

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



TESE DE DOUTORADO

Fibras ultrafinas produzidas a partir de poli (ácido láctico), lignina e óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobrepostas em filmes de amido para aplicação em embalagens de alimentos

Milena Ramos Vaz Fontes

Engenheira Bioquímica

Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Pelotas, 2021

Milena Ramos Vaz Fontes

Fibras ultrafinas produzidas a partir de poli (ácido láctico), lignina e óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobrepostas em filmes de amido para aplicação em embalagens de alimentos

Tese 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 Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias (UFPel – PPGCTA)

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

Pelotas, 2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias (PPGCTA-UFPeI)

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini (PPGCTA-UFPeI)

Prof^a. Dr^a. Caroline Costa Moraes (PPCEM-UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Gabriela Silveira da Rosa (PPCEM-UNIPAMPA)

Dr^a Laura Martins Fonseca (PPGCTA-UFPeI)

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F683f Fontes, Milena Ramos Vaz

Fibras ultrafinas produzidas a partir de poli (ácido láctico), lignina e óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobrepostas em filmes de amido para aplicação em embalagens de alimentos / Milena Ramos Vaz Fontes ; Alvaro Renato Guerra Dias, orientador ; Elessandra da Rosa Zavareze, coorientadora. — Pelotas, 2021.

108 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Amido. 2. Electrospinning. 3. Bicamadas. 4. Embalagens biodegradáveis. 5. Embalagens ativas. I. Dias, Alvaro Renato Guerra, orient. II. Zavareze, Elessandra da Rosa, coorient. III. Título.

CDD : 664

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Veronice e Airton e aos meus irmãos, Mauricio e Vívian,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar e iluminar as minhas escolhas, me fazendo crer que estou, e sempre estive no caminho certo.

Aos meus pais Airton e Veronice, por todo o suporte, amor, carinho e zelo. Pessoas que nunca mediram esforços para que eu pudesse desfrutar do privilégio de estudar. Especialmente à minha mãe, que desde sempre me incentivou à leitura, com livrinhos coloridos; à arte, com a criação de desenhos e pinturas divertidas; aos cálculos, com continhas simples de somar e subtrair, desde quando eu era um “pinguinho” de gente. Jamais esquecerei desses momentos de aprendizado e levarei comigo pra vida inteira. Quando eu compartilhava o meu questionamento sobre o que gostaria de ser quando crescesse, a resposta era sempre: “- Vai ser o que quiser e desejar, e estaremos sempre aqui para te apoiar!”

Aos meus irmãos Mauricio e Vívian, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e motivando.

Aos meus sobrinhos e também afilhados, filhos do meu coração: Alice, Mercedes e o pequeno João Pedro, pois sem dúvidas, são motivo da minha fé e dedicação para tentar contribuir com um mundo melhor.

À minha vó Maria, por toda a preocupação e por todas as orações de proteção.

Aos meus amigos(as), os (as) quais não citarei nomes para não esquecer de ninguém (mas sei que sabem quem são), por muitas vezes termos que conviver com a ausência física, mas sempre com a presença de coração.

Ao meu grupo amado – Semeadoras, que jamais deixaram que eu esmorecesse na fé durante alguns momentos tumultuosos da caminhada.

Ao meu namorado Arthur, por todo amor, companheirismo e compreensão.

Aos meus sogros Flávio e Jussara, por todo carinho, pelas palavras, trocas de ideias e pensamentos sempre positivos.

Aos colegas de laboratório, pela parceria, ajuda, aprendizados e momentos de descontração.

Às parcerias formadas para o desenvolvimento desta tese: FURG (Prof. Paulo Beck e Marcelo) e UNIPAMPA (Profª. Caroline e Camila).

Aos membros da banca, pela disponibilidade e valiosas contribuições.

Aos meus orientadores, Alvaro e Elessandra, pelas oportunidades que me foram dadas, pelos ensinamentos, por acreditarem em mim e no meu trabalho.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

(Proust)

RESUMO

FONTES, Milena Ramos Vaz. **Fibras ultrafinas produzidas a partir de poli (ácido láctico), lignina e óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobrepostas em filmes de amido para aplicação em embalagens de alimentos.** 2021. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O presente estudo teve como objetivo produzir filmes bicamadas a base de amido de trigo ou feijão, sobrepostos com fibras ultrafinas de poli ácido láctico (PLA), lignina e óleo essencial de pimenta rosa (OEPR). No primeiro capítulo, fibras ultrafinas de PLA e lignina nas concentrações de 0,5, 1,5 e 2,5% foram produzidas pela técnica de *electrospinning*. Neste estudo, foram obtidas fibras com diâmetros médios entre 314 e 587 nm e estabilidade térmica com pico de degradação em torno de 360 °C. A análise de molhabilidade mostrou que todos os tratamentos apresentaram superfície hidrofóbica, com ângulos de contato acima de 100°. As fibras contendo 2,5% de lignina exibiram maiores atividades antioxidantes, com inibição em torno de 70% para os radicais DPPH e ABTS. No segundo capítulo, foram produzidas fibras de PLA e OEPR nas concentrações de 10, 20 e 30%, sendo caracterizadas pelas mesmas metodologias do capítulo anterior. Além disso, avaliou-se o efeito antimicrobiano *in vitro* e *in situ* das fibras, que foram aplicadas na tampa de uma embalagem simulada de *cream cheese*, substituindo o selo de alumínio convencional. O componente majoritário do OEPR foi o mirceno e as menores concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) foram encontradas frente a *Staphylococcus aureus*, com 256,9 e 385,3 mg/mL, respectivamente e *Listeria monocytogenes*, com CIM de 513,8 e CBM de 642,3 mg/mL. As fibras aplicadas à embalagem de *cream cheese* apresentaram efeito inibitório no vigésimo primeiro dia de armazenamento, para *L. monocytogenes*. Para *S. aureus*, as fibras inibiram o crescimento das colônias no décimo quarto e vigésimo primeiro dia, com reduções de 30 e 62%, respectivamente. No terceiro capítulo, foram produzidas fibras ultrafinas com 8% de PLA, 2,5% de lignina e 30% de OEPR, caracterizando-as conforme o primeiro capítulo. Para a formação dos filmes bicamadas, foram elaborados filmes de amido de trigo (FAT) e feijão HTC (*hard to cook*) (FAF) e em seguida, as fibras foram depositadas sobre eles. Constatou-se que o conjunto de FAT+PLA/lig/OEPR apresentou maior opacidade, com 71%. O tratamento com FAF+PLA/lig/OEPR demonstrou ser mais rígido, com resistência à tração de 6,7 MPa e indicou maior alongação, com 45%, em relação ao tratamento com FAT+PLA/lig/OEPR. Também exibiu menor teor de umidade, com 15%, e menor solubilidade em água, com 16%. Em relação a permeabilidade ao vapor de água, o tratamento com FAF+PLA/lig/OEPR não diferiu estatisticamente do tratamento FAT+PLA/lig/OEPR, com aproximadamente 2,0 g.mm/m²dia.kPa. Assim, ambos os tratamentos são promissores para aplicação em embalagens alimentares devido ao sinergismo do conjunto de polímeros e bioativos utilizados, que demonstraram resultados potenciais na preservação de alimentos.

Palavras-chave: amido; *electrospinning*; bicamadas; embalagens biodegradáveis; embalagens ativas.

Abstract

FONTES, Milena Ramos Vaz. **Ultrafine fibers produced from poly (lactic acid), lignin and essential oil of pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) overlaid on starch films for application in food packaging.** Doctoral Thesis (PhD in Food Science and Technology) – Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

The present study aimed to produce bilayer films based on wheat or bean starch, overlaid with ultra-fine polylactic acid (PLA) fibers, lignin and pink pepper essential oil (PPEO). In the first chapter, ultrafine fibers of PLA and lignin at concentrations of 0.5, 1.5 and 2.5% were produced by the electrospinning technique. In this study, fibers with average diameters between 314 and 587 nm and thermal stability with degradation peak around 360 °C were obtained. The wettability analysis showed that all treatments had a hydrophobic surface, with contact angles above 100°. Fibers containing 2.5% lignin exhibited greater antioxidant activities, with around 70% inhibition of DPPH and ABTS radicals. In the second chapter, fibers of PLA and PPEO were produced at concentrations of 10, 20 and 30%, being characterized by the same methodologies as in the previous chapter. In addition, the in vitro and in situ antimicrobial effect of the fibers was evaluated, which were applied to the lid of a simulated cream cheese package, replacing the conventional aluminum seal. The major component of the PPEO was myrcene and the lowest minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) were found against *Staphylococcus aureus*, with 256.9 and 385.3 mg/mL, respectively, and *Listeria monocytogenes*, with MIC of 513.8 and MBC of 642.3 mg/ml. Fibers applied to cream cheese packaging showed an inhibitory effect on the twenty-first day of storage for *L. monocytogenes*. For *S. aureus*, fibers inhibited colony growth on the fourteenth and twenty-first day, with reductions of 30 and 62%, respectively. In the third chapter, ultrafine fibers were produced with 8% PLA, 2.5% lignin and 30% PPEO, characterizing them according to the first chapter. For the formation of bilayer films, wheat starch films (WSF) and HTC beans (hard to cook) (BSF) were prepared and then the fibers were deposited on them. It was found that the set of WSF+PLA/lig/PPEO had higher opacity, with 71%. Treatment with BSF+PLA/lig/PPEO proved to be more rigid, with a tensile strength of 6.7 MPa and indicated greater elongation, with 45%, compared to treatment with WSF+PLA/lig/PPEO. It also exhibited lower moisture content, with 15%, and lower water solubility, with 16%. Regarding water vapor permeability, the treatment with BSF+PLA/lig/PPEO did not differ statistically from the WSF+PLA/lig/PPEO treatment, with approximately 2.0 g.mm/m²dia.kPa. Thus, both treatments are promising for application in food packaging due to the synergism of the set of polymers and bioactives used, which showed potential results in food preservation.

