, sesquiterpenoides, com α -zingibereno (30-70%) como componente principal. Em quantidades menores também estão presentes outros

sesquiterenóides: β -sesquiphellandrene (15-20%), β -bisaboleno (10-15%) e α -farneseno e monoterpénoides (β -phellandrene, camphene, cineol, geraniol, citral, etc. (ALI et al., 2008). No entanto, geralmente ocorrem diferenças significativas entre a composição do óleo de gengibre em uma mesma espécie, e conseqüentemente na sua atividade antimicrobiana. Esse comportamento está relacionado, principalmente, com a localização geográfica, época da coleta, genótipo e condições climáticas (SINGH et al., 2008).



Figura 1- Vista geral da planta e das flores de *Zingiber officinale* Roscoe.

Fonte: MESOMO, 2013.

O uso direto de óleo essencial em alimentos apresenta alguns problemas que comprometem a sua aplicação tecnológica como bioconservantes, como, insolubilidade em água, instabilidade quando submetidos a condições ambientais adversas, como o tratamento térmico, presença de oxigênio e luz, e sabor e/ou odor característico, etc, o que altera suas propriedades sensoriais dos alimentos (ASSIS et al., 2012; DANNENBERG et al., 2017; WEN et al., 2016).

Com isso a encapsulação de óleos essenciais vem sendo sugerida como uma alternativa eficaz para suprir suas desvantagens (WEN et al., 2016; KHOSHAKHLAGH et al., 2017; ANTUNES et al., 2017).

3.2 Encapsulação

A encapsulação de compostos ativos é um processo de aprisionar um ingrediente ativo como, por exemplo, uma molécula bioativa alimentar (antioxidantes, ácidos graxos, vitaminas, antimicrobianos) ou células vivas (por exemplo, probióticos) dentro de um material de parede que pode ser proteínas, lipídios, polissacarídeos, etc (GIBBS et al., 1999).

Além de contribuir para a estabilidade e biodisponibilidade, a encapsulação também controla a taxa de liberação dos compostos e mascara o odor e sabor indesejáveis dos mesmos (JINGOU et al., 2011). Com isso, se torna ideal para proteção de compostos voláteis, como contêm nos óleos essenciais.

Por exemplo, muitas vezes um composto antimicrobiano efetivo apresenta forte sabor e/ou odor, o que pode resultar em problemas sensoriais. Autores sugeriram a encapsulação para superar a questão sensorial. Isso foi possível devido à manipulação da taxa de liberação dos compostos voláteis, de modo que o espaço livre atinja o nível de concentração inibitória com tempo de residência adequado, através da absorção na estrutura de embalagens ou da difusão na matriz de alimentos (WINTHER; NIELSEN, 2006).

A aplicação dos óleos normalmente é feita através da dispersão dos mesmos em um polímero transportador ou encapsulados em micro ou nanoestruturas (RAVICHANDRAN et al., 2011). A nanoencapsulação vem ganhando destaque devido às suas proporções nanométricas. Estes materiais possuem uma elevada área superficial e 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).

Muitas técnicas foram utilizadas para nanoencapsular bioativos alimentares, como, secagem por pulverização, liofilização, emulsão, etc (EZHILARASI et al., 2013). No entanto, cada técnica apresenta suas peculiaridades e limitações como, por exemplo, a nanoencapsulação por secagem por pulverização é possível somente para manter as nanopartículas. No caso de encapsulação por emulsão, as nanopartículas são obtidas em estado líquido que requer secagem posterior para obter nanoencapsulados em pó. Neste contexto, as técnicas por *electrospinning* se

destacam por serem técnicas de processamento simples, com alta eficiência de encapsulamento e de baixo custo (GARCÍA-TEJEDA et al., 2013; DAUDT et al., 2014).

3.3 *Electrospinning*

Electrospinning é uma técnica que usa alta tensão para gerar fibras em escala nanométrica, que possibilita a encapsulação de compostos bioativos. As fibras produzidas por *electrospinning*, apresentam elevada eficiência devido a elevada área superficial dos materiais formados em relação ao volume (PITAKSUTTEEPONG, 2016; TAN et al., 2016). O processo de obtenção das fibras requer quatro componentes principais: uma fonte de alta tensão; bomba infusora de seringa; solução polimérica e um coletor (Figura 2). Em uma configuração típica, o eletrodo positivo está ligado à agulha com a solução polimérica, enquanto a placa do coletor é carregada por um eletrodo negativo.

À medida que uma tensão elétrica é aplicada, a gota pendente da solução de polímero na ponta da agulha torna-se carregada, resultando em uma repulsão eletrostática na superfície da gota; quando a tensão ultrapassa o nível crítico, a força de repulsão eletrostática supera a tensão superficial da solução polimérica, induzindo assim a ejeção de um jato de líquido através da agulha e rápida evaporação do solvente, produzindo uma fibra contínua depositado na placa coletora (RAMAKRISHNA et al., 2005; RENEKER; YARIN, 2008; MENDES; STEPHANSEN; CHRONAKIS, 2017).

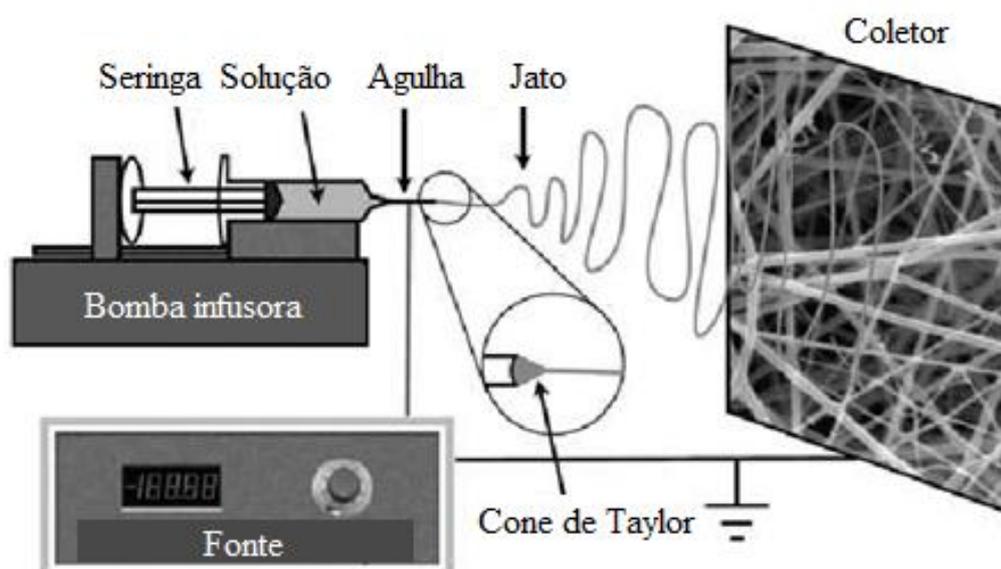


Figura 2- Modelo de uma estação de *electrospinning*.

Fonte: SALLES, 2013, p.2.

No processo, os parâmetros podem ser ajustados para sintonizar e otimizar as morfologias e características das fibras. Os principais fatores intrínsecos da solução polimérica são: a tensão superficial, a condutividade elétrica e a viscosidade, e alguns dos principais parâmetros extrínsecos são: a umidade relativa, a distância entre a seringa com a solução polimérica e o coletor, e a taxa de fluxo (VEGA-LUGO; LIM, 2012).

Além dos parâmetros, o processo *eletrospinning* é altamente versátil e permite processar diferentes biopolímeros em nano-microfibras. Polímeros de origem vegetal (por exemplo, amido, proteína isolada de soja e zeína), animal (a proteína do soro de leite, proteína sarcoplasmática de peixe) foram utilizados para produção das fibras *por electrospinning* (LANCUSKI et al., 2015; XU et al., 2012; ANTUNNES et al., 2017; COLÍN-OROZCO et al., 2015, SETT; STEPHANSEN; YARIN, 2016).

As diferentes características dos polímeros permitem a seleção das propriedades desejadas, tais como: capacidade de absorção de água, cinéticas de degradação, ou propriedades mecânicas com especificações apropriadas a determinadas aplicações.

3.4 Polímeros para produção de fibras por *electrospinning*

Diversos polímeros podem ser utilizados para produção de fibras por *electrospinning*, tanto polímeros naturais quanto sintéticos, ou a combinação destes. Nos últimos anos, uso de fibras de polímeros biodegradáveis para aplicação no setor alimentício vem crescendo. As características únicas desses polímeros, tais como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, e comportamento químico ou atividade antimicrobiana criaram uma enorme demanda por esses produtos, principalmente em sistemas de encapsulamento e entrega de compostos bioativos (FATHI; MARTÍN; MCCLEMENTS, 2014).

A produção de nanofibras a partir de materiais naturais vem crescendo e possibilitando a exploração de novas matérias-primas a serem usadas para este fim. Diversos polímeros naturais mostraram-se eficientes na produção de nanofibras ou nanocápsulas, como quitosana, proteínas, celulose, colágeno, gelatina, entre outros, sendo escolhidos de acordo com a aplicação a que se deseja destinar (BHARDWAJ; KUNDU, 2010)

As proteínas foram muito exploradas para produção de fibras por *electrospinning* (BABITHA et al., 2017), para várias aplicações, devido às suas propriedades estruturais, funcionais, além da sua natureza biocompatível e biodegradável. As proteínas vegetais são extraídas de plantas ou como subprodutos de agroindústrias, disponível de forma econômica e altamente biocompatível (REDDY; YANG, 2011). Alguns dos exemplos de proteínas vegetais são a zeína (milho), e proteínas de soja.

3.4.1 Proteína isolada de soja

A soja e seus derivados protéicos (farelo, concentrados e isolados) assumem grande importância, dada a enorme demanda pela proteína. Os concentrados e isolados protéicos de soja têm sido produzidos em grande escala para servir como ingrediente funcional numa ampla e sempre crescente faixa de aplicação em alimentos. Embora os concentrados e isolados sejam boas fontes de proteínas sob o ponto de vista nutricional, suas propriedades funcionais normalmente têm maior

valor tecnológico. O concentrado protéico de soja apresenta cerca de 70% de proteína. No caso de isolado proteico, o produto deve conter no mínimo 90% de proteína, em base seca. Essa proteína é utilizada industrialmente e também na elaboração de embalagens de alimentos (VAZ et al., 2003).

De maneira geral, 90% das proteínas da soja são globulinas, e podem ser divididas em frações 7S e 11S que representam cerca de 70% das proteínas contidas no grão de soja (LAKEMOND et al., 2002). A fração 11S, conhecida como glicinina, representa cerca de 37% da proteína da soja e massa molar de 360 kDa, já a fração 7S é composta por enzimas (b-amilase, lipoxigenase) e pela b-conglicinina que representa cerca de 91% da fração 7s com peso molecular médio de 180 kDa. (LAKEMOND et al., 2002). As proteínas da soja são abundantes em aminoácidos como, ácido glutâmico, glicina, alanina, valina, leucina, lisina, arginina e menos de 1% de cisteína. Em geral, a fração 11S contém 3 ou 4 vezes mais metionina e cisteína por unidade de proteína do que a fração 7S (KITAMURA,1995).

Diversos autores vêm relatando a utilização de proteína isolada de soja para produção de fibras por *electrospinning* e encapsulação de compostos bioativos (CHO; NETRAVALI; JOO, 2010; SONG et al., 2011). No entanto, este biopolímero apresenta baixa solubilidade em solventes orgânicos, além disso, é necessário a utilização de um polímero auxiliar na solução de proteína de soja para produção das fibras. A estrutura polieléctrolítica, de polímeros naturais como a proteína isolada de soja pode aumentar as repulsões intra e intermoleculares devido a força repulsiva entre os grupos iônicos dificultando o emaranhamento das cadeias que deve ser suficiente a fim de assegurar viscosidade da solução para produzir um jato uniforme durante o *electrospinning* (TAN et al., 2005; LU et al., 2006; CHO et al.,2010).

Desta forma, para melhorar tais características, as proteínas de soja foram combinadas com outros polímeros. Fabra; López; Lagaron, (2014) utilizaram, a combinação de proteína isolada de soja, proteína do trigo e zeína para o desenvolvimento de embalagens alimentícias. SETT et al., (2015) avaliaram a proteína de soja, juntamente com álcool polivinílico ou policaprolactona, no desenvolvimento de membranas biodegradáveis que poderiam ser usadas para proteger plantas do ataque de fungos.

3.4.2 Zeína

A Zeína é uma prolamina que compõe 60% (base seca) da farinha de glúten de milho (LAI; GEIL; PÁDUA, 1999). A composição de aminoácidos da zeína explica sua insolubilidade em condições aquosas. As altas quantidades de resíduos de aminoácidos não-polares e a deficiência de aminoácidos carregados contribuem para o comportamento de solubilidade da zeína (SHUKLA; CHERYAN, 2001). Embora a zeína contenha uma maior abundância de aminoácidos hidrofóbicos e não carregados, a estrutura da proteína compreende domínios hidrofóbicos e hidrofílicos, permitindo que ele se comporte como um polímero anfifílico em condições específicas (WANG; YIN; PÁDUA, 2008).

As múltiplas frações da zeína, incluem α , β , γ - ou δ -, onde as zeínas α e β são as duas principais frações. A α -zeína é definida como solúvel em etanol a 95% e representa aproximadamente 80% da prolamina total presente no milho. Em comparação com a β -zeína, a fração α -zeína contém menos histidina, arginina, prolina e metionina (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

Devido às características como boa elasticidade, biodegradabilidade, alta resistência térmica, barreira ao oxigênio e capacidade de formação de filme, diversos estudos foram feitos em relação a produção de fibras de zeína por *electrospinning*, principalmente no ramo de embalagens e revestimentos para alimentos, assim como encapsulamento de compostos bioativos (NEO et al., 2013; MOOMAND; LIM, 2014, 2015).

3.4.3 Poli (óxido de etileno) (POE)

Entre os polímeros que foram investigados, o POE tem sido bem estabelecido pela técnica de *eletrospinning*. Quimicamente, é um polímero linear que consiste em segmentos de etileno e éter (Figura 3). O oxigênio com éter permite que este polímero interaja com outras espécies hidrófilicas, enquanto a parte de etileno participa de interações hidrofóbicas. O POE é solúvel em água e forma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo éter e as moléculas de hidrogênio da água (BEKIRANOV; BRUINSMA; PINCUS, 1997)

Devido às características de: solubilidade em água, biodegradabilidade e facilidade em formar fibras no processo de *electrospinning*, o POE tem sido utilizado como aditivo em soluções de biopolímero para permitir a formação de fibras (ALBORZI et al., 2010; VEGA-LUGO; LIM, 2012; WANG et al., 2013).

A incorporação de POE foi investigada em soluções de polímeros polielétrólitos, como, a proteína de soro e o alginato de sódio respectivamente (ALBORZI et al., 2010; VEJA-LUGO; LIM, 2012). Nesses estudos, os autores relataram que a adição do POE reduziu a força de repulsão entre os políons estabilizando o jato para produção de fibras por *electrospinning*. Além disso, o POE hidrofílico pode por exemplo, ser misturado com polímeros hidrofóbicos como a zeína, para adaptar a sensibilidade à umidade das fibras controlando a liberação de compostos por umidade, como por exemplo, em embalagens ativas (DAI; LIM, 2015).

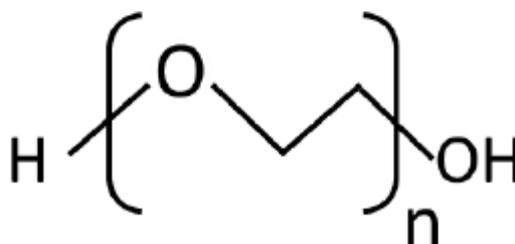


Figura 3- Estrutura química do poli (óxido de etileno).
Fonte: Huang, 2016.

3.5 Embalagens ativas antimicrobianas

As embalagens de alimentos tradicionais são destinadas a protegerem os alimentos das influências exteriores como calor, luz, presença ou ausência de umidade, oxigênio, pressão, enzimas, odores, micro-organismos, insetos, sujeira e partículas de poeira, emissões gasosas, entre outras (ROBERTSON, 2006).

Prolongar a vida útil dos alimentos envolve a aplicação de várias estratégias, como controle de temperatura; controle de umidade; adição de produtos químicos,

dióxido de carbono ou ácidos; remoção de oxigênio; ou uma combinação destes (ROBERTSON, 2006).

As embalagens ativas interagem com os alimentos ou ambiente interno/externo da embalagem para melhorar a sua função de proteção, aumentando a vida útil do produto, e contribuindo para a segurança do alimento (LIM, 2011). As técnicas de embalagens ativas podem ser divididas em duas categorias. A primeira categoria é dos absorventes ou catadores, onde os sistemas removem compostos indesejáveis tais como oxigênio, dióxido de carbono, etileno e água em excesso. A segunda categoria são os sistemas de liberação, que adicionam ativamente ou emitem compostos para os alimentos embalados, tais como dióxido de carbono, antioxidantes e antimicrobianos (WANG, 2016).

Entre as embalagens ativas, as antimicrobianas tem se destacado nos últimos anos. A embalagem antimicrobiana é um tipo promissor de embalagem ativa que apresenta substância antimicrobiana incorporada ou imobilizada no material da embalagem e é capaz de eliminar ou inibir micro-organismos deterioradores e, ou patogênicos. Esta forma tende a ser mais vantajosa do que a abordagem convencional, que consiste em adicionar conservantes diretamente em alimentos pois as embalagens ativas podem fornecer efeitos antimicrobianos principalmente nas superfícies dos alimentos, onde a maior parte da deterioração dos alimentos ocorre (SIRO, 2012).

Diversos estudos vem sendo feitos utilizando compostos antimicrobianos em nanomateriais para o desenvolvimento de embalagens ativas antimicrobianas para alimentos. Na busca por alimentos seguros e preocupações com a saúde, os consumidores vem preferindo conservantes de fontes naturais, como os óleos essenciais que apresentam atividades antimicrobianas e antioxidantes (BURT, 2004, PELTZER et al., 2009; SIRO, 2012).

3.6 Micro-organismos em alimentos

Os micro-organismos podem desempenhar papéis muito importantes nos alimentos como os que causam alterações benéficas modificando as características originais do alimento de forma a transforma-lo em um novo alimento. No entanto existem os micro-organismos indesejáveis como aqueles que alteram as características sensoriais dos alimentos resultam em alterações de cor, odor, sabor,

textura e aspecto do alimento, como as bactérias deteriorantes, ou aqueles causadores de doenças podem apresentar risco a saúde.

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) constituem importantes problema de saúde pública tanto para os países desenvolvidos como para os em desenvolvimento, apesar das constantes melhorias no controle da qualidade e segurança dos alimentos e manifestam-se de diversas formas, desde ligeiras indisposições até situações mais graves. Há várias dificuldades em relação à vigilância das DTA, primeiramente, pela diversidade dos quadros, em que distintas síndromes se manifestam. Outro problema é o grande número de patógenos envolvidos nas DTA (OLIVEIRA, 2013).

O consumo de alimentos saudáveis é um direito do consumidor e dever das grandes indústrias processadoras de alimentos. As autoridades de saúde têm o dever de elaborar e fazer cumprir as leis para proteger a saúde da população. O fornecimento de alimentos livres de riscos à saúde é realmente um desafio, e, sua negligência pode causar infecções graves, prejudiciais ao consumidor, causando desde um simples desconforto intestinal a distúrbios neurológicos e morte. Bactérias, fungos, protozoários e vírus são os principais grupos de micro-organismos que causam distúrbios alimentares e devido a sua diversidade e patogenicidade, as bactérias, são de longe, o grupo mais importante (MIRANDA; BARRETO, 2012).

Entre as bactérias que causam doenças transmitidas por alimentos, a *Listeria monocytogenes* é um importante patógeno de origem alimentar, uma vez que a presença desse micro-organismo em alimentos pode causar a doença listeriose, que representa relevante risco à saúde pública, pela severidade das sequelas e do alto índice de mortalidade principalmente para pessoas pertencentes ao grupo de risco, como gestantes, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida ou portadores de HIV, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam comprometimento do sistema imunológico (LUBER et al., 2011).

A capacidade da bactéria se multiplicar em temperatura de refrigeração e em ambientes com ótima $a_w > 0,97$ contribui para a transmissão da listeriose. A *Listeria* pode se multiplicar em temperaturas de 2,5 a 44 °C, com temperatura ótima entre 30-37 °C, sobrevive em uma ampla faixa de pH (4,3 a 9,4) (MARTINEZ; DESTRO, 2008). Outro fator relevante à sua sobrevivência é a capacidade de adaptação a ambientes com altas concentrações de NaCl (até 20%) (JAY, 2005).

Os alimentos de origem animal principalmente leite e produtos lácteos como os queijos são a principal fonte da transmissão de *Listeria*. Dentre aqueles consumidos no Brasil, o queijo minas frescal é tipicamente nacional e entrou definitivamente para a dieta do brasileiro, sendo consumido em lanches, café da manhã e até mesmo como sobremesa (BARCELLOS, 2006).

Por possuir alta aw, baixa acidez e intensa manipulação, o queijo minas frescal é susceptível à contaminação e proliferação bacteriana. Além disso, é ofertado ao consumidor em embalagens plásticas lacradas com fecho metálico, sem vácuo, que acumulam o soro liberado pelo alimento, conferindo um ambiente propício ao crescimento de micro-organismos (ISEPON; SANTOS; SILVA, 2003). A associação desses fatores contribui para a baixa durabilidade do produto, reduzindo seu prazo de validade, que corresponde a aproximadamente 7 dias, se mantido sob refrigeração até 8°C (PERRY, 2004).