Keywords: active packaging; bilayers; biodegradable packaging; electrospinning; starch.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de estação de <i>electrospinning</i>	17
Figura 2 - Álcoois precursores de fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H).	19
Figura 3 - Morfologia, frequência e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas de PLA com: (a, b) 0% de lignina, (c, d) 0,5% de lignina, (e, f) 1,5% de lignina e (g, h) 2,5% de lignina.	31
Figura 4 - Curvas da análise termogravimétrica (TGA) (a) e da primeira derivada (b) dos constituintes isolados e das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de lignina.	32
Figura 5 - Espectro FTIR-ATR das fibras ultrafinas de PLA com 0, 0,5, 1,5 e 2,5% de lignina.	34
Figura 6 - Ângulos de contato das fibras ultrafinas de PLA com diferentes concentrações de lignina: (a) 0%, (b) 0,5%, (c) 1,5% e (d) 2,5%.	35
Figura 7 - Atividade antioxidante das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de lignina.	37
Figura 8 - Simulação das embalagens de <i>cream cheese</i> no ensaio de avaliação antimicrobiana.	46
Figura 9 - Morfologia e distribuição de frequência das fibras ultrafinas com poli (ácido láctico) (PLA) e diferentes concentrações de óleo essencial de pimenta rosa (OEPR).	53
Figura 10 - Curvas da análise termogravimétrica (TGA) (a) e da primeira derivada (b) dos constituintes isolados e das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEPR.	56
Figura 11 - Espectro FTIR-ATR dos constituintes isolados e das fibras ultrafinas com PLA e diferentes concentrações de OEPR.	57
Figura 12 - Ensaio de molhabilidade para fibras ultrafinas de PLA (a), PLA + 10% OEPR (b), PLA + 20% OEPR e PLA + 30% OEPR.	58
Figura 13 - Atividade antimicrobiana do OEPR por ação de voláteis por meio do ensaio de micro-atmosfera sobre o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>	61
Figura 14 - Avaliação do efeito da aplicação das fibras ultrafinas e do tempo de armazenamento na presença de <i>L. monocytogenes</i> . C (-) = Controle negativo; C (+) = Controle positivo; 30% = Fibras ultrafinas com 30% de OEPR.	63

<p>Figura 15 - Avaliação do efeito da aplicação das fibras ultrafinas e do tempo de armazenamento na presença de <i>S. aureus</i>. C (-) = Controle negativo; C (+) = Controle positivo; 30% = Fibras ultrafinas com 30% de OEPR.</p>	64
<p>Figura 16 - Filmes de amido de trigo dispostos no coletor de alumínio antes da sobreposição das fibras (a) e filmes de amido de trigo com as finas ultrafinas sobrepostas (b)</p>	73
<p>Figura 17 - Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas de PLA/lig/OEPR.</p>	77
<p>Figura 18 - Morfologia dos filmes bicamadas referentes a: superfícies dos tratamentos FAT (filme de amido de trigo), FAT + PLA (filme de amido de trigo e fibras de poli ácido láctico), FAT + PLA/lig/OEPR (filme de amido de trigo e fibras de poli ácido láctico, lignina e óleo essencial de pimenta rosa), FAF (filme de amido de feijão), FAF + PLA (filme de amido de feijão e fibras de poli ácido láctico), FAF + PLA/lignina/OEPR (filme de amido de feijão e fibras de poli ácido láctico, lignina e óleo essencial de pimenta rosa) - (a, c, e, g, i, k) e seção transversal dos tratamentos FAT, FAT + PLA, FAT + PLA/lignina/OEPR, FAF, FAF + PLA, FAF + PLA/lignina/OEPR (b, d, f, h, j, l).</p>	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Viscosidade aparente e condutividade elétrica de soluções poliméricas com diferentes concentrações de lignina.....	29
Tabela 2 - Perfil da composição química do óleo essencial de frutos maduros de pimenta rosa (OEPR).....	48
Tabela 3 - Viscosidade aparente e condutividade elétrica de soluções poliméricas com PLA e diferentes concentrações de OEPR.	50
Tabela 4 - Perfis de temperatura e perda de massa dos constituintes isolados e das fibras ultrafinas avaliadas por TGA.....	54
Tabela 5 - CIM e CBM do OEPR e halos de inibição do OEPR e das fibras ultrafinas contendo 30% de OEPR.....	59
Tabela 6 - Perfis de temperatura e perda de massa da membrana de fibras ultrafinas de PLA/lig/OEPR avaliadas por TGA, com três estágios de decomposição.	77
Tabela 7 - Diâmetros das fibras ultrafinas depositadas na superfície dos filmes bicamadas.	80
Tabela 8 - Propriedades ópticas dos filmes bicamadas.	82
Tabela 9 - Propriedades mecânicas dos filmes bicamadas.....	83
Tabela 10 - Parâmetros de espessura, umidade, solubilidade em água e PVA dos filmes.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid
ANOVA	Análise de variância
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Butil hidroxitolueno
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTG	Termografia derivada
FAF	Filme de amido de feijão
FAT	Filme de amido de trigo
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HTC	Hard to cook
IE	Impacto de elétrons
Lig	Lignina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OE	Óleo essencial
OEPR	Óleo essencial de pimenta rosa
PCL	Policaprolactona
PE	Polietileno
PEO	Poli (óxido de etileno)
PHB	Polihidroxibutirato
PLA	Poli (ácido láctico)
PP	Polipropileno
PVA	Permeabilidade em vapor de água
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
TDf	Temperatura de degradação final

TDi	Temperatura de degradação inicial
TGA	Análise termogravimétrica
UFC	Unidades formadoras de colônia
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

Introdução	16
CAPÍTULO 1	22
Estabilidade térmica, hidrofobicidade e potencial antioxidante de fibras ultrafinas de poli(ácido láctico) e lignina de casca de arroz	22
1.1 Introdução	23
1.2 Material e Métodos	25
1.2.1 Material	25
1.2.2 Preparo das soluções poliméricas	26
1.2.3 Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas	26
1.2.4 Produção das fibras ultrafinas por <i>electrospinning</i>	26
1.2.5 Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas	27
1.2.6 Estabilidade térmica das fibras ultrafinas	27
1.2.7 Grupos funcionais das fibras ultrafinas	27
1.2.8 Molhabilidade das fibras ultrafinas	27
1.2.9 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das fibras ultrafinas	28
1.2.9.1 DPPH	28
1.2.9.2 ABTS	28
1.2.10 Análise estatística	28
1.3 Resultados e Discussão	29
1.3.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas	29
1.3.2 Morfologia das fibras ultrafinas	30
1.3.3 Propriedades térmicas das fibras ultrafinas	31
1.3.4 FTIR das fibras ultrafinas	34
1.3.5 Ângulo de contato das fibras ultrafinas	35
1.3.6 Atividade antioxidante das fibras ultrafinas	36
1.4 Conclusões	38

CAPÍTULO 2.....	39
Fibras ultrafinas de poli (ácido lático) com óleo essencial de pimenta rosa (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi) e sua aplicação em <i>cream cheese</i>.....	39
2.1 Introdução	40
2.2 Material e métodos.....	42
2.2.1 Material	42
2.2.2 Grau de maturação dos frutos de pimenta rosa.....	42
2.2.3 Extração do óleo essencial de frutos de pimenta rosa (OEPR)	42
2.2.4 Composição química do OEPR.....	43
2.2.5 Preparo das soluções poliméricas.....	43
2.2.6 Viscosidade aparente e condutividade das soluções poliméricas.....	44
2.2.7 Produção das fibras ultrafinas por <i>electrospinning</i>	44
2.2.8 Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas	44
2.2.9 Estabilidade térmicas das fibras ultrafinas por TGA	44
2.2.10 Caracterização estrutural das fibras ultrafinas por FTIR-ATR.....	44
2.2.11 Ângulo de contato (molhabilidade)	44
2.2.12 Atividade antimicrobiana	44
2.2.12.1 Teste de disco-difusão do OEPR e das fibras ultrafinas	44
2.2.12.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do OEPR	45
2.2.12.3 Atividade antimicrobiana do OEPR em micro-atmosfera	45
2.2.12.4 Aplicação das fibras ultrafinas em <i>cream cheese</i>	46
2.2.13 Análise estatística	47
2.3 Resultados e discussão	47
2.3.1 Grau de maturação dos frutos de pimenta rosa, rendimento de extração e composição química do OEPR	47
2.3.2 Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas contendo PLA e OEPR.....	50

2.3.3 Morfologia e distribuição de diâmetro das fibras ultrafinas com PLA e diferentes concentrações de OEPR.....	51
2.3.4 Estabilidade térmica das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEPR	54
2.3.5 Caracterização estrutural das fibras ultrafinas com OEPR através da espectroscopia FTIR	57
2.3.6 Molhabilidade das membranas formadas por fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEPR.....	58
2.3.7 Atividade antimicrobiana	58
2.3.7.1 CIM, CBM e disco-difusão.....	58
2.3.7.2 Análise por micro-atmosfera do OEPR.....	60
2.3.7.3 Aplicação das fibras ultrafinas em <i>cream cheese</i>	62
2.4 Conclusão	65
CAPÍTULO 3.....	67
Desenvolvimento e caracterização de filmes bicamada a base de amido recobertos com fibras ultrafinas contendo óleo essencial de pimenta rosa.....	67
3.1 Introdução	68
3.2 Material e métodos.....	70
3.2.1 Material	70
3.2.2 Extração do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR)	70
3.2.3 Composição química do OEPR.....	71
3.2.4 Extração de amido de trigo e feijão	71
3.2.5 Produção dos filmes de amido pela técnica de <i>casting</i>	71
3.2.6 Caracterização das fibras ultrafinas	72
3.2.6.1 Desenvolvimento das fibras ultrafinas via <i>electrospinning</i>	72
3.2.6.2 Viscosidade aparente e condutividade elétrica da solução polimérica	72
3.2.6.3 Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas	72
3.2.6.4 Propriedades térmicas.....	72

3.2.6.5 Caracterização química por FTIR-ATR.....	73
3.2.6.6 Ângulo de contato	73
3.2.6.7 Atividade antioxidante por DPPH e ABTS	73
3.2.7 Caracterização da estrutura bicamada	73
3.2.7.1 Elaboração da bicamada.....	73
3.2.7.2 Morfologia	74
3.2.7.3 Propriedades ópticas.....	74
3.2.7.4 Umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	74
3.2.7.5 Propriedades mecânicas	75
3.2.8 Análise estatística	76
3.3 Resultados e discussão	76
3.3.1 Características da solução polimérica e das fibras ultrafinas.....	76
3.3.2 Características das estruturas bicamadas	78
3.4 Conclusão	86
Considerações Finais	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Introdução

A utilização de novos materiais nanoestruturados vem atraindo considerável interesse na indústria alimentícia, podendo ser empregados principalmente na área de qualidade e segurança dos alimentos (ENESCU et al., 2019). A técnica de *electrospinning* ou eletrofiação permite o uso de polímeros naturais ou sintéticos para a produção de fibras ultrafinas ($100 \text{ nm} < \text{fibras} < 1000 \text{ nm}$) e nanofibras ($< 100 \text{ nm}$), apresentando um excelente custo-benefício, sendo adequada para o encapsulamento de compostos sensíveis a fatores ambientais ou de processamento (BHUSHANI e ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; AHMED et al., 2015). As fibras ultrafinas formadas exibem uma grande área superficial e são capazes de formar redes altamente porosas com interconectividade notável entre seus poros, tornando-as uma opção interessante para uma série de aplicações em diversas áreas (UYAR e KNY, 2017; LIM, 2017).