Na indústria de alimentos, os conservantes sintéticos tradicionalmente empregados para o controle microbiano, vêm encontrando crescente rejeição por parte dos consumidores, que tem buscado alimentos mais próximos ao natural (CALO et al., 2015). Ambos fatores, têm impulsionado nos últimos anos pesquisas com antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais. A utilização de óleos essenciais no controle de *Listeria* em alimentos, como queijos vêm sendo relatada com sucesso (CARVALHO et al., 2015; CUI; WU; LIN, 2016; DANNENBERG et al., 2017; ARTIGA-ARTIGAS; ACEVEDO-FANI; MARTÍN-BELLOSO, 2017) principalmente, devido a maior sensibilidade a ação dos óleos essenciais das bactérias Gram-positiva quando comparadas com as Gram-negativa aos óleo essenciais (BURT, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O óleo essencial foi extraído das raízes de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), adquiridas do comércio na cidade de Pelotas, RS, Brasil. A proteína isolada de soja - proteína 90,0% b.s. (da empresa N4 natural), poli (óxido de etileno) e zeína da Sigma-Aldrich. A atividade antimicrobiana do OEG foi avaliada contra

cinco bactérias relevantes para alimentos. As bactérias Gram-positiva avaliadas foram *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e as Gram-negativa foram *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15443). O queijo utilizado para a atividade antimicrobiana in situ foi o queijo Minas frescal.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração do óleo essencial de gengibre (OEG)

O óleo essencial de gengibre foi extraído pelo método de hidrodestilação descrito por Dannenberg et al., (2017). As raízes do gengibre foram congeladas e depois trituradas em blender. Cerca de 300 g de gengibre e 1 L de água destilada foram adicionados a um balão de 2 L, o balão foi então conectado ao equipamento *cleverger* e aquecido até temperatura de ebulição (100°C) por uma manta de aquecimento durante 2h. Após sua obtenção o óleo essencial de gengibre foi armazenado a -20°C (± 2) em frasco de vidro âmbar devidamente vedado com parafilme, até o momento das análises.

4.2.2 Caracterização do óleo essencial de gengibre

4.2.2.1 Composição química

A composição do OEG foi avaliada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS, Shimadzu QP2010 Ultra, Japão) de acordo com o método descrito por Juliani et al., (2011). Em um frasco de 1,5 mL, 20 μ L do óleo foram misturados com 480 μ L de hexano e 50 μ L de uma solução de 1-nonanol em hexano (5 mg.mL⁻¹). A amostra foi preparada em duplicata e cada duplicata foi injetada duas vezes no GC-MS, utilizando um auto-injetor. Os parâmetros utilizados no GC-MS foram: temperatura do injetor 200 °C no modo sem divisão; taxa de fluxo de gás portador de hélio 1,08 mL.min⁻¹; coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Restek, EUA); forno GC a 60 °C durante um minuto e

depois rampa a $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de retenção durante 1 min; fonte e interface de íons a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$; e varredura em massa de 40 a 450 m/z a 0,2 varredura por segundo. O índice do tempo de retenção foi determinado utilizando uma série homóloga de alcanos e o cálculo do índice de retenção foi realizado automaticamente pelo software MS.

A quantificação foi realizada em relação a um padrão interno, 1-nanol. Os compostos foram identificados usando a biblioteca espectral de massa AOC 20-i do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia NIST, 2011.

4.2.2.2 Atividade antimicrobiana

4.2.2.2.1 Difusão em ágar

A atividade antimicrobiana do óleo foi avaliada primeiramente pela técnica de disco difusão em ágar, de acordo com CLSI (2015a). Placas com Agar Mueller-Hinton (MH - Oxoid®) foram inoculadas com suspensões bacterianas, as quais foram ajustadas a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8\text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$). Posteriormente, discos de papel filtro estéreis foram dispostos sobre o meio e impregnados com $10\mu\text{L}$ do óleo essencial, como controle negativo foi utilizado discos embebidos com água destilada estéril e como controle positivo discos de Gentamicina ($10\text{ }\mu\text{g}$), sendo incubados por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse período o diâmetro dos halos de inibição foram aferidos com paquímetro digital (King.tools®). Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.2.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM do OEG foi determinada através da micro-diluição em caldo utilizando placas estéreis com 96 poços (CLSI, 2015b), sendo avaliada frente a *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC7644, *P. aeruginosa* ATCC 15443, *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *E. coli* O157:H7. NCTC 12900. Foram preparadas diluições seriadas de $75\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0,58\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$.do OEG em caldo Brain Heart Infusion (BHI-Oxoid®) adicionado de 1% do emulsificante tween 80 (Vetec®). Os inóculos bacterianos utilizados no teste foram preparados obtendo a concentração

final de 10^4 UFC.mL⁻¹, por poço de placa. Como controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura, para o controle positivo foi utilizado o meio de cultura acrescido do inóculo bacteriano, e foi feito ainda um controle de esterilidade do OEG. Após o período de incubação (24 h a 37°C), foi adicionado 10 µL do corante revelador Resazurina em todas as cavidades da placa e o surgimento da coloração rosa indica possível atividade bacteriana, sendo considerada a CIM a menor concentração do óleo em que não foi possível observar crescimento bacteriano visível.

4.2.2.2.3 Concentração bactericida mínima (CBM)

A CBM foi determinada a partir dos resultados obtidos na CIM. Foram semeadas em ágar BHI alíquotas de 10 µL de cada poço das microplacas que não demonstraram crescimento bacteriano visível após 24h a 37 °C. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não foi observado crescimento bacteriano após a exposição frente as concentrações de OEG (CLSI, 2015). A partir dos resultados de difusão em ágar, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima foi escolhida a bactéria mais sensível a ação do óleo essencial de gengibre (*Listeria monocytogenes*) para continuar as análises seguintes de atividade antimicrobiana.

4.2.2.2.4 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

A atividade antimicrobiana em micro-atmosfera foi determinada conforme proposta por Ghabraie et al., (2016). Alíquotas de 0,1 mL de suspensões celulares (10^4 UFC.mL⁻¹) de *L. monocytogenes* ATCC 7644, que foi a bactéria que se demonstrou mais sensível a ação do óleo essencial, foram inoculadas na superfície de placas com Ágar BHI (15 mL – camada de 6 mm). Na tampa de cada placa de petri foram posicionados discos de papel filtro estéreis, sendo adicionados diferentes volumes do OEG (0.10, 0.21 and 0.31 µL/cm³) as placas vedadas, invertidas e incubadas a 37 °C por 24 h. Como controle, foi utilizado discos de papel filtro estéreis embebidos com água destilada estéril. A ação antimicrobiana foi expressa

pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos com OEG comparados com um controle. A análise foi realizada em triplicata. A concentração de óleo essencial foi expressa em função do volume de óleo e do espaço livre na placa ($\pi \times r^2 \times h = 3,14 \times 4,5^2 \times 1,5 = 95 \text{ cm}^3$; $95 - 15 \text{ mL de } \acute{\text{a}}\text{gar} = 80 \text{ cm}^3 \text{ de espaço livre}$).

4.2.3 Preparo das soluções poliméricas e das fibras ultrafinas pela técnica de *electrospinning*

As soluções poliméricas foram preparadas separadamente, utilizando 10 g de proteína isolada de soja em 100 mL de ácido acético (PA), 3 g de poli (óxido de etileno) em 100 mL de etanol a 70% (p / v) e 30 g de zeína em 100 mL de etanol a 70% (p / v). Posteriormente, as soluções poliméricas foram misturadas na proporção de 1: 1: 1 (v: v: v) e foram adicionadas diferentes volumes de óleo essencial de gengibre (0, 3, 6, 9 e 12 mL) em 100 mL de solução polimérica, com subsequente agitação magnética (FISOTOM, MODELO 752/6) durante 5 min. Para a produção das fibras ultrafinas por *eletrospinning*, as soluções foram colocadas em uma seringa de 1 mL, com uma agulha metálica de 0,7 mm de diâmetro externo. Os parâmetros utilizados no processo foram: tensão + 24 Kv do eletrodo positivo e -3,4 Kv do eletrodo negativo e controlados na fonte de energia DC (INSTOR, INSES-HV30, Brasil). A taxa de alimentação de 1 mL.h^{-1} foi controlada em uma bomba de infusão (KD Scientific, Model 100, Holliston, Inglaterra), onde a seringa foi colocada. A distância horizontal entre a ponta da agulha da seringa e o coletor estacionário foi de 15 cm. No processo, a temperatura foi controlada a $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por um aparelho de ar condicionado e a umidade relativa ajustada em 38-44% com um desumidificador.

4.2.4 Caracterização das soluções poliméricas

4.2.4.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica

A viscosidade aparente das soluções foi avaliada com um viscosímetro digital Brookfield (Model DV – II, USA). Aproximadamente 10 mL de solução foram

colocadas no recipiente de aço inoxidável do viscosímetro que foi acoplado ao equipamento utilizando um *spindle* nº 18. A condutividade elétrica das soluções foi determinada utilizando um condutivímetro (MS TECNOPON, model mCA 150P, Brazil) e expressa em $\mu\text{S}/\text{cm}$. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), em triplicata.

4.2.5 Caracterização das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre

4.2.5.1 Morfologia e distribuição de diâmetro

A morfologia das fibras foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6610LV, USA) com uma voltagem de aceleração de 15 kV. Uma pequena porção das fibras foi colocada na superfície de um *stub* e foram revestidas com ouro através de um revestidor por crepitação e examinados com ampliação de 1000x. O diâmetro médio e a distribuição do diâmetro das fibras com diferentes concentrações de óleo foram avaliados a partir das imagens do MEV, sendo medidas cerca de 60 fibras utilizando o *software* ImageJ.

4.2.5.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das fibras ultrafinas, assim como dos compostos puros (proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno), zeína e óleo essencial de gengibre), foi avaliada por um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras (aproximadamente 5 mg) foram aquecidas em cápsulas de platina em uma faixa de 30 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e um fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹, utilizando uma cápsula de platina vazia como referência.

4.2.5.3 Espectroscopia com Transformada de Fourier (FTIR) das fibras ultrafinas

A interação entre os polímeros proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína com o óleo essencial de gengibre nas fibras foi investigada utilizando espectrômetro com transformada de Fourier na região do infravermelho (FTIR – ATR) (IRPrestige21, Shimadzu, Japão). A análise dos espectros foi realizada na região do infravermelho médio com intervalo de número de onda de 4000-500 cm^{-1} e resolução espectral de 4 cm^{-1} . Os sinais foram processados utilizando o software GRAMS (Galactic Industries Corp., Salem, NH , EUA).

4.2.5.4 Cristalinidade relativa

Os difratogramas de raios-X dos polímeros e das fibras foram obtidos utilizando um difratômetro de raios X (XRD-6000, Shimadzu, Brasil). A região de varredura da difração variou entre 5° e 70°, com uma tensão alvo de 30 kV, uma corrente de 30 mA e uma velocidade de varredura de 1°.min⁻¹. A cristalinidade relativa (CR) foi calculada como descrito por Rabek (1980) pela equação: $RC (\%) = (Ac/(Ac + Aa)) * 100$; onde Ac é a área cristalina e Aa é a área amorfa nos difratogramas de raios-X.

4.2.6 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas

A atividade antimicrobiana do OEG encapsulado em fibras ultrafinas foi avaliada pela técnica de micro-atmosfera. As placas de agar de MH foram inoculadas com a bactéria mais sensível ao óleo essencial, ou seja, com suspensões celulares de *L. monocytogenes* (10⁴ UFC.mL⁻¹). As fibras foram adicionadas na parte interna da tampa da placa de petri e depois foram seladas, invertidas e incubadas a 37 ° C durante 24 h . Cada fibra foi produzida a partir de 3 mL de solução polimérica para padronizar a área de superfície presente em cada placa. A fibra sem adição de óleo foi utilizada como controle negativo, e apenas a adição do inóculo como controle positivo.

Os resultados foram expressos como percentual de inibição do crescimento, obtidos através da diferença entre o tratamento de controle positivo (GHABRAIE et al., 2016).

4.3 Aplicação de óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas em queijo Minas Frescal

O óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas com os melhores resultados de inibição de *Listeria monocytogenes* definidos em testes preliminares foi escolhido para aplicação na embalagem de queijo Minas Frescal. Portanto a atividade antibacteriana das fibras com 12% de óleo foi avaliada através do método de micro-atmosfera de acordo com Marques et al., (2017), com algumas modificações. Peças de 1 g de queijo Minas frescal foram esterilizados através da exposição à luz ultravioleta por 15 minutos (LEE; LEE; SONG, 2015). Foram colocados 5 pedaços de queijo em placas de petri 90x15 mm. Posteriormente, os pedaços foram contaminados com 10 µL de suspensão da bactéria mais sensível ao óleo essencial (10^4 UFC.mL⁻¹), ou seja *L. monocytogenes*. As fibras ultrafinas com óleo essencial de gengibre foram adicionadas nas tampas de placas de petri contendo pedaços de queijo contaminado. O sistema foi armazenado durante 12 dias sob refrigeração a 4 °C e analisado em 0, 3, 6, 9 e 12 dias pela contagem de células viáveis. Para isso, os queijos contaminados foram diluídos em água peptona (0,1%) e inoculados em placas de agar de Oxford.

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 gengibre

5.1.1 Composição química

O rendimento de extração de óleo essencial de gengibre foi de 3,7% em base úmida. O óleo essencial apresentou 56 constituintes e os principais foram o α -zingibereno (16,1%), seguido de geranial (14,4%), (Z) citral (9,2%), β -cedreno (8,6%), acetato de geranilo (8,4 %), (1R) a-pineno (6,1%), a-curcumeno (5,3%) e a-farneseno (4,4%). Os outros constituintes apresentaram percentual inferior a 3% (Tabela 1). Noori; Zeynali; Almasi, (2018) avaliaram o óleo essencial de gengibre e também relataram composição similar, sendo o α -zingibereno, o principal composto orgânico. Por outro lado, Menut et al., (1994) identificaram citral como o principal constituinte do óleo essencial de gengibre. As variações na composição entre os óleos essenciais obtidos a partir desta espécie podem ser devido a diferentes métodos de extração, fatores genéticos e ambientais. A composição dos óleos essenciais influencia diretamente sua atividade antimicrobiana, uma vez que cada composto tem capacidade específica para penetrar na estrutura bacteriana (BAKKALI et al., 2008).

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da composição química do óleo essencial de gengibre.

Tabela 1- Composição química do óleo essencial de gengibre (*Zingiber Officinale* Roscoe)

Composto Químico	Tempo de retenção (min)	Concentração (%)
3-Methyl-1,3,5-hexatriene	2,7	<0,1
Hexanal	3,0	<0,1
2,5-Dimethyl-1,5-hexadien-3- ol	3,6	<0,1
2-Heptanone	4,3	<0,1
Heptenal	4,5	0,2
Tricyclene	5,0	0,1
(1R) α -Phellandrene	5,1	2,9
(1R) α -Pinene	5,2	6,1
Camphene	5,5	0,1
1,8-Diphenyl-1,3,5,7- octatetraene	5,8	0,1
β -Phellandrene	6,0	0,7
β -Pinene	6,1	1,4
6-Methyl-5-hepten-2-one	6,3	2,6
β -Myrecene	6,4	0,2
Octanal	6,7	0,5
(1S) α -Phellandrene	6,8	0,1
(+)-3-Carene	6,9	0,1
Terpinolene	7,1	0,8
o-Cymene	7,3	1,5
3-Carene	7,4	2,2
Eucalyptol	7,5	0,3
2-Heptanol, acetate	7,6	0,0
β -Ocimene	7,8	0,2
γ -Terpinene	8,2	0,6
(+)-4-Carene	9,0	0,1
2-ethylidene-6-methyl-3,5 Heptadienal	9,2	0,1
3-(4-methyl-3-pentenyl)- Furan	9,3	0,2
Isobomeol	9,7	0,1
(+)-2-Bornanone	10,6	0,1
(\pm)-Citronellal	10,7	0,3

Bicyclo[3.1.1]heptane	11,1	0,3
4,5-Epoxycarene	11,6	0,7
(Z)-citral	13,3	9,2
Continuação Tabela 1.		
Geranial	14,2	14,4
(-)-Bornyl acetate	14,6	0,3
2-Undecanone	14,7	0,2
(1S,5R)-myrtenyl acetate	15,6	0,1
δ -Elemene	16,0	0,1
Citronellyl acetate	16,3	0,9
Cyclosativene	16,8	0,5
α -copaene	17,1	0,6
Geranyl acetate	17,2	8,4
β -Elemene	17,5	0,5
Zingiberene	17,8	0,3
β -caryophyllene	18,3	0,2
Sesquiterpeno	18,6	0,1
(Z)- β -Farnesene	19,1	0,2
α -cedrene	19,1	0,1
(-)-Alloaromadendrene	19,4	0,4
α -Curcumene	19,8	5,3
α -Zingiberene	20,2	16,1
γ -Cadinene	20,3	2,2
α -farnesene	20,5	4,4
(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene	20,7	0,7
β -Cedrene	20,9	8,6
1,5-Cyclodecadiene	21,8	1,1

5.1.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre

5.1.2.1 Difusão em ágar, CIM e CBM

As bactérias utilizadas neste estudo estão associadas a doenças transmitidas por alimentos. O óleo essencial de gengibre exibiu atividade antibacteriana contra as bactérias avaliadas (Tabela 2). A bactéria mais sensível à ação do óleo essencial do

gingibre foi *L. monocytogenes* em comparação com as outras bactérias, apresentando o maior halo de inibição formado (37 mm).

Bag; Chattopadhyay, (2015) observaram atividade antibacteriana de óleo essencial de gengibre também contra as bactérias usadas neste estudo, no entanto, esses autores encontraram resultados de inibição abaixo dos do presente estudo, com halos de inibição de 8,9, 9,0, 6,6 e 8,0 mm para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *E. coli*, respectivamente.

A diferença da atividade antibacteriana pode estar relacionada às diferentes composições dos óleos essenciais do gengibre. O OEG tinha uma concentração inibitória mínima de $2,3 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e uma concentração bactericida mínima de $4,7 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para *E. coli 0157:H7* e *L. monocytogenes* respectivamente. Sa-Nguanpuag et al., (2011) avaliaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de gengibre contra diferentes bactérias e encontraram valores de concentração inibitória mínima de 2,5 a 10 mg.L^{-1} . Sivasothy et al., (2011) avaliaram a atividade antibacteriana dos *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade utilizando a técnica de micro-diluição, o que revelou que tanto as folhas quanto os óleos do rizoma foram moderadamente ativos contra as bactérias gram-positivas *Bacillus licheniformis*, *Bacillus spizizenii* e *Staphylococcus aureus*, e contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas stutzeri*.

Mesmo com a presença de uma membrana externa de lipopolissacarídeos (LPS) as bactérias gram-negativa também foram susceptíveis a ação do óleo essencial de gengibre. A presença de íons divalentes (Mg^{2+}) na camada de LPS limita a passagem de compostos bioativos aumentando a reticulação entre as moléculas, reduzindo assim o tamanho dos poros diminuindo a ação antimicrobiana dos óleos essenciais (DUSSAULT; VU; LACROIX, 2014).

A Tabela 2 demonstra os resultados da atividade antimicrobiana por difusão em ágar, CIM e CBM do OEG frente a diferentes bactérias patogênicas.

Tabela 2- Atividade antimicrobiana por difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do OEG frente à diferentes bactérias.

Bacteria	Halo de inibição (mm) ^a	CIM (µL.mL ⁻¹)	CBM (µL.mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19,0 ± 1,2	4,7	9,4
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	37,0 ± 1,2	2,3	4,7
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15443	13,0 ± 2,0	9,4	18,7
<i>S. Typhimurium</i> . ATCC 14028	15,0 ± 3,2	9,4	18,7
<i>E. coli</i> 0157:H7 NCTC 12900	19,0 ± 2,0	2,3	4,7

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

5.1.2.2 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

O óleo essencial de gengibre apresentou atividade contra *L. monocytogenes* quando testado em micro-atmosfera (Figura 4), promovendo reduções no desenvolvimento deste patógeno, sem a necessidade de um contato direto. A adição do óleo essencial nas concentrações 0,1, 0,21 e 0,31 µL/cm³ promoveu reduções de 20,9%, 43,0% e 43,1% nas contagem de *L. monocytogenes*, respectivamente.

Apesar dos óleos essenciais possuírem um grande número de componentes químicos, alguns autores sugerem que sua atividade antimicrobiana é relacionada com sua estrutura lipofílica a qual facilita sua penetração através das membranas, desestabilizando o transporte dos íons e solutos. A perda de íons é resultado da redução do potencial da membrana celular, com consequente colapso da bomba de prótons, e o esgotamento de adenosina trifosfato que leva à morte celular (TURINA et al., 2006). Entretanto, na fase de vapor do óleo essencial de gengibre não há necessidade de difusão em um meio, porque os componentes antimicrobianas chegam diretamente por volatilização (GOÑI et al., 2009).

A Figura 4 demonstra a atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre por ação de voláteis sobre o crescimento de *L.monocytogenes*.

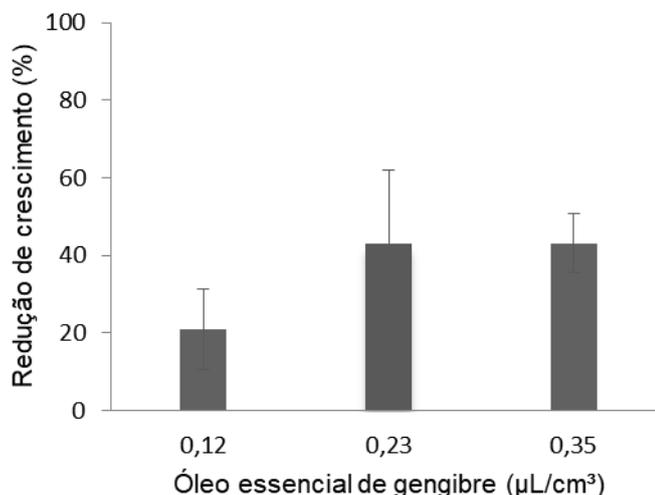


Figura 4- Atividade antimicrobiana do OEG por ação de voláteis sobre o crescimento de *L. monocytogenes*. Os resultados são expressos como média (n=3) e a barra nas colunas é o desvio padrão.

5.2 Caracterização das soluções poliméricas

5.2.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas

A viscosidade aparente e a condutividade elétrica das soluções poliméricas com diferentes concentrações de óleo essencial são mostradas na Tabela 3. A solução de proteína isolada de soja apresentou menor viscosidade do que as soluções de poli (óxido de etileno) e zeína quando comparadas as soluções poliméricas separadamente.

Comparando a viscosidade da mistura das solução poliméricas de proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína com as soluções dos polímeros separados, a mistura apresentou características mais semelhantes à solução de zeína (Tabela 3). Esse comportamento pode ser atribuído à maior concentração de zeína em massa de solução em comparação com as outras soluções. O aumento da concentração polimérica causa um maior emaranhamento da cadeia molecular, tornando a solução mais viscosa, causando a estabilização do jato no processo de *electrospining* (FONG; CHUN; RENEKER, 1999).