A técnica de *electrospinning*, ou eletrofiação, utiliza o princípio de aplicar um potencial elétrico a uma solução polimérica e fazer com que um jato do líquido acelere da ponta do capilar em direção a um coletor de carga oposta (BHARDWAJ e KUNDU, 2010). Quando o líquido ao qual o potencial é aplicado tem uma baixa viscosidade, durante a sua trajetória o jato se romperá devido à tensão superficial, resultando na formação de gotículas poliméricas, se caracterizando como *electrospraying*, ou eletropulverização (DEITZEL et al., 2001). No entanto, se o líquido ao qual o potencial é aplicado tiver uma viscosidade maior ($\sim 100 - 20000 \text{ cP}$), haverá menor probabilidade do jato se romper, porque as forças viscoelásticas maiores amorteceriam o mecanismo de quebra. Assim, o líquido seguirá em direção ao alvo aterrado na forma de um jato contínuo, finalmente depositando-se como fibras, constituindo a técnica de *electrospinning* (BHARDWAJ e KUNDU, 2010). Além da tensão superficial e das forças da solução polimérica, existem várias outras variáveis de processamento que são fatores decisivos para o resultado final do processo e o desempenho das fibras ultrafinas fabricadas.

O grande desafio do processo de *electrospinning* está na otimização dessas variáveis para alcançar a morfologia e as propriedades desejáveis das fibras ultrafinas, bem como voltagem aplicada, taxa de fluxo da solução e distância entre o capilar e o coletor bem como os parâmetros da solução polimérica como concentração

do polímero, viscosidade da solução, natureza do solvente e condutividade elétrica da solução (PILLAY et al., 2013). A técnica de *electrospinning* consiste na utilização de um equipamento constituído de quatro componentes principais, ou seja, uma fonte de alta tensão, uma bomba para seringa, seringa com agulha de aço inoxidável e um coletor que pode ser uma placa fixa ou tambor rotativo (BHUSHANI e ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). O esquema do equipamento pode ser visto na Figura 1.

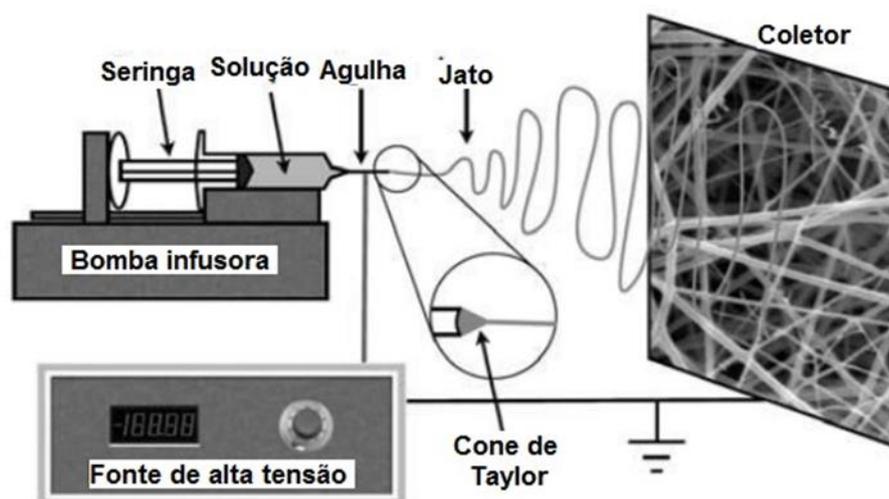


Figura 1 - Exemplo de estação de *electrospinning*.

Fonte: FRANCO et al., 2010.

No processamento e embalagem de alimentos, fibras desenvolvidas através da técnica de *electrospinning* são utilizadas para estabilizar ou controlar compostos bioativos visando preservar a integridade do produto embalado (VEGA-LUGO e LIM, 2009). Dentre esses bioativos, estão os óleos essenciais (OEs), que são extraídos diretamente de plantas e possuem abundância de misturas complexas de vários metabólitos secundários como os compostos fenólicos que apresentam atividades antioxidantes e antimicrobianas (PRAKASH et al., 2018). A pimenta rosa é fruto da árvore de *Schinus terebinthifolius* Raddi, também conhecida como aroeira, amplamente distribuída na América do Sul (GILBERT e FAVORETO, 2011), e alguns estudos da literatura relataram o potencial antimicrobiano e antioxidante do óleo essencial extraído dos seus frutos e folhas (ULIANA et al., 2016; DANNENBERG et al., 2016; DANNENBERG et al., 2017; ROMANI et al., 2018). Entretanto, ainda não existem pesquisas acerca da utilização desse óleo essencial no desenvolvimento de fibras ultrafinas via *electrospinning* e sua aplicação em embalagens com bicamadas.

Diversos polímeros podem ser utilizados para a fabricação de fibras ultrafinas, incluindo o poli (ácido láctico) (PLA), o qual é um polímero sintético derivado de fontes naturais e possui boas propriedades mecânicas, sendo biodegradável e biocompatível (LIU et al., 2018). Características como durabilidade durante o uso e biodegradabilidade após o descarte tornam esse polímero atraente, pois possibilita minimizar problemas ambientais e ao mesmo tempo atender às exigências do mercado (GROSS e KALRA, 2002). Com o intuito de aprimorar algumas propriedades desse material, como resistência e dureza, é possível formar blendas com outros polímeros, tal como a lignina.

Recursos naturalmente abundantes e renováveis, como a biomassa lignocelulósica, possuem grande potencial para substituir materiais não-renováveis provenientes de combustíveis fósseis (THARANATHAN, 2003). A lignina é um polímero heterogêneo e amorfo que compõe de 20 a 30% das paredes celulares das plantas, fornecendo suporte mecânico para os tecidos como proteção contra estresse físico/químico e resistência a doenças, sendo o segundo polímero natural mais abundante ao lado da celulose (SAITO et al., 2012). A estrutura química da lignina depende de vários fatores, incluindo a sua origem botânica, as condições ambientais de crescimento e as condições de extração da rede de lignina *in situ* (DONG et al., 2011). A lignina é uma macromolécula polifenólica de estrutura complexa, que é formada por três monômeros principais (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) como pode ser observado na Figura 2, e diferentes grupos funcionais (tais como hidroxilas fenólicas e alifáticas, metoxilas e carboxilas) que interagem com vários polímeros e formam um complexo polimérico estável (AADIL et al., 2014).

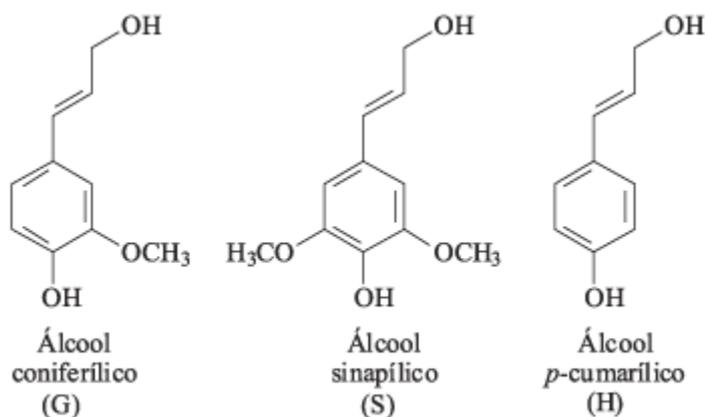


Figura 2 - Álcoois precursores de fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H).

Fonte: COLLINS et al., 2019.

Aproximadamente 20% da casca de arroz, considerada resíduo agroindustrial, é composta de lignina e na maior parte dos casos, o principal destino da casca é a combustão (WANG et al., 2013; ROSA et al., 2017). No entanto, essa prática gera substâncias perigosas para a saúde, causando também sérios problemas ambientais (EL DAMATTY e HUSSAIN, 2009). Desta forma, a extração de lignina e sua utilização no desenvolvimento de novos materiais se tornam uma alternativa para agregar valor à casca de arroz, visto que a lignina exhibe propriedades avançadas, tais como rigidez, alto teor de carbono, estabilidade térmica e proteção contra radiação ultravioleta (UV) (BHAT et al., 2009; KAI et al., 2016). Além disso, as características antioxidantes e estabilizadoras da lignina já foram avaliadas em conjunto com diversos polímeros, como polietileno (PE) (SADEGHIFAR e ARGYROPOULOS, 2015), polipropileno (PP) (PUCCIARIELLO et al., 2004) e PLA (GORDOBIL et al., 2014), mostrando ótimo desempenho.

A união de biopolímeros e compostos bioativos é um horizonte promissor para criar embalagens ativas para alimentos. Além disso, por sua biodegradabilidade é considerada uma solução para as questões ambientais (CERQUEIRA et al., 2016). A quantidade de estudos relatados na literatura tendo o amido como matéria-prima na produção de filmes é significativamente alta. Porém, algumas fontes específicas, como trigo (BONILLA et al., 2013) e feijão (ROY et al., 2020), ainda são pouco exploradas. No Brasil, ambas as culturas possuem grande importância econômica e social. Devido a ampla capacidade de adaptação, o trigo é cultivado tanto em regiões subtropicais como tropicais. Segundo Zhang et al. (2010), nos grãos de trigo, o amido

representa de 64 a 74% do endosperma, sendo o maior constituinte do grão. De acordo com Heinemann et al. (2017), o feijão é cultivado o ano todo e seus grãos ficam armazenados em silos no período entre as safras aguardando a comercialização. Nesta etapa, ficam suscetíveis a alterações nas suas propriedades tecnológicas, envolvendo escurecimento e endurecimento, sendo que essas alterações pós-colheita resultam na depreciação dos grãos e perdas de produção (BENTO et al., 2020). Com o intuito de reaproveitar os grãos depreciados, a extração do amido surge como opção para não os descartar e a partir deles, produzir novos materiais

O amido é o polissacarídeo de reserva dos vegetais e está armazenado sob a forma de grânulos, que apresentam uma organização molecular específica, o que confere aos mesmos um caráter parcialmente cristalino, ou semicristalino, com graus de cristalinidade que variam de 20 a 45%. O amido é formado por dois tipos de polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina, com estruturas e funcionalidade diferentes. Variações nas proporções entre estes componentes podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais diferenciadas, as quais podem afetar suas aplicações industriais (PFISTER e ZEEMAN, 2016). Para a produção de filmes, por exemplo, o uso do amido nativo é bastante frequente na literatura, mas possui desvantagens relacionadas a propriedades mecânicas e de barreira (RIBBA et al., 2017). Os filmes de amido podem ser elaborados por diferentes técnicas como termomoldagem, extrusão, sopro, moldagem por injeção e de *casting* (MERINO et al., 2018), sendo esta última a mais utilizada em escala laboratorial e consiste no espalhamento de uma solução filmogênica (polímero, solvente e plastificante) em um suporte, seguido de evaporação lenta a baixa temperatura (ROSSETO et al., 2019).