A adição de óleo essencial na solução de proteína de soja, poli (óxido de etileno) e zeína reduziu a viscosidade, e acarretou em uma diminuição gradual da condutividade elétrica das soluções (Tabela 3). A condutividade elétrica mede a capacidade das cargas para migrar para a superfície da solução para realizar uma força repulsiva eletrostática fundamental para iniciar o jato (VEGA-LUGO; LIM, 2012; WANG et al., 2013). Portanto, a adição de óleo essencial às fibras, independentemente da concentração, pode afetar a formação do jato. Além disso, a condutividade elétrica pode influenciar os diâmetros das fibras (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas e das soluções poliméricas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (OEG).

Tabela 3- Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas e das soluções poliméricas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (OEG).

Soluções poliméricas ¹	OEG nas soluções poliméricas (% w/v)	Viscosidade Aparente (mPa.s ¹)	Condutividade elétrica (μS.cm ⁻¹)
PIS (10 %; w/v)	0	10,6 ± 0,1 ^D	34,8 ± 4,1 ^C
POE (3 %; w/v)	0	2199,3 ± 20,2 ^A	7,4 ± 0,1 ^D
Zeína (30 %; w/v)	0	118,0 ± 10,3 ^C	891,7 ± 7,6 ^A
PIS-POE-zeína (1:1:1; /v:v:v)	0	199,5 ± 1,4 ^B	760,0 ± 7,6 ^B
	0	199,5 ± 1,4 ^a	760,0 ± 7,6 ^a
	3	162,8 ± 0,2 ^e	624,8 ± 1,9 ^b
PIS-POE-zeína (1:1:1; /v:v:v)	6	179,3 ± 0,5 ^c	582,4 ± 1,9 ^c
	9	187,1 ± 0,1 ^b	550,4 ± 0,6 ^d
	12	172,2 ± 0,1 ^d	523,7 ± 0,4 ^e

¹PIS: Proteína isolada de soja

POE: Poli (óxido de etileno)

OEG: Óleo essencial de gengibre

A, B, C, D Diferentes letras minúsculas na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias submetidas ao teste de Tukey com significância de 5%.

a, b, c, d, e Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias submetidas ao teste de Tukey com significância de 5%.

5.3 Caracterização das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre

5.3.1 Morfologia e distribuição de diâmetro

A morfologia das fibras ultrafinas com diferentes porcentagens de óleo essencial de gengibre é apresentada na Figura 5. As micrografias apresentaram fibras sem grânulos, com forma cilíndrica e homogêneas, com diâmetros variando de 102 nm a 625 nm .

As fibras com maiores concentrações de óleo essencial tiveram diâmetros maiores. Esse comportamento pode ser associado à condutividade elétrica da solução (Tabela 3), que diminuiu significativamente com o aumento da concentração de óleo essencial, reduzindo o diâmetro das fibras (Figura 5). De acordo com Bhardwaj; kundu, (2010), uma menor condutividade elétrica da solução de polímero resulta em fibras com diâmetro médio maior. Além disso o diâmetro das fibras pode estar relacionado a concentração de sólidos presente na solução que quanto maior, maior o diâmetro.

Algumas fibras com 6% de óleo essencial de gengibre apresentaram forma de fita aumentando o diâmetro das fibras. Neo et al., (2012) atribuíram a morfologia da fita ao colapso da fibra devido à alta volatilidade do solvente na solução. As diferenças na morfologia das fibras podem ser correlacionadas com vários fatores, tais como mudanças na viscosidade da solução, condutividade elétrica, tipo de polímero e parâmetros do processo (VEGA-LUGO; LIM, 2012).

A Figura 5 demonstra a morfologia e distribuição de diâmetro das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre.

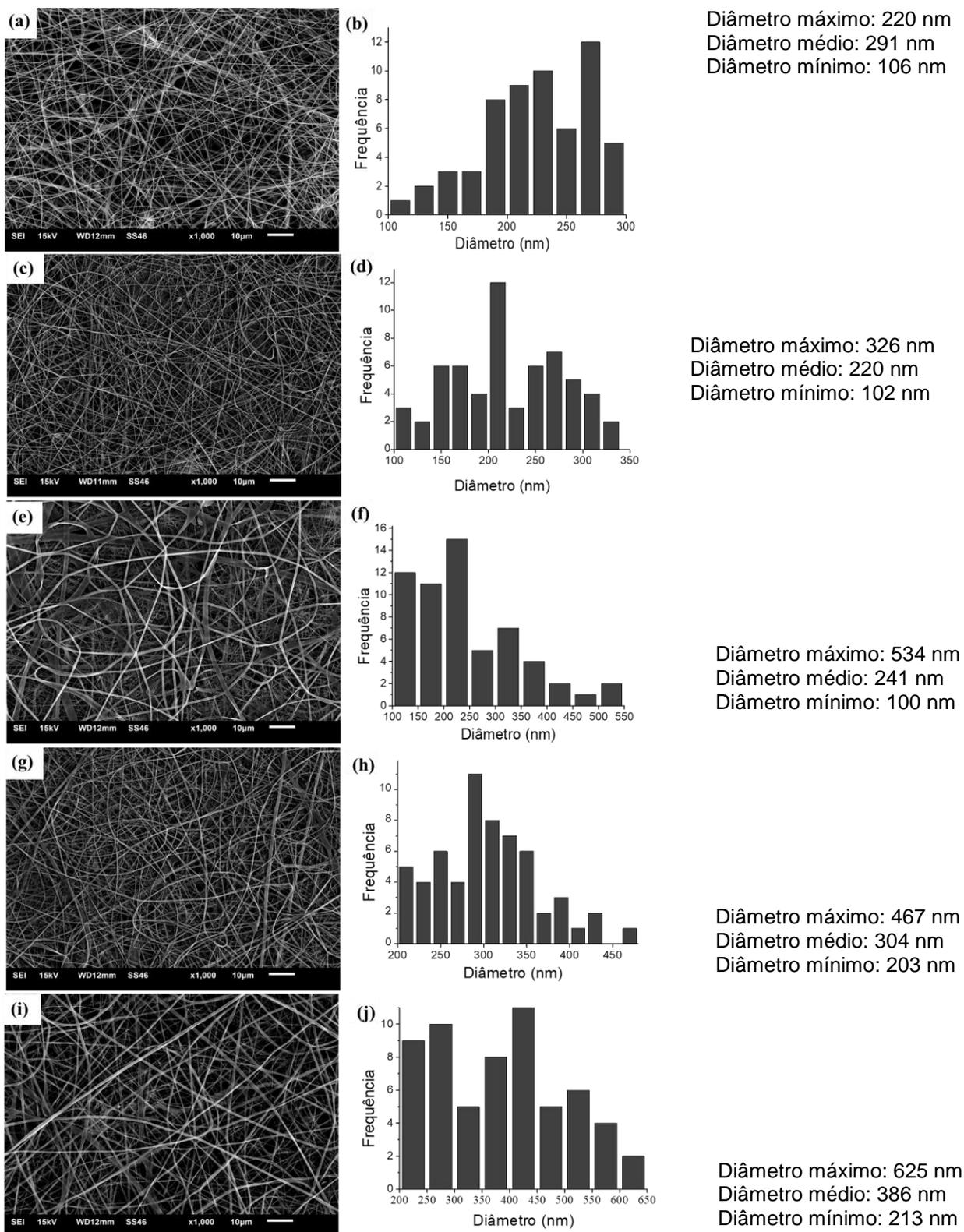


Figura 5- Morfologia e distribuição de diâmetro das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (a, b) 0%, (c, d) 3%, (e, f) 6%, (g, h) 9% e (i, j) 12%.

5.3.2 Propriedades térmicas

A análise termogravimétrica e suas primeiras derivadas foi realizada para investigar a degradação térmica das fibras e de seus constituintes (Tabela 4). A termogravimetria derivada (DTG) fornece a primeira derivada da curva do TG, em função da temperatura. A partir da análise da DTG foi verificado que o óleo essencial foi degradado em um intervalo de temperatura de 46,2-160,7 °C, e apresentou dois picos de decomposição em 62,3 °C e 149,4 °C. Os picos de degradação do óleo foram relacionado a perda de água e a evaporação dos componentes voláteis. Observa-se que o poli (óxido de etieno) puro foi degradado em uma única fase a 402,0 °C em um intervalo de temperatura de 281, 2 °C a 424,0 °C e sua decomposição completa (T_{df}) foi apenas em 424,0 °C. A proteína isolada de soja e a zeína apresentaram apenas um estágio de decomposição, com picos em 302,0 °C e 328,9 °C respectivamente, atribuídas a quebra das ligações peptídicas (NEO et al., 2013).

As fibras com diferentes proporções de óleo exibiram dois estágios principais de decomposição em DTG. Os picos de decomposição em intervalos de 309,1 a 323,0° C foram relacionadas à decomposição das proteínas e em 407,0 a 418, 5° C à degradação do poli (óxido de etileno). O aumento da concentração de óleo essencial nas fibras reduziu ligeiramente a temperatura de decomposição final, portanto teve uma sucinta alteração na estabilidade térmica das mesmas, devido á baixa temperatura de degradação dos compostos voláteis dos óleos. Com isso a encapsulação do óleo essencial em matrizes poliméricas se torna importante para melhorar a estabilidade térmica do óleo, uma vez que os polímeros utilizados no estudo se decompõe em temperatura muito superior ao óleo essencial puro.

Na tabela 4 está apresentada as propriedades termogravimétricas (TGA) e suas primeiras derivadas (DTG) dos constituintes das fibras ultrafinas e das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre (OEG).

Tabela 4- Análises termogravimétricas (TGA) e suas primeiras derivadas (DTG) dos constituintes das fibras ultrafinas e das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEG.

Constituintes das fibras ¹	TGA			DTG	
	T _{di} (°C)	T _{df} (°C)	Perda de massa de 250 a 450 °C (%)	T _{d1}	T _{d2}
PIS	218,8	360,2	40,4	302,0	
POE	281,2	424,0	100,0	402,0	
Zeína	260,5	393,4	82,0	328,9	
OEG	46,2	160,7	87,0	62,3	149,4
Fibras ultrafinas com OEG (%; p/v)	T _{di} (°C)	T _{df} (°C)	Perda de massa de 250 a 450 °C (%)	T _{d1}	T _{d2}
0	255,0	436,2	63,3	323,0	407,0
3	267,2	436,4	57,9	317,5	416,3
6	257,0	435,6	64,2	315,7	411,3
9	253,5	431,5	56,9	309,1	418,5
12	257,3	430,6	64,3	320,1	414,3

¹PIS: Proteína isolada de soja

POE: Poli (óxido de etileno)

OEG: Óleo essencial de gengibre

T_{di} = Temperatura de decomposição inicial;

T_{df} = Temperatura de decomposição final;

T_{d1} = Temperatura de decomposição 1;

T_{d2} = Temperatura de decomposição 2.

5.3.3 Espectroscopia com Transformada de Fourier (FTIR) das fibras ultrafinas

As possíveis interações entre os constituintes das fibras e o óleo essencial de gengibre foram observadas por FTIR-ATR (Figura 6). Faixas de bandas de óleo essencial de gengibre estão associadas aos estiramentos C=C e C=C-C=C, em 1670 e 1447 cm⁻¹, respectivamente. Foi observado o estiramento associado à ligação C-H em 2926 cm⁻¹ (SCHULZ et al., 2005).

No espectro da proteína isolada e da zeína (Figura 6a), as principais bandas de interesse foram relacionadas ao estiramento em 1645 cm⁻¹ da ligação C=O da amida I e ao estiramento em 1518 cm⁻¹ atribuído a ligação C-N da amida II. (DASHDORJ et al., 2015; DENG et al., 2018). A banda em 1091 cm⁻¹ no espectro de PEO está relacionada ao estiramento da ligação C-O do éter na da cadeia do POE (Figura 6a).