Uma das abordagens mais utilizadas para aprimorar estas questões e incorporar compostos funcionais em filmes é o desenvolvimento de sistemas multicamadas (FABRA et al., 2013). Isso pode ser feito através do uso do *electrospinning*, onde as fibras ultrafinas produzidas podem ser aplicadas em uma ou mais camadas, permitindo o aprisionamento de compostos funcionais (TORRES-GINER et al., 2011). Assim, como na literatura não foram constatados estudos específicos acerca da formação de blenda de lignina, óleos essenciais e PLA, optou-se por focar na caracterização destes conjuntos aliando as tecnologias de

electrospinning e *casting*, para desenvolver materiais com funcionalidades bioativas a partir de seus componentes, com desempenho antioxidante e antimicrobiano.

Como hipóteses, temos que a lignina e o OEPR, juntos ou separados, aliados ao PLA, adicionam caráter antimicrobiano e antioxidante às fibras ultrafinas e que a adição das fibras ultrafinas ao filme de amido na forma de bicamadas, configura uma estrutura viável para desenvolver uma embalagem ativa que pode prolongar a vida útil de alimentos, garantindo a segurança e qualidade do produto.

O grupo de pesquisa onde o presente estudo está inserido vem trabalhando há aproximadamente cinco anos com a técnica de *electrospinning* e *electrospraying*, desenvolvendo investigações acerca de encapsulação de compostos bioativos, como os óleos essenciais, para aplicação em embalagens de produtos alimentares, tendo publicado dezenas de artigos nessa área. Nesse contexto, o objetivo geral do trabalho foi desenvolver e caracterizar fibras ultrafinas compostas de diferentes blends de PLA/lignina, PLA/OEPR e PLA/lignina/OEPR pela técnica de *electrospinning* e sua aplicação em filmes de amido produzidos pela técnica de *casting*, formando bicamadas visando a aplicação em embalagens para alimentos. Entre os objetivos específicos, estão a definição dos parâmetros ótimos da técnica de *electrospinning* para a formação de fibras ultrafinas; avaliar diferentes concentrações de PLA, lignina e OEPR na produção de fibras ultrafinas; avaliar a condutividade elétrica e viscosidade das soluções poliméricas; caracterizar as fibras ultrafinas quanto à morfologia, propriedades térmicas e mecânicas, grupos funcionais e molhabilidade; avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante das fibras ultrafinas e aplicá-las em alimentos; definir as melhores condições para a formação dos filmes de amido de feijão e de trigo pela técnica de *casting* e caracterizar os filmes bicamadas quanto à morfologia, propriedades mecânicas, cor e opacidade, umidade e solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA).

CAPÍTULO 1

Estabilidade térmica, hidrofobicidade e potencial antioxidante de fibras ultrafinas de poli(ácido láctico) e lignina de casca de arroz

- Artigo publicado na revista *Brazilian Journal of Chemical Engineering*

1.1 Introdução

O uso de nanomateriais tem despertado interesse na indústria alimentícia, uma vez que estes materiais podem ser usados na área de qualidade e segurança alimentar (PETERS et al., 2016), em aplicações envolvendo a embalagem e armazenamento de alimentos (DUDEFOI et al., 2018). A técnica de *electrospinning* surgiu como uma alternativa para a produção de fibras ultrafinas em escala nanométrica, com vantagens estruturais e funcionais (BHUSHANI e ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Também possui potencial para encapsulação de compostos bioativos com agentes antimicrobianos e propriedades antioxidantes (WEN et al., 2017).

Uma grande variedade de polímeros pode ser usada para a produção de fibras ultrafinas, mais notavelmente o poli (ácido láctico) (PLA), o poli (etileno óxido) (PEO) e o poli (álcool vinílico) (PVA), devido as excelentes propriedades requeridas para o processo de *electrospinning* (MOREIRA et al., 2018; ALHARBI et al., 2018). Por outro lado, alguns polímeros apresentam limitações. Como exemplo temos a quitosana, devido à sua natureza policatiónica em solução (NASERI et al., 2014), celulose por ser solúvel apenas em líquidos iônicos (HÄRDELIN et al., 2013) e lignina por apresentar menor viscosidade em solução (POURSORKHABI et al., 2015). Portanto, uma alternativa para a formação de fibras ultrafinas neste último caso, seria o uso de PLA como polímero auxiliar, sendo combinado com a lignina para aumentar a capacidade de eletrofiação da solução.

A lignina é uma macromolécula amorfa encontrada na parede celular das plantas, geralmente associada à celulose. Ela fornece rigidez, impermeabilidade, resistência microbiológica e a ataques mecânicos em tecidos vegetais (KALAMI et al., 2018). Depois da celulose, a lignina é considerada o segundo polímero aromático natural mais abundante na natureza. Existem vários grupos funcionais em sua estrutura que são suscetíveis a mudanças, como hidroxilas alifáticas e fenólicas e grupos carbonila. Tal composição química se enquadra em várias aplicações para o desenvolvimento de materiais, devido a características como complexação, ligação, dispersão e estabilização de emulsões (LIAO et al., 2020). A lignina representa aproximadamente 20% da casca de arroz, sendo considerada um resíduo agroindustrial ainda pouco explorado (GAO et al., 2019). Entre as propriedades da

lignina, estão a alta estabilidade térmica, potencial antioxidante e atividade antimicrobiana (ZHANG et al., 2015; DONG et al., 2011; AADIL et al., 2018).

Para lignina ser obtida de uma matéria-prima lignocelulósica, necessita passar por processos de extração de diferentes tipos, que tecnicamente podem originar quatro tipos de lignina: lignossulfonada, kraft, soda e organossolve (SHANKAR et al., 2018). A extração por meio do processo organossolve convencional usa solventes orgânicos, catalisadores, pressão e altas temperaturas. No entanto, modificações no método podem ser feitas para gerar um baixo custo, lignina quimicamente homogênea e com melhor aproveitamento de resíduos (RAMAKOTI et al., 2019). O processo organossolve produz lignina de alta pureza (baixo teor de impurezas inorgânicas e livre de enxofre) com baixo peso molecular, oferecendo novas possibilidades para aplicações de alta qualidade (MICHELIN et al., 2018). De acordo com Yang et al. (2016), os principais fatores que contribuem para o potencial antioxidante da lignina são baixo peso molecular e uma grande quantidade de frações fenólicas, além de conter uma série de unidades de fenilpropano com grupos CH_2 posicionados na cadeia lateral. A produção de fibras ultrafinas contendo lignina via *electrospinning* já foi relatada em outros estudos, em associação com outros polímeros. Essas pesquisas investigaram novos materiais que podem aproveitar a abundância de grupos funcionais na lignina (SALAS et al., 2014), como o desenvolvimento de nanofibras de carbono para sistemas de armazenamento de energia (DALTON et al., 2019), aplicações biomédicas (KAI et al., 2015) e a prevenção da contaminação ambiental através de membranas de filtração adsorvente (BECK et al., 2017). Apesar das ótimas propriedades oferecidas pela lignina, as soluções poliméricas de lignina pura não são capazes de formar fibras ultrafinas devido a sua estrutura complexa (AADIL et al., 2018), requerendo a adição de outro polímero.

Como citado anteriormente, nota-se que o PLA é amplamente utilizado em processos de eletrofiação, com o intuito de desenvolver materiais que tenham diferentes funções (OLIVEIRA et al., 2013). Com foco na preservação de alimentos, Altan et al. (2018) desenvolveu fibras de PLA e zeína incorporadas com carvacrol e relataram que a membrana fibrosa aumentou a propriedade de liberação do composto bioativo, com potencial para uso em embalagem antifúngica para preservação de pães. Outro estudo realizado por Radusin et al. (2019) produziram filmes de PLA ativos carregados com extrato de *Allium ursinum* L. Verificou-se que o material apresentava alta atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus*

aureus, sendo capaz de estender efetivamente a vida útil dos alimentos. Dentro desse mesmo contexto, Kim et al. (2019) fabricaram membranas fibrosas baseadas em nanopartículas de PLA e ZnO que podem ser aplicadas em embalagens de alimentos, proporcionando proteção frente à luz ultravioleta.

O uso de dois ou mais polímeros na mistura polimérica é uma alternativa para otimizar o aspecto físico e propriedades químicas do produto final, proporcionando desempenho desejável (NOFAR et al., 2019). De acordo com Collins et al. (2019), a lignina já foi misturada com vários outros polímeros para obter materiais para aplicações com alto valor agregado. No entanto, é difícil encontrar uma mistura eficiente devido à alta complexidade e reatividade de lignina. Para tanto, a união de lignina e PLA parece ser uma alternativa promissora para desenvolver materiais plásticos renováveis, já que segundo Silva et al. (2019), a lignina acelera o processo de degradação do PLA no ambiente, sem afetar suas propriedades térmicas e mecânicas.

Este estudo relata a fabricação de fibras ultrafinas pela técnica de *electrospinning* utilizando PLA e lignina proveniente de casca de arroz extraída pelo processo organossolve. Sobre esta específica forma de produção de fibras ultrafinas, na literatura há apenas o estudo relacionado ao capítulo I desta tese (Fontes et al., 2021), o que explica a relevância da pesquisa. As fibras ultrafinas produzidas foram caracterizadas em termos de morfologia, distribuição de diâmetro, grupos funcionais, estabilidade térmica, hidrofobicidade e capacidade antioxidante.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 Material

O PLA na forma de *pellets* (Ingeo™, CAS 4032D, biopolímero de alto peso molecular) foi adquirido na NatureWorks. A lignina foi fornecida pelo Laboratório de Materiais Lignocelulósicos (LAMALI, FURG) e foi extraída da casca de arroz pelo processo organossolve, seguindo a metodologia descrita por Singh e Dhepe (2016), apresentando as seguintes características: massa molar de 2,06 Da e temperatura de transição vítrea (T_g) em uma faixa de 80–90 ° C (ROSA et al., 2017). Clorofórmio e acetona foram utilizados como solventes das soluções poliméricas. Para a avaliação da atividade antioxidante, os reagentes utilizados foram ABTS (2,2'-azino-bis 3-

etilbenzo-tiazolina-6-ácido-sulfônico) (Sigma-Aldrich, CAS 30931-67-0), e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila, Sigma-Aldrich, CAS 1898-66-4).

1.2.2 Preparo das soluções poliméricas

Experimentos preliminares baseados no estudo de Moreira et al. (2018), indicaram que soluções poliméricas contendo concentrações inferiores a 8% (p/v) de PLA não produziram fibras ultrafinas. Portanto, soluções poliméricas foram preparadas usando 8% PLA [8 g de PLA em 100 mL de mistura de clorofórmio:acetona (3:1)], variando as concentrações de lignina em 0, 0,5% (0,5 g/100 mL de solução), 1,5% (1,5 g/100 mL de solução) e 2,5% (2,5 g/100 mL de solução) em base seca. As soluções foram agitadas por 24 h em agitador magnético (Fisatom, modelo 752/6, Brasil) à temperatura ambiente (23 ± 2 ° C).

1.2.3 Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas

Para a análise da viscosidade aparente das soluções, foi necessário usar uma alíquota de 10,0 mL que foi inserida em um viscosímetro digital Brookfield (Modelo DV-II, EUA), utilizando *spindles* de número 18, com agitação de 100 rpm. A condutividade elétrica das soluções foi avaliada usando um condutivímetro (MSTECNOPON, modelo mCA 150P, Brasil) (SILVA et al., 2018). Ambas as medições foram realizadas em temperatura ambiente (24 ± 2 ° C).

1.2.4 Produção das fibras ultrafinas por *electrospinning*

A produção de fibras ultrafinas foi realizada pela técnica de *electrospinning*, otimizando os parâmetros por meio de testes. As soluções poliméricas foram inseridas em seringa de 3 mL com agulha metálica de 0,7 mm de diâmetro. Os parâmetros usados no processo foram: tensão de 20 kV para o eletrodo positivo e 1 kV para o eletrodo negativo, controlada através de uma fonte de alimentação DC (INSTOR, INSES-HV30, Brasil); taxa de alimentação, 0,5 mL/h, controlada através de uma bomba de infusão (KD Scientific, Model 100, Holliston, Inglaterra) onde a seringa foi colocada; distância horizontal entre a ponta da agulha da seringa e o coletor, 30 cm; temperatura controlada a 23 ± 2 ° C por ar-condicionado; e umidade relativa, ajustada em $45 \pm 2\%$ com desumidificador.

1.2.5 Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas

A morfologia das fibras ultrafinas de PLA/lignina foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol, JSM-6610LV, EUA) com voltagem de aceleração de 15 kV (EL HALAL et al., 2017). Para a avaliação, uma pequena porção das fibras ultrafinas foi inserida na superfície de um *stub* e revestida com ouro. O diâmetro médio e a distribuição do diâmetro das fibras ultrafinas foram avaliados a partir das imagens das micrografias, sendo medidas aproximadamente 60 fibras selecionadas aleatoriamente, usando o *software* ImageJ (versão 2015).

1.2.6 Estabilidade térmica das fibras ultrafinas

A estabilidade térmica das fibras ultrafinas e dos compostos puros (PLA e lignina) foi avaliada utilizando um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras (aproximadamente 5 mg) foram aquecidas em cápsulas de platina na faixa de 30-600 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min (BRUNI et al., 2020). Uma cápsula de platina vazia foi usada como referência.

1.2.7 Grupos funcionais das fibras ultrafinas

Os espectros FTIR-ATR das fibras ultrafinas e dos polímeros puros (PLA e lignina) foram investigados usando um espectrômetro infravermelho (IRPrestige21, Shimadzu, Japão). A análise espectral foi realizada na região do infravermelho médio com a faixa de comprimento de onda de 4000–500 cm^{-1} e resolução espectral de 4 cm^{-1} (FONSECA et al., 2020). Os sinais foram processados usando o *software* GRAMS (Galactic Industries Corp., Salem, NH, EUA).

1.2.8 Molhabilidade das fibras ultrafinas

A medição da molhabilidade foi realizada conforme descrito por Fombuena et al. (2013), aplicando uma gota de água na superfície da membrana formada pelas fibras ultrafinas de PLA/lignina. A imagem foi obtida via microscópio (Digital Blue, QX5, EUA) e a quantificação foi feita por meio de cinco medições de cada imagem, utilizando cinco pontos diferentes dispostos ao redor da gota, com posterior avaliação pelo *software* SurfTens 3.0.

1.2.9 Atividade antioxidante *in vitro* das fibras ultrafinas

1.2.9.1 DPPH

A atividade antioxidante das fibras ultrafinas de PLA/lignina foi medida usando o ensaio de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), conforme descrito por Brand- Willians et al. (1995), com algumas modificações. Uma amostra de 1 mg de fibras ultrafinas foi misturada com 3,9 mL de solução DPPH (preparada a partir de uma solução estoque de 0,24 mg/mL de DPPH) e em seguida foi agitada por 30 s, permanecendo no escuro por 30 min a temperatura ambiente. A absorbância foi medida com espectrômetro UV-Vis (UV Mini 1240, Japão) em 515 nm. A atividade de eliminação radical foi expressa como porcentagem de inibição e foi calculada usando a Equação 1.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) * 100}{\text{Abs controle}} \quad (1)$$

1.2.9.2 ABTS

Para o método de descoloração com ABTS, a atividade antioxidante das fibras ultrafinas foi medida seguindo metodologia de Re et al. (1999). O ABTS foi dissolvido a uma concentração de 7 µM e logo misturado a uma solução de persulfato de potássio na concentração de 2,45 µM, à temperatura ambiente, sendo deixado em repouso no escuro por 16 h. Para o ensaio, essa última solução foi diluída até atingir um valor de absorbância de $0,70 \pm 0,02$, em 734 nm, para em seguida ser retirada uma alíquota de 3,0 mL sendo misturada à 1 mg de fibras. Logo, foram submetidas a repouso no escuro durante 6 min. Ao fim da reação, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Japão) a 734 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição, de acordo com a Equação 1.

1.2.10 Análise estatística

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata, exceto para a análise TGA e FTIR. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

1.3 Resultados e Discussão

1.3.1 Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas

A viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas com diferentes concentrações de lignina são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Viscosidade aparente e condutividade elétrica de soluções poliméricas com diferentes concentrações de lignina.

Lignina (p/v; %)	Viscosidade aparente (mPa/s)	Condutividade elétrica (μ S/cm)
0	92,1 \pm 1,6 ^d	0,62 \pm 0,01 ^d
0,5	100,1 \pm 0,7 ^c	0,76 \pm 0,01 ^c
1,5	120,3 \pm 0,5 ^b	0,83 \pm 0,01 ^b
2,5	130,6 \pm 0,6 ^a	0,87 \pm 0,01 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O aumento da concentração de lignina na solução polimérica aumentou a viscosidade e também proporcionou um aumento na condutividade elétrica, mostrando diferença estatisticamente significativa entre tratamentos ($p < 0,05$). Este comportamento contribui para a produção de fibras ultrafinas sem *beads*, e altas condutividades elétricas requerem forças de campo elétrico menores para esticar a solução polimérica (YANG et al., 2008). Isto pode ser explicado pela estrutura molecular da lignina, que pode liberar íons que interagem com o solvente (clorofórmio e acetona), favorecendo a condutividade elétrica da solução. Dalton et al. (2019) avaliou nanofibras de poliacrilonitrila e lignina, verificando uma clara tendência de aumento de condutividade com o aumento do teor de lignina.

De acordo com Deitzel et al. (2001), a viscosidade tem uma grande influência no processo de *electrospinning*, afetando a morfologia das fibras eletrofiadas. Pelissari et al. (2012) relataram que a viscosidade de uma solução está associada com interações entre as moléculas dos componentes e depende das concentrações e natureza dos solutos e reagentes envolvidos. No presente estudo, observou-se que o maior valor de viscosidade foi de 0,87 μ S/cm para o tratamento com 2,5% de lignina, o que pode estar atribuído à maior quantidade de lignina em massa de solução, comparado com as outras soluções.

1.3.2 Morfologia das fibras ultrafinas

As características morfológicas e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas são mostradas na Figura 3, indicando comportamento de distribuição homogêneo e orientadas aleatoriamente. Apenas o tratamento com 0,5% de lignina apresentou *beads* (Figura 3c) e tal fato pode estar relacionado à instabilidade do jato da solução polimérica (OLIVEIRA et al., 2013). De acordo com Xue et al. (2019), para evitar a formação de *beads*, a viscoelasticidade de uma solução polimérica deve aumentar com o aumento da concentração de polímero. Contudo, isso também favorece o aumento do diâmetro das fibras, fato que pode ser observado em nosso estudo: as fibras ultrafinas contendo 0,5, 1,5 e 2,5% de lignina apresentaram diâmetros médios de 345, 387 e 587 nm, respectivamente (Figura 3d, 3f e 3h). Esse comportamento está de acordo com o estudo de Haider et al. (2013), que descobriram que concentrações mais altas de polímero são menos propensas a formar *beads*, resultando em fibras uniformes.

Assim, a morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas foram afetadas pela viscosidade e condutividade elétrica da solução polimérica, onde os maiores diâmetros médios foram obtidos com a incorporação das maiores concentrações de lignina. Resultados semelhantes foram encontrados por Ago et al. (2012), que relataram que o aumento em lignina em soluções contendo álcool polivinílico (PVA) produziu uma quantidade maior de nanofibras uniformes. Salas et al. (2014) também observaram um aumento no diâmetro das nanofibras após a adição de lignina em uma mistura contendo proteína de soja e poli (etileno) óxido (PEO). Dallmeyer et al. (2010) avaliaram a formação de nanofibras com PEO e diferentes tipos de lignina, relatando um aumento linear em seus diâmetros com o aumento da concentração de lignina.