Nos espectros das fibras (Figura 6b) houve a presença da banda em 3292 cm^{-1} , que é atribuído ao estiramento O-H da amida I (MORSY et al., 2017). Todas as bandas observadas nos espectros das fibras foram relacionadas aos polímeros presentes, comprovando as interações poliméricas. As bandas em $2900 - 2940\text{ cm}^{-1}$ estão relacionados aos estiramentos C-H para todos os espectros observados. Foi observado um leve deslocamento na banda do óleo essencial em 1646 cm^{-1} para 1650 cm^{-1} e, 1446 cm^{-1} para 1543 cm^{-1} , confirmando a interação entre o composto majoritário do óleo essencial α -zingiberene com os grupamentos carboxílico e amino relacionado aos componentes da fibra, sendo estes o POE, proteína isolada de soja e a zeína.

Na Figura 6 está apresentado os espectros ATR-FTIR dos polímeros constituintes e das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre.

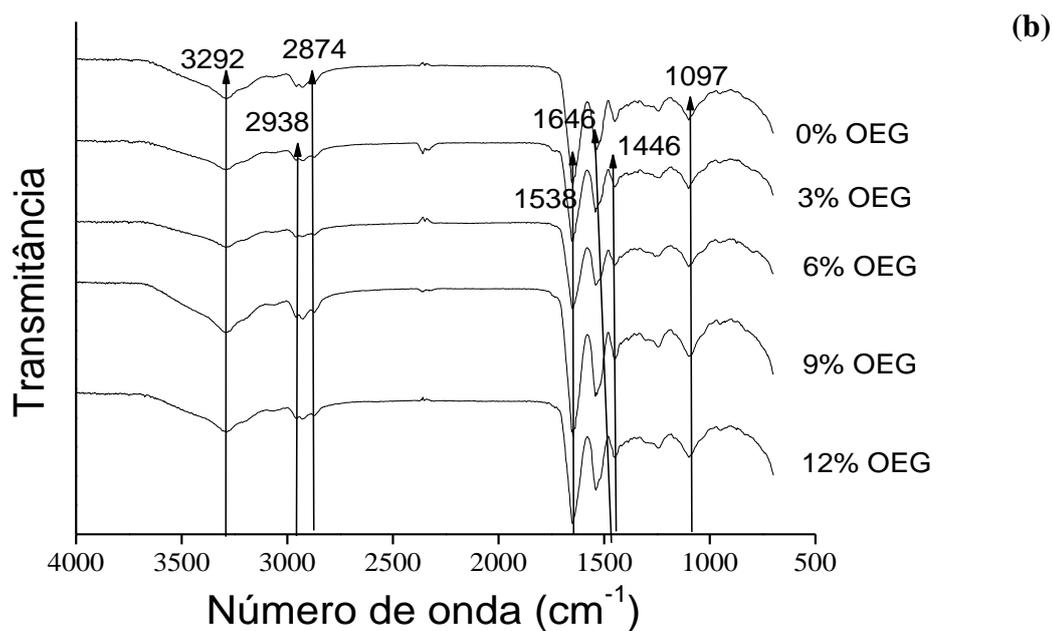
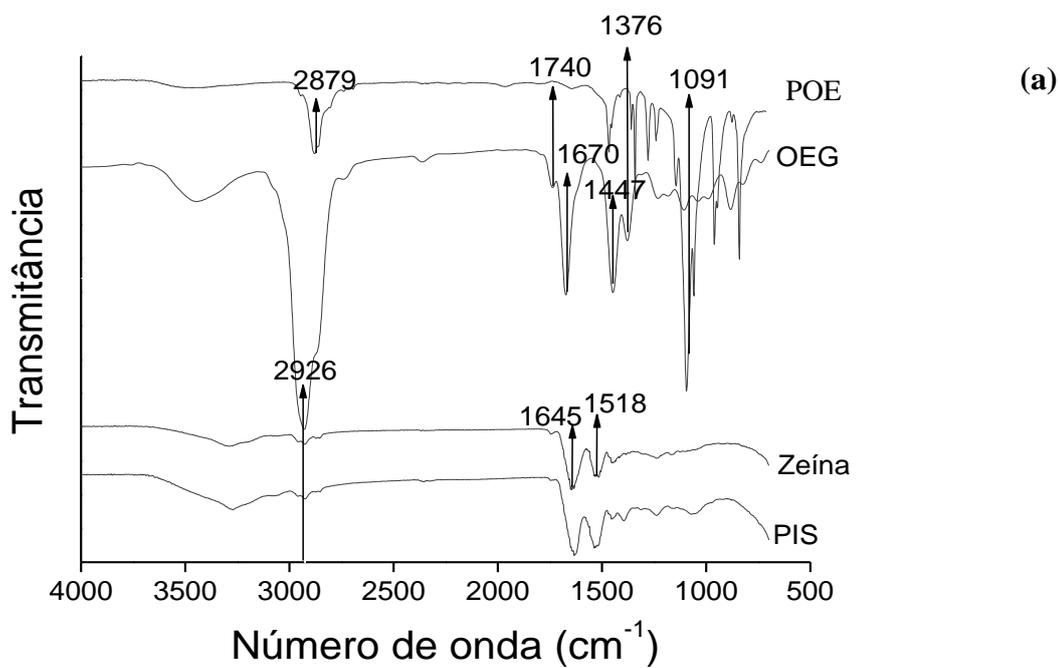


Figura 6- Espectro ATR- FTIR dos (a) polímeros constituintes e das (b) fibras ultrafinas de proteína isolada de soja (PIS) – poli (óxido de etileno) (POE)- zeína com diferentes concentrações de OEG.

5.3.4 Cristalinidade relativa

Os padrões de difração de raios-X e a cristalinidade relativa (CR) dos constituintes e das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEG estão apresentados na Figura 7.

Analisando apenas os constituintes, foi observado que o poli (óxido de etileno) exibiu dois picos de difração intensos, em $19,16^\circ$ e $23,38^\circ$. Além disso, a proteína isolada de soja apresentou um pico em $21,5^\circ$, e a zeína em $20,64^\circ$ e $9,14^\circ$, o que está de acordo com outros autores (KAYACI; UYAR, 2012; XU, et al., 2012). Os picos dos constituintes, com exceção do POE, também foram observados nas fibras ultrafinas sem adição de óleo e contendo 3% de óleo essencial.

A partir da adição de 6% de óleo essencial nas fibras, os picos referentes aos constituintes proteicos foram reduzidos e nenhum dos picos de difração do POE apareceu nos padrões de difração das fibras. Essa redução e o desaparecimento dos picos possivelmente diminuíram a cristalinidade relativa das fibras. Xu et al., (2012) relataram que a intensidade dos picos de difração de proteína isolada de soja diminuiu em misturas de proteína isolada de soja e poli (óxido de etileno). Deitzel et al., (2001) e Xu et al., (2012) também relataram o desaparecimento dos picos de POE em fibras. Segundo Xu et al., (2012) e Zhao et al., (2014), a diminuição da cristalinidade relativa de um material pode ser devido à interferência de outros componentes presentes nos compósitos, os quais dificultam a conformação das cadeias do polímero durante a cristalização e conseqüentemente facilita a formação de estrutura mais amorfa.

A cristalinidade de um material polimérico pode definir a sua aplicação, uma vez que uma maior cristalinidade confere aos polímeros maior resistência devido ao empacotamento das macromoléculas Lim; Tan; ng, (2008). A fibra ultrafina com 12% de óleo essencial de gengibre apresentou menor cristalinidade, portanto, seria interessantes para aplicação em embalagem ativa na qual a fibra poderia ser usada apenas como uma etiqueta ativa dentro da embalagem convencional, não sendo necessário alta resistência.

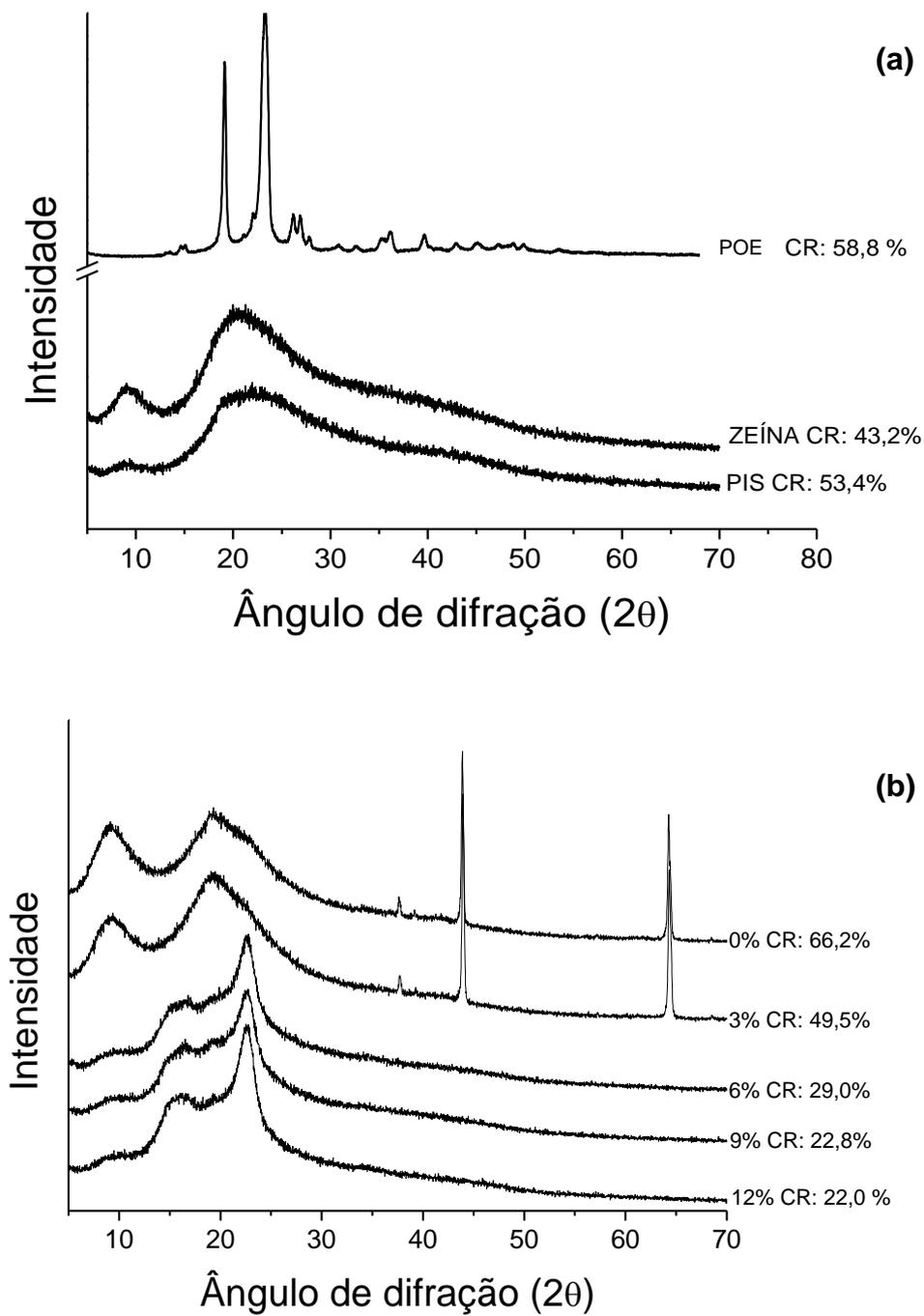


Figura 7- DRX dos (a) constituintes e das (b) fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEG.