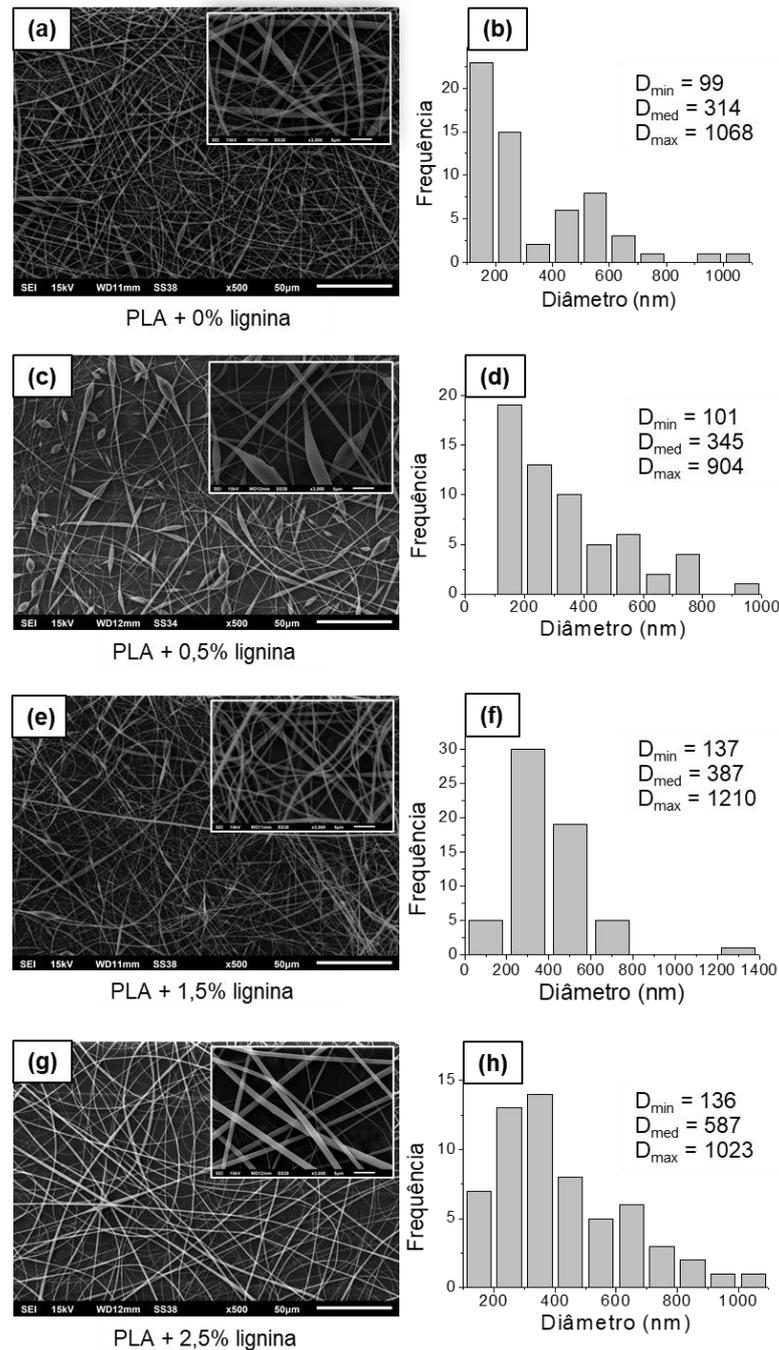


Figura 3 - Morfologia, frequência e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas de PLA com: (a, b) 0% de lignina, (c, d) 0,5% de lignina, (e, f) 1,5% de lignina e (g, h) 2,5% de lignina.

1.3.3 Propriedades térmicas das fibras ultrafinas

A análise termogravimétrica (TGA) e sua primeira derivada (DTG) foram realizadas para investigar a degradação térmica das fibras ultrafinas e seus constituintes e as curvas estão apresentadas na Figura 4.

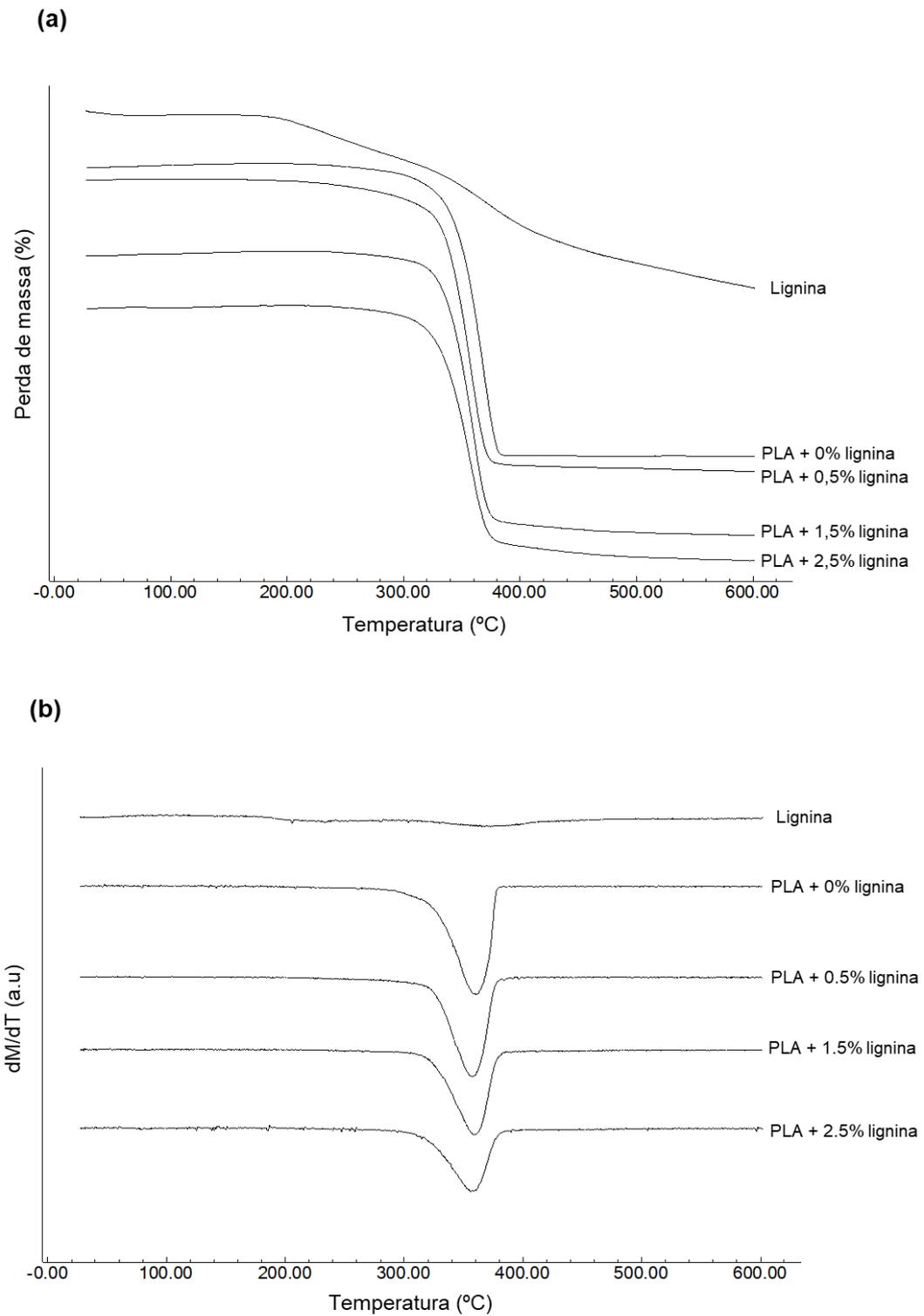


Figura 4 - Curvas da análise termogravimétrica (TGA) (a) e da primeira derivada (b) dos constituintes isolados e das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de lignina.

A lignina pura mostrou dois picos sutis de degradação, o primeiro estando em torno de 200 °C, atribuído à fragmentação de ligações entre unidades, liberando fenóis monoméricos na fase vapor (TEJADO et al., 2007), com 13,1% de perda de massa. O segundo pico ocorreu em torno de 350 °C, provavelmente envolvendo a formação de novas ligações como consequência de reações de reticulação (KLAPISZEWSKI et al., 2016), com perda de massa de 23,8%. De 400 a 600 °C, a lignina permaneceu não volatilizada, fato atribuído à formação de estruturas aromáticas condensadas (TEJADO et al., 2007). De acordo com Sen et al. (2015), a lignina é moderadamente estável em altas temperaturas devido à sua estrutura aromática, o que foi comprovado no presente estudo pela alta estabilidade térmica encontrada.

O PLA puro mostrou apenas um pico de degradação em torno de 360 °C, com perda de massa de 90%. Thangaraju et al. (2012) relataram que a temperatura de decomposição de PLA fica em torno de 300 °C, e essa degradação térmica ocorre principalmente pela quebra aleatória na cadeia principal, envolvendo reações como hidrólise, despolimerização e oxidação. Todas as curvas termogravimétricas das fibras ultrafinas de PLA/lignina mostraram comportamento semelhante à curva produzida com fibras de PLA puro. No entanto, a adição de lignina, independentemente da concentração, fez com que a temperatura de degradação térmica inicial fosse discretamente diminuída.

Além disso, as fibras ultrafinas não apresentaram vestígios de solvente utilizado na solução polimérica, pois o clorofórmio e a acetona têm um ponto de evaporação a temperaturas de 61,2 °C e 56 °C, respectivamente, onde não se observam picos. Este dado pode provar que durante o processo de *electrospinning* ocorreu total evaporação dos solventes das soluções poliméricas, como afirmado anteriormente por Bhushani e Anandharamakrishnan (2014). Ainda, as fibras ultrafinas apresentaram comportamento termicamente estável até aproximadamente 360 °C. De acordo com Arrieta et al. (2014), esta estabilidade térmica é favorável para uma aplicação em embalagens de produtos alimentícios que são conservados usando processos de alta temperatura, como pasteurização e esterilização. Esses autores também relataram que as fibras poderiam ser usadas como componentes de embalagens termoformadas, na qual o material é aquecido sob certas condições de tempo e temperatura (BOURGIN et al., 1995).

1.3.4 FTIR das fibras ultrafinas

As interações químicas entre PLA e lignina foram investigadas usando FTIR, e os espectros são mostrados na Figura 5.

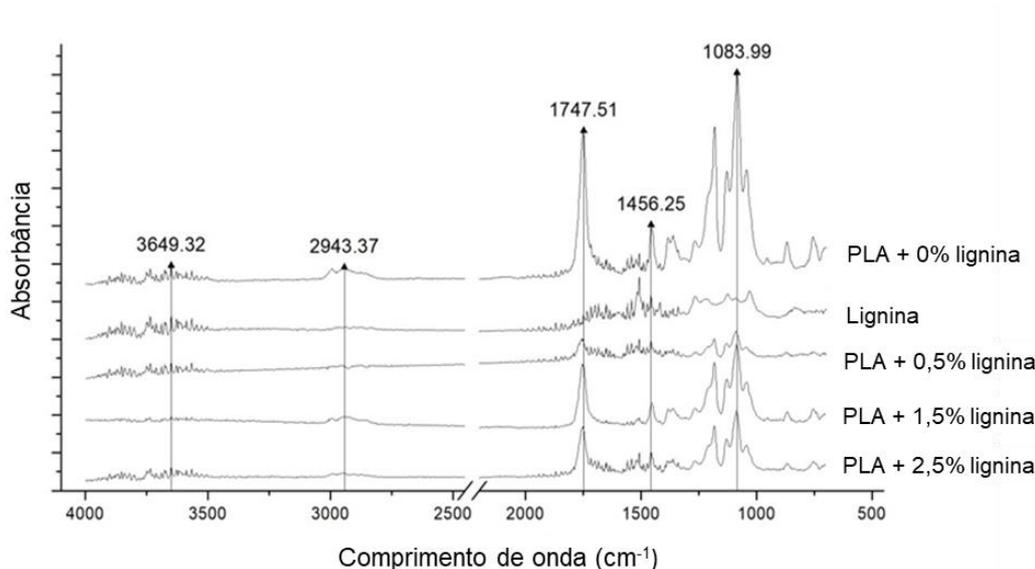


Figura 5 - Espectro FTIR-ATR das fibras ultrafinas de PLA com 0, 0,5, 1,5 e 2,5% de lignina.

O espectro do PLA foi caracterizado pelas seguintes bandas de absorção: $1083,9\text{ cm}^{-1}$, relacionada ao estiramento de -C-O ; $1747,5\text{ cm}^{-1}$, atrelada ao alongamento de -C=O (SCAFFARO et al., 2018); 755 e 869 cm^{-1} , devido a trechos de ligação C-H ; 1182 cm^{-1} , relacionado ao alongamento de C-O-C ; 1213 cm^{-1} , relacionado a estiramentos C-C ; e 1360 e 1452 cm^{-1} , associado à flexão e vibração de ligações -CH_3 , respectivamente (MÜLLER et al., 2017).

A lignina organossolve possui bandas características em $1456,26\text{ cm}^{-1}$, sendo relacionada à deformação de C-H em -CH_3 e -CH_2 e também em 2943 cm^{-1} , sendo associado ao estiramento de C-H em -CH_3 e -CH_2 (GORDOBIL et al., 2014). Segundo Oroumei et al. (2015), a banda de 850 cm^{-1} é originada de deformações C-H . Além disso, ligações de alongamento C-O podem ser atribuídas ao pico em torno de 1211 cm^{-1} . As duas bandas em torno de 1515 e 1600 cm^{-1} correspondem a vibrações de anéis aromáticos em unidades de fenilpropano, isto é, deformações do anel aromático e alongamento das bandas, respectivamente. De acordo com Lisperguer et al. (2009), as bandas observadas por volta de 1712 e 1365 cm^{-1} estão associadas a grupos carbonila não conjugados e grupos hidroxila fenólicos, respectivamente, que segundo

Tejado et al. (2007) são originalmente formados durante o processo de isolamento da lignina organossolve de madeira.

Em fibras ultrafinas de PLA/lignina, a presença de mais bandas pronunciadas observadas em 1747 e 1084 cm^{-1} estão relacionadas ao PLA. Por outro lado, a banda em 1510 cm^{-1} refere-se aos grupos C=C dos anéis aromáticos da lignina, indicando interações dos biopolímeros e seu sinergismo, formando as fibras ultrafinas. A ligação de grupos alcoólicos primários e secundários relacionados a banda de 1090 cm^{-1} na lignina pura (GUO et al., 2020) foi deslocada para 1100 cm^{-1} , indicando ligações de hidrogênio entre a lignina e as moléculas de PLA. Portanto, os resultados indicam a compatibilidade entre PLA e lignina: estes dois biopolímeros, originados de diferentes processos, são adequados para a produção de fibras ultrafinas utilizadas como matéria-prima para embalagens alimentares.

1.3.5 Ângulo de contato das fibras ultrafinas

A molhabilidade das membranas formadas por fibras ultrafinas de PLA/lignina foi determinada pelas medições de ângulos de contato com a água, conforme Figura 6.

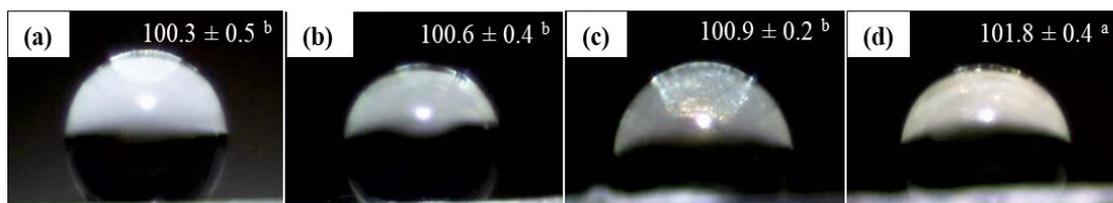


Figura 6 - Ângulos de contato das fibras ultrafinas de PLA com diferentes concentrações de lignina: (a) 0%, (b) 0,5%, (c) 1,5% e (d) 2,5%.

As fibras ultrafinas apresentaram ângulos de contato maiores que 90° para todos os tratamentos, indicando superfícies hidrofóbicas de acordo com a classificação relatada por Ahmad et al. (2015). As fibras ultrafinas de PLA puro apresentaram valor de $100,3^\circ$ (Figura 6a), semelhante ao valor encontrado por Liu et al. (2018), de $114,5^\circ$, em estudo similar. O maior ângulo de contato ($101,8^\circ$) foi encontrado para fibras ultrafinas produzidas com 2,5% lignina (Figura 6d). Portanto, a incorporação da maior quantidade de lignina (2,5% lignina) promoveu maior comportamento hidrofóbico.

A lignina contém grupos hidrofílicos e hidrofóbicos em sua estrutura. O caráter vai depender da origem e tipo de extração (GORDOBIL et al., 2014). De acordo com Espinoza-Acosta et al. (2015), o processo organossolve produz lignina de maior pureza, menor massa molar e maior hidrofobicidade quando comparada à lignina obtida pelo processo *kraft*. Gao et al. (2019) descobriu que a adição de lignina extraída pelo processo organossolve proporcionou maior hidrofobicidade aos compósitos de PLA. Isto é justificado pela possível redução dos grupos OH hidrofílicos no PLA, pois esses grupos presentes no final da cadeia podem reagir com grupos OH presentes na lignina para formar C–O aromático.

No entanto, a adição de lignina em nosso estudo forneceu apenas um aumento ligeiramente significativo nos valores do ângulo de contato, provavelmente devido à baixa concentração de lignina presente na superfície da membrana (PARIT et al., 2018). Fibras ultrafinas com características hidrofóbicas têm aplicação potencial às embalagens de alimentos devido à capacidade de gerenciar a transferência de vapor de água, oxigênio e dióxido de carbono, desacelerando para baixo a difusão de água na embalagem (ZHAO et al., 2020).

1.3.6 Atividade antioxidante das fibras ultrafinas

A atividade antioxidante das fibras ultrafinas é mostrada nas Figuras 7a e 7b, onde verificou-se que as fibras de PLA puro não apresentaram potencial antioxidante. A lignina pura apresentou a maior atividade antioxidante, com 82,2% e 83,6% de inibição para DPPH (Figura 7a) e ABTS (Figura 7b), respectivamente. Ocorreu uma tendência de acréscimo ($p < 0,05$) na atividade antioxidante das fibras ultrafinas à medida que o conteúdo de lignina aumentou (0,5, 1,5 e 2,5%). No tratamento contendo PLA e 2,5% de lignina, ocorreu aumento de aproximadamente 70% na inibição para ambos radicais avaliados. Assim, observou-se que a lignina foi a principal responsável pelo efeito antioxidante, provavelmente devido aos seus compostos fenólicos. De acordo com Ramezani e Sain (2018) a lignina extraída pelo processo organossolve exibe atividade antioxidante intensificada, pois este processo de extração fornece maior conteúdo fenólico em comparação com outros métodos de extração. Durante o processo organossolve, as ligações β -O-4 são clivadas, gerando grupos fenólicos hidroxila (1365 cm^{-1}) e carbonila (1700 cm^{-1}) (MICHELIN et al. 2018).

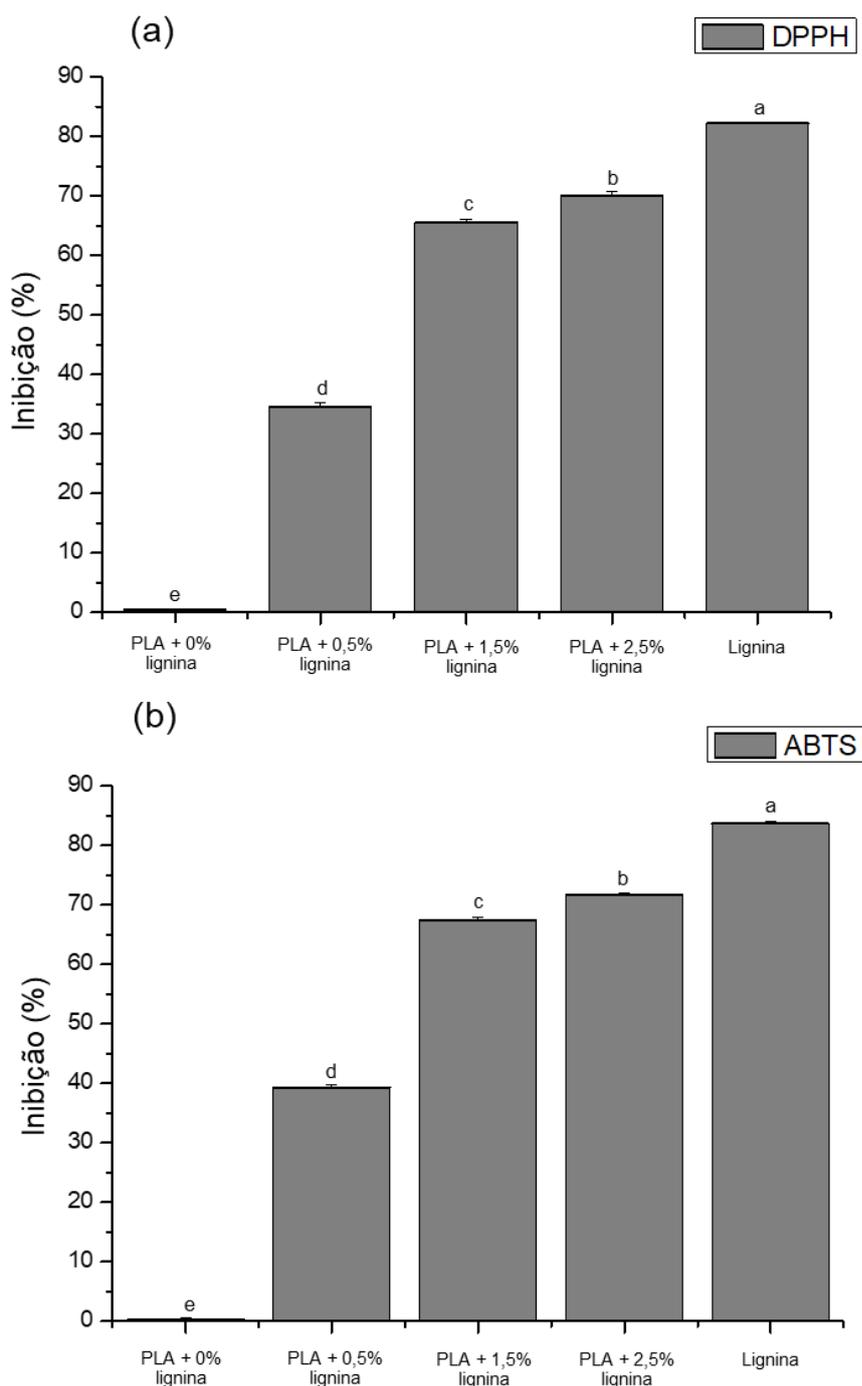


Figura 7 - Atividade antioxidante das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de lignina.