5.3.5 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas

Em todas as concentrações de óleo essencial de gengibre nas fibras ultrafinas foi observado reduções do crescimento de *L. monocytogenes*, pela ação de substâncias voláteis em micro-atmosfera. As diferentes concentrações de óleo essencial (3, 6, 9 e 12%) reduziram o crescimento bacteriano, em 79,5, 75,5, 100 e 100%, respectivamente, sugerindo que a maior atividade do óleo pode estar diretamente ligada à sua concentração.

A atividade de compostos antimicrobianos em fibras também foi estudada por outros autores. Pan et al., (2014) avaliaram o efeito do timol encapsulado no caseinato de sódio e relatou que o timol encapsulado era mais eficaz do que o timol não encapsulado na inibição de agentes patogênicos no leite. Antunes et al., (2017) avaliaram o efeito óleo essencial de eucalipto encapsulado em fibras de zeína usando um complexo de inclusão em β -ciclodextrina e observaram maior atividade contra bactérias de *S. aureus* e *L. monocytogenes* em comparação com não encapsuladas.

Estudos sobre o encapsulamento de óleo essencial de gengibre em matrizes poliméricas por *eletrospinning* são limitados. No presente estudo, observou-se que o óleo essencial de gengibre nas fibras teve um efeito significativo contra *L. monocytogenes*. Para avaliar a sua eficácia em embalagens antimicrobianas alimentares, as fibras ultrafinas contendo óleo essencial de gengibre foram avaliadas *in situ* utilizando queijo Minas frescal como matriz alimentar.

5.4 Atividade antimicrobiana *in situ* do óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras ultrafinas

A eficácia do óleo essencial de gengibre encapsulado em fibras no controle de *L. monocytogenes* em queijo minas frescal pode ser observada na Figura 8. Após o terceiro dia de armazenamento, as contagens bacteriana foram diminuindo nos pedaços de queijo armazenados na embalagem que continha a fibra com óleo essencial quando comparado com o controle positivo (apenas a adição de fibra Inóculo livre) e com os queijos armazenados na embalagem de controle negativo

(fibra sem adição de óleo). Esses resultados podem sugerir que o óleo foi gradualmente liberado, prolongando sua atividade antimicrobiana.

De acordo com Dannenberg et al., (2017), a liberação do óleo essencial está relacionada à afinidade entre os compostos não-polares do óleo e do queijo que facilita a migração do óleo na fibra para a superfície do produto, permitindo uma melhor dispersão do antimicrobiano nos alimentos.

As reduções mais expressivas de *Listeria* para os queijos armazenados na embalagem que continha a fibra com óleo essencial foram observadas no 3º e no 9º dia de armazenamento sendo que no 9º dia os contagens diminuíram de 4.98 log UFC.g⁻¹ para 3.62 log UFC.g⁻¹ (p <0,05) nos queijos armazenados na embalagem que continha a fibra com óleo essencial quando comparado com o queijo armazenado sem fibra ultrafina.

A análise *in situ* demonstrou que as fibras ativas podem ser uma alternativa efetiva natural para o controle de *L. monocytogenes* em queijos minas frescal durante o armazenamento. Neste estudo, observou-se que o encapsulamento de óleo nas fibras pode prolongar sua atividade antimicrobiana. Além disso, a liberação dos compostos de óleos essenciais para os alimentos pela volatilização não requer contato direto, o que pode permitir a redução de características sensoriais indesejáveis que ele possa possuir.

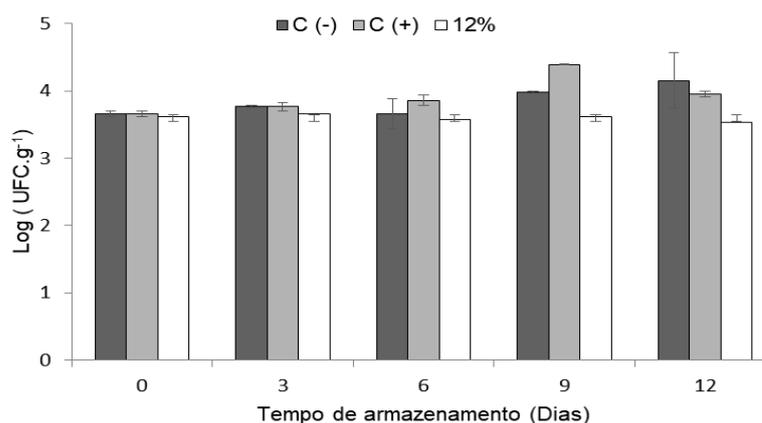


Figura 8- Atividade antimicrobiana *in situ* das fibras ultrafinas contendo óleo essencial de gengibre, contra *L. monocytogenes* em queijo Minas frescal.

*Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. C-: Tratamento controle fibra sem óleo; C+: Tratamento controle do crescimento de *L.monocytogenes* 12%: Tratamento com 12% de óleo essencial de gengibre nas fibras.

6 CONCLUSÕES

O óleo essencial de gengibre apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positiva (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, e *Pseudomonas aeruginosa*) O constituinte majoritário do óleo essencial de gengibre foi α -zingiberene. As fibras elaboradas com a mistura de proteína isolada de soja-poli (óxido de etileno)-zeína, independente da concentração do óleo essencial, apresentaram morfologia homogênea, e sem a presença de *beads* mas alterou ligeiramente as propriedades térmicas das fibras e diminuiu a cristalinidade relativa. O óleo essencial quando encapsulado em fibras ultrafinas apresentou atividade antimicrobianas contra *L. monocytogenes* pela ação dos voláteis (micro-atmosfera). A atividade antimicrobiana *in situ* das fibras contendo óleo essencial de gengibre em queijo minas frescal, também reduziu significativamente a concentração de *L. monocytogenes* durante o armazenamento refrigerado (4°C) de 12 dias, demonstrando potencial para aplicação em embalagens ativas de alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBORZI, S.; LIM, L-T.; KAKUDA, Y. Electrospinning of SodiumAlginate-Pectin Ultrafine Fibers. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. 101-107, 2010.

ALI, B.H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M.O.; NEMMAR, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 409–420, 2008.

ANTUNES, M.D.; DANNENBERG, G. S.; FIORENTINI, A. M.; PINTO, V. Z.; LIM, L-T.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 874–882, 2017.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber, **Food Control**, v. 76, p. 1-12, 2017.

AYTAC, Z.; IPEK, S.; DURGUN, E.; TEKINAY, T.; UYAR, T. Antibacterial electrospun zein nanofibrous web encapsulating thymol/cyclodextrin-inclusion complex for food packaging. **Food Chemistry**, v. 233, p.117–124, 2017.

BABITHA, S.; RACHITA, L.; KARTHIKEYAN, K.; SHOBA, E.; JANANI, I.; POORNIMA, B.; SAI, K.P. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 1, p. 52-90, 2017.

BAG, A.; CHATTOPADHYAY, R. R. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidante efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. **Plos one**, v 10, p. 1-17, 2015.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BARCELLOS, T. G. **Pesquisa de *E.coli* em Queijo Minas Frescal oriundos de feiras livres no Distrito Federal**. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos), Brasília- DF, 2006.

BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; MANOEL, A. V.; D'OVÍDIO, L.; SILVA, L. C.; FRANCO, B. D. G. M.; BELOTI, V. *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4. p.1678-4404, 2007.

BARSANO, P.R.; BARBOSA, R. P. **Segurança do trabalho: guia prático e didático**. 1. ed. São Paulo: Érica, 2012. 350 p.

BEKIRANOV, S.; BRUINSMA, R.; PINCUS, P. Solution behavior of poly(ethylene oxide) in water as a function of temperature and pressure. **Physical Review E**. v. 55, n. 1, p. 577-585, 1997.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325-347, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 03, p. 223-253, 2004.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v.54, p.111–119, 2015.

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.

CARVALHO, R. J.; SOUZA, G. T.; HONÓRIO, V. G.; SOUSA, J.P.; CONCEIÇÃO, M. L.; MAGANANI, M.; SOUZA, E. L. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v. 52, p. 59-65, 2015.

CHO, D.; NNADI, O.; NETRAVALI, A.; JOO, Y. L. Electrospun hybrid soy protein/PVA fibers. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 295, p. 763-773, 2010.

CLSI. **Approved Standard**, 11 ed. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 2015a.

CLSI. **Approved Standard**, 9.ed. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 2015b.

COLÍN-OROZCO, J.; ZAPATA-TORRES, M.; RODRÍGUEZ-GATTORNO, G.; PEDROZA-ISLAS, R. Properties of poly (ethylene oxide)/whey protein isolate nanofibers prepared by electrospinning. **Food Biophysics**, v.10, n. 2, p. 134-144, 2015.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: an infectious agent scarcely known in Brazil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.19, n.2, p.195-206, 2008.

CUI, H. Y.; WU, J.; LIN, L. Inhibitory effect of liposome-entrapped lemongrass oil on the growth of *Listeria monocytogenes* in cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 6097-6104, 2016.

DAI, R.; LIM, L. T. Release of allyl isothiocyanate from mustard seed meal powder entrapped in electrospun PLA-PEO nonwovens. **Food Research International**, v. 77, p. 467-475, 2015.

DANNENBERG, G. S.; FUNCK, G. D.; CRUXEN, C. E. S.; MARQUES, J. L.; SILVA, W. P. S.; FIORENTINI, A. M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314-318, 2017.

DASHDORJ, U.; REYES, M. K.; UNNITHAN, A. R.; TIWARI, A-P.; TUMURBAATAR, B.; PARK, C. H.; KIM, C. S. Fabrication and characterization of electrospun zein/Ag nanocomposite mats for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 1-7, 2015.

DAUDT, R. M. et al. Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 420–429, jan. 2014.

DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; BECK-TAN, N. C. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, p. 261–272, 2001.

DENG, L.; ZHANG, X.; LI, Y., QUE, F.; KANG, X.; LIU, Y.; FENG, F.; ZHANG, H. Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 72-80, 2008.

DUSSAULT, D.; VU, K. D.; LACROIX, M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **Meat Science**, v. 96, n.1, p. 514–520, 2014.

EL-BAROTY, G. S.; EL-BAKY, H. H.; FARAG, R. S.; SALEH, M. A. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, p. 167-174, 2010.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 628-647, 2013.

FABRA, M. J.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. On the use of different hydrocolloids as electrospun adhesive interlayers to enhance the barrier properties of polyhydroxyalkanoates of interest in fully renewable food packaging concepts. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 77-84, 2014.

FATHI, M.; MARTÍN, A.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39 n.1, p. 18-39, 2014.

FONG, H.; CHUN, I.; RENEKER, D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. **Polymer**, v. 40, p. 4585–4592, 1999.

GARCÍA-TEJEDA, Y. V. et al. Physicochemical and mechanical properties of extruded laminates from native and oxidized banana starch during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 447–455, 2013.

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 and Technology**, v. 66, p. 332-339, 2016.

GIBBS, B.F. et al., Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213-224, 1999.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; GOMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, p. 982-989, 2009.