A estrutura química das ligninas é caracterizada por uma rede amorfa, sendo resultado da polimerização de monolignóis (p-cumaril, coniferil e álcoois sinapílicos), contendo vários grupos funcionais e sítios reativos, por exemplo, grupos fenólicos, alifáticos ou carboxílicos, bem como sítios aromáticos substituídos ou ligações C=C

(LAUBERTE et al., 2019). Estes grupos químicos foram encontrados no presente estudo pela análise FTIR (Figura 5) e são responsáveis pelo potencial antioxidante, principalmente no final da reação de propagação de oxidação através da doação de hidrogênio e reações de transferência de elétrons para os radicais DPPH e ABTS.

Resultados semelhantes foram encontrados por Kai et al. (2015), em um estudo com nanofibras de PLA e lignina alcalina gerada por eletrofiação. Estes autores observaram os maiores valores de inibição do radical DPPH, com o aumento da concentração de lignina. Wang et al. (2018) também mostrou que a adição de lignina à policaprolactona (PCL) para a formação de nanofibras pela técnica de *electrospinning* melhorou as propriedades mecânicas e antioxidantes, atingindo capacidade de inibição do radical DPPH até 98%. Kai et al. (2016) relataram que a lignina é considerada um antioxidante ideal para compor materiais de embalagem de alimentos e materiais biomédicos devido a sua baixa toxicidade, sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. A adição de lignina pode reduzir não apenas a taxa de degradação do material, mas também é capaz de atrasar a oxidação de produtos sensíveis ao oxigênio, em aplicações de embalagem.

1.4 Conclusões

Fibras ultrafinas de PLA/lignina foram produzidas com sucesso por meio da técnica de *electrospinning* e apresentaram diâmetros médios menores que 600 nm. A membrana de fibras ultrafinas indicou estabilidade térmica, superfície hidrofóbica e alta atividade antioxidante. A presença de 2,5% de lignina provou ser o resultado mais promissor, produzindo visualmente fibras mais homogêneas e também apresentando maior condutividade elétrica com 0,87 $\mu\text{S}/\text{cm}$, facilitando o processo de eletrofiação. Além disso, influenciou ligeiramente no aumento na hidrofobicidade da membrana, com um ângulo de contato de $101,8 \pm 0,4^\circ$, e mostrou alta atividade antioxidante, indicando inibição acima de 70% para ambos os radicais avaliados (DPPH e ABTS).

Embalagens contendo antioxidantes, como lignina, podem ser uma alternativa para minimizar a oxidação lipídica dos alimentos, inibindo os radicais livres e danos oxidativos. A lignina desempenha um papel importante na indústria de alimentos, principalmente quando aplicado à formação de embalagens bioativas. Assim, as fibras ultrafinas desenvolvidas neste estudo foram consideradas promissoras para aplicação em embalagens de alimentos.

CAPÍTULO 2

Fibras ultrafinas de poli (ácido láctico) com óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua aplicação em *cream cheese*

- Artigo a ser submetido na revista *International Journal of Biological Macromolecules*

2.1 Introdução

A embalagem de alimentos desempenha seu papel principal na proteção do produto alimentar da influência do ambiente externo, atendendo às necessidades industriais e do consumidor, garantindo a segurança dos alimentos e minimizando os efeitos ambientais (SHARMA et al., 2021). A embalagem ativa é um novo método utilizado para prolongar a vida útil de alimentos perecíveis, manter ou melhorar a qualidade e segurança de alimentos preparados, por apresentar interação com o produto. Além disso, a embalagem ativa tem potencial para substituir a adição de compostos ativos aos alimentos, e reduzir a migração de partículas dos materiais da embalagem para os produtos (SCHAEFER e CHEUNG, 2018).

Sistemas de embalagens antimicrobianas estão sendo usados para reduzir o desperdício de alimentos. A contaminação alimentar durante o armazenamento e transporte ocorre principalmente devido à ação de micro-organismos deteriorantes como bactérias e fungos que afetam vários aspectos dos alimentos, como aparência visual, sabor e odor, e podem causar doenças transmitidas por alimentos (THAKALI e MACRAE, 2021). A presença e o desenvolvimento destes micro-organismos nos alimentos, como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, entre outros, depende de vários fatores como pH, presença de oxigênio, temperatura, tempo e umidade relativa de armazenamento (LÓPEZ-PEDEMONTE et al., 2007).

Dos muitos agentes antimicrobianos sintéticos e naturais que podem ser usados, os óleos essenciais estão ganhando cada vez mais importância principalmente por conter propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Os óleos essenciais são líquidos voláteis extraídos de várias partes de plantas aromáticas como cascas, sementes, flores, frutos, raízes e folhas (PANDEY et al., 2017). A composição é diversa e consiste principalmente de terpenos (principalmente monoterpenos e sesquiterpenos), terpenóides (compostos oxigenados como fenóis, álcoois, aldeídos, cetonas ou éteres) e compostos aromáticos. Os óleos essenciais podem ser extraídos por diferentes métodos, como hidrodestilação, destilação a vapor, hidrodifusão e extração por solvente (AZIZ et al., 2018). A hidrodestilação é o processo mais simples, no qual os materiais são imersos em água em um recipiente onde a mistura é fervida, sendo que a principal vantagem deste método é extrair o material vegetal abaixo de 100 °C (EL ASBAHANI et al., 2015). Ademais, deve-se levar em consideração alguns

pré-requisitos para aplicação dos óleos essenciais em embalagens, bem como conhecer as propriedades desses óleos essenciais, as concentrações inibitórias mínimas (CIM), os micro-organismos alvo, o modo de ação e as prováveis interações com a matriz alimentar, bem como a influência na qualidade sensorial do alimento (HYLDGAARD et al., 2012).

Dentre as diferentes plantas existentes, *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) é uma espécie nativa do Brasil, conhecida como aroeira-vermelha (SOUZA et al., 2012). Estudos relatados na literatura comprovaram a ação antimicrobiana (GOMES et al., 2013; ULIANA et al., 2016; DANNENBERG et al., 2016; DANNENBERG et al., 2017; ROMANI et al., 2018), anti-inflamatória (MEDEIROS et al., 2007), antifúngica (KHAN et al., 2013), antitumoral (QUEIRES et al., 2013) e inseticida (SANTOS et al., 2010) do óleo essencial extraído do seu fruto, denominado pimenta rosa. Desta forma, vislumbrou-se um potencial no uso do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR), pois é proveniente de um fruto disponível em grande quantidade na região onde este estudo foi desenvolvido. Entretanto, ainda não existem pesquisas acerca da utilização do OEPR no desenvolvimento de fibras ultrafinas via *electrospinning* para posterior aplicação em embalagens alimentares.

A aplicação de óleos essenciais em embalagens ativas pode ser utilizada na forma de filmes e revestimentos. No entanto, Carpena et al. (2021) citam que também deve ser considerado que os óleos essenciais são quimicamente instáveis e facilmente oxidados, sendo sensíveis à luz, oxigênio e alterações de temperatura. Nesse sentido, as técnicas de encapsulação podem ser usadas para melhorar a estabilidade dos óleos essenciais e aumentar suas propriedades físico-químicas, permitindo assim sua utilização nas embalagens alimentares (REHMAN et al., 2020). Dentro dessas técnicas, encontra-se o *electrospinning*, que tem como vantagem não utilizar condições drásticas de temperatura durante seu processamento (BHUSHANI e ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Aliado a isso, a preocupação com o meio ambiente e a escassez do petróleo estão impulsionando as pesquisas sobre o desenvolvimento de membranas a partir de polímeros biodegradáveis, renováveis e compatíveis com outros polímeros sintéticos, como o poli (ácido láctico) (PLA) (MOREIRA et al., 2018). O PLA é amplamente utilizado em embalagens e também já foi citado como matéria-prima na produção de membranas de nanofibras com potencial biomédico (VALENTE et al., 2016), engenharia de tecidos (XU et al., 2017) e liberação de medicamentos controlados (PREIS et al., 2020).

Logo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver fibras ultrafinas de PLA contendo diferentes concentrações de OEPR pela técnica de *electrospinning*, e avaliar suas características morfológicas, térmicas, químicas, de molhabilidade e antimicrobianas. Para verificar a ação das fibras ultrafinas produzidas com OEPR como conservante em alimentos, optou-se por aplicá-las em *cream cheese*, substituindo o selo de alumínio presente na embalagem original por um selo de alumínio contendo as fibras ultrafinas. A escolha por esse alimento se justifica pelo maior risco de contaminação microbiana devido ao elevado teor de umidade e atividade de água, com a possível incidência de bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*. Como ainda não existem trabalhos e pesquisas relatando uma avaliação experimental como esta, ressalta-se a importância de investigar novas possibilidades de preservação de alimentos na indústria.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material

O PLA (Ingeo 4032D) *pellets* foi adquirido da NatureWorks. A matéria-prima utilizada para a extração do OEPR foram os frutos maduros (coloração vermelha) coletados em maio de 2018 de árvores adultas situadas no Campus da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) no município de Capão do Leão/RS, latitude 31°48'0459" e longitude 52°24'5532", botanicamente identificadas como *Schinus terebinthifolius* Raddi por similaridade com o exemplar registrado sob número 25.131 no herbário do Departamento de Botânica/UFPel, RS, Brasil.

2.2.2 Grau de maturação dos frutos de pimenta rosa

A maturação dos frutos da pimenta rosa foi avaliada através de colorímetro (MINOLTA® CR 100), verificando os parâmetros colorimétricos "L" que se refere à luminosidade variando do branco ao preto, "a" sendo a coloração na região do vermelho ao verde e "b" a coloração no intervalo do amarelo ao azul.

2.2.3 Extração do óleo essencial de frutos de pimenta rosa (OEPR)

Para o processo de extração do OEPR, os frutos