HUANG, W. **Electrospinning of Ethyl Cellulose - Poly(ethylene oxide) and Cellulose Acetate – Poly(ethylene oxide) Nonwovens for the Encapsulation and Release of Thymol and Carvacrol**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade de Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 2016.

ISEPON, J. S.; SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira - SP. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n. 106, p. 89-94, 2003.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

JINGOU, J.; SHILEI, H.; WEIQI, L.; DANJUN, W.; TENGFEI, W.; YI, X. Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 103–107, 2011.

JULIANI, R. H.; SIMON, J. E.; QUANSAH, C.; ASARE, E.; AKROMAH, R.; ACQUAYE, D.; ASANTE-DARTEY, J.; MENSAH M. L. K.; FLEISCHER, T. C.; DICKSON, R.; F ANNAN, K.; MENSAH, A.Y. Chemical diversity of Lippia multiflora essential oils from West Africa. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 49–55, 2011.

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

KHOSHAKHLAGH, K.; KOOCHEKI, A.; MOHEBBI, M.; ALLAFCHIAN, A. Development and characterization of electrospayed Alyssum homolocarpum seed gum nanoparticles for encapsulation of D-limonene. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.490, p. 562 575, 2017.

KITAMURA, K. Genetic improvement of nutritional and food processing quality in soybean. *Japan Agricultural Research Quarterly*, v. 29, p. 1-8, 1995.

KONG, L.; ZIEGLER, G. R. Fabrication of pure starch fibers by electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 20-25. 2014.

LAI, H.-M.; GEIL, P. H.; PADUA, G. W. X-ray diffraction characterization of the structure of zein – oleic acid films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 71, n. 8, p. 1267–1281, 1999.

LAKEMOND, C.M.M.; JONGH, H.H.J.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.G.J. Differences in denaturation of genetic variants of soy glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p. 4275-4281, 2002.

LANCŪSKI, A.; VASILYEV, G; PUTAUX, J. L.; ZUSSMAN, E. Rheological properties and electrospinnability of high-amylose starch in formic acid. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 8, p. 2529-2536, 2015.

LEE, J.-H., LEE, J., SONG, K. BIN. Development of a chicken feet protein film containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 208-215, 2015

LEE, K. Y.; JEONG, L.; KANG, Y. O.; LEE, S. J.; PARK, W. H. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1020-1032, 2009.

LIM, C. T.; TAN, E. P.; NG, S.Y. Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers. **Applied Physics Letters**, v. 92, p. 141908, 2008.

LIM, LOONG-TAK. **Active and intelligent packaging materials**. Comprehensive biotechnology. 2 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 629-644 p, 2011.

LU, J. W.; ZHU, Y. L.; GUO, Z. X.; HU, P.; YU, J. Electrospinning of sodium alginate with poly (ethylene oxide). **Polymer**, v, 47, n. 23, p. 8026-8031, 2006.

LUBER, P.; CRERAR, S.; DUFOUR, C.; FARBER, J.; DATTA, A.; TODD, E. C. D. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization — Recommendations for improved prevention and control. **Food Control**, v. 22, n. 9, p.1535–1549, 2011.

MACHADO, Á. R.; ABRÃO, A.M.; COELHO, R.T.; SILVA, M.B. **Teoria da usinagem dos materiais**. 2.ed. São Paulo: Blucher, 2011. 397 p.

MARQUES, J. L.; FUNCK, G. D.; DANNENBERG, G. S.; CRUXEN, C. E. S.; HALAL, S. L. M.; DIAS, A. R. G.; FIORENTINI, A. M.; SILVA, W. P. Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 159-163, 2017.

MENDES, A.C.; STEPHANSEN. K.; CHRONAKIS, L.S. Electrospinning of food proteins and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 1-16, 2017.

MENUT, C.; LANATY, G.; BESSIERE, J. M.; KOWDAV, J. Aromatic plants of tropical Central Africa. XIII. Rhizomes volatile components of two Zingiberales from the Central Africa Republic. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, p. 101-108, 1994.

MESOMO, M. C. **Obtenção de extrato de gengibre (zingiber officinale roscoe) usando co2 supercrítico e propano comprimido: Cinética de extração e atividade biológica**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MIRANDA, P. C.; BARRETO, N. S. E., Avaliação Higiênico Sanitária de diferentes estabelecimentos de comercialização da carne de sol no município de Cruz das Almas-Bahia. **Revista Caatinga**, v. 25, p.166-172, 2012.

MOOMAND, K.; LIM, L. T. Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres. **Food Research International**, v. 62, p. 523-532, 2014.

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.

MORSY, R.; HOSNY, M.; REICHA, F.; ELNIMR, T. Developing and physicochemical evaluation of cross-linked electrospun gelatin–glycerol nanofibrous membranes for medical applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1135, p. 222-227, 2017.

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. 645–65. 2012.

NEO, Y. P.; SWIFT, S.; RAY, S.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; JIN, J.; PERERA, C. O. Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3192-3200, 2013.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382–388, 1994.

NOORI, S.; ZEYNALI, F.; ALMASI, H. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food Control**, v. 84, p. 312-320, 2018.

PAN, K.; CHEN, H.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1649-1657, 2014.

PELTZER, M.; WAGNER, J.; JIMENEZ, A. Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 6, p. 938-946, 2009.

PERRY, K.S.P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos**. Química Nova. São Paulo, v.27, p.293-300, 2004.

PITAKSUTTEEPONG, T. Nanotechnology: Effective topical delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 16–17, fev. 2016.

RAMAKRISHNA, S.; KAZUTOSHI, F.; WEE-EONG, T.; TELK-CHENG, L.; ZUWEI, M. **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**. World Scientific Publishing: Singapore, p. 382, 2005.

RAVICHANDRAN, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; GANESH, V.; RICKE, S. C.; SINGH, S. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in broth and chicken meat system. **Journal of Food Safety**, v. 31, p. 462-471, 2011.

RAVINDRAN, P.N.; NIRMAL BABU, K. **Ginger: the genus zingiber**. Washington: CRC Press, p. 552, 2005.

REDDY, N.; YANG, Y. Potential of plant proteins for medical applications. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 490–498, 2011.

RENEKER, D. H.; YARIN, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. **Polymer**, v. 49, n.10, p. 2387-2425, 2008.

RESTUCCIA, D.; SPIZZIRRI, G.U.; PARISI, O.I.; CIRILLO, G.; IEMMA, F.; PUOCI, F.; VINCI, G.; PICCI, N. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. **Food Control**, v. 21, p. 1425-1435, 2010.

ROBERTSON, G. L. **Food packaging principles and practices**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, p. 568, 2006.

SALLES, T. H. C. **Eletrofição de nanofibras de blendas de gelatina/pvp (poli (vinil pirrolidona) a partir de soluções de água e ácido acético**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SA-NGUANPUAG, K.; KANLAYANARAT, S.; SRILAONG, V.; TANPRASERT, K.; TECHAVUTHIPORN, C. Ginger (*Zingiber officinale*) oil as an antimicrobial agent for minimally processed produce: a case study in shredded green papaya. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 13, p. 895-901, 2011.

SCHULZ, H.; ÖZKAN, G.; BARANSKA, M.; KRÜGER, H.; ÖZCAN, M. Characterization of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 39, n. 2, p. 249–256, 2005.

SETT, S.; LEE, M. W.; WEITH, M.; POURDEYHIMI, B.; YARIN, A. L. Biodegradable and biocompatible soy protein/polymer/adhesive sticky nano-textured interfacial membranes for prevention of esca fungi invasion into pruning cuts and wounds of vines. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n.10, p. 2147-2162, 2015.

SETT, S.; STEPHANSEN, K.; YARIN, A. L. Solution-blown nanofiber mats from fish sarcoplasmic protein. **Polymer**, v. 93, p. 78-87, 2016.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171–192, 2001.

SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, P.; DE HELUANI, C. S.; DE LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3295-3302, 2008.

SIRO, I. **Active and intelligent packaging of food: Progress in food preservation**. 1. ed .Chichester: John Wiley e Sons Ltd, p. 23-48, 2012.

SIVASOTHY, Y.; CHONG, W. K.; HAMID, A.; ELDEEN, I. M.; SULAIMAN, S. F.; AWANG, K. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. **Food Chemistry**, v. 124, p. 514-517, 2011.

SONG, J. H.; KIM, H. E.; KIM, H. W. Production of electrospun gelatina nanofiber by water-based co-solvent approach. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 95-102, 2008.

SRINIVASAN, K. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. **Pharma Nutrition**, v. 5, n.1, p. 18-28, 2017.

TAN, A. CHAWLA, R.; NATASHA, G.; MAHDIBEIRAGHDAR, S.; JEYARAJ, R.; RAJADAS, J.; HAMBLIN, M.R.; SEIFALIAN, A.M. Nanotechnology and regenerative therapeutics in plastic surgery: The next frontier. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS**, v. 69, p. 1–13, 2016.

TAN, S. H.; INAI, R.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. **Polymer**, v. 46, p. 6128–6134, 2005.

TURINA, A. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO J. A.; PERILLO M. A. Natural terpenes: Self assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101–113, 2006.

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

VAZ, C.M.; FOSSEN, M.; TUIL, R.F.V.; GRAAF, L.A.; REIS, R.L.; CUNHA, A.M. Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 65, p. 60–70, 2003.

VEGA-LUGO, A. C.; LIM, L. T. Effects of poly(ethylene oxide) and pH on the electrospinning of whey protein isolate. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 50, n.16, p. 1188-1197, 2012.

WANG, H.; SHE, Y.; CHU, C.; LIU, H.; JIANG, S.; SUN, M.; JIANG, S. Preparation, antimicrobial and release behaviors of nisin-poly (vinyl alcohol)/wheat gluten/ZrO₂ nanofibrous membranes. **Journal of Materials Science**, v. 50, p. 5068-5078, 2015.

WANG, Q.; YIN, L.; PADUA, G. W. Effect of hydrophilic and lipophilic compounds on zein microstructures. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p.174–181, 2008.

WANG, S.; MARCONE, M. F.; BARBUT, S.; LIM, L. T. Electrospun soy protein isolate-based fiber fortified with anthocyanin-rich red raspberry (*Rubus strigosus*) extracts. **Food Research International**, v. 52, p. 467-472, 2013.

WANG, W. **Carriers for Controlled Release of Allyl Isothiocyanate, Diacetyl and Cinnamaldehyde for Antimicrobial Active Packaging**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade de Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 2016.

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

WINTHER, M.; NIELSEN, P. V. Active packaging of cheese with allyl isothiocyanate, an alternative to modified atmosphere packaging. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 10, p. 2430-2435, 2006.

XU, X.; JIANG, L.; ZHOU, Z.; WU, X.; WANG, Y. Preparation and properties of electrospun soy protein isolate/polyethylene oxide nanofiber membranes. **Applied Materials and Interfaces**, v. 4, p. 4331-4337, 2012.

XUE, J.; HE, M.; LIU, H.; NIU, Y.; CRAWFORD, A.; COATES, P. D.; CHEN, D.; SHI, R.; ZHANG, L. Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for antiinfective tissue regeneration membranes. **Biomaterials**, v. 35, n. 34, p. 9395-9405, 2014.

ZHAO, R.; LI, X.; SUN, B.; ZHANG, Y.; ZHANG, D.; TANG, Z.; CHEN, X.; WANG, C. Electrospun chitosan/sericin composite nanofibers with antibacterial property as potential wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.68, p. 92-97, 2014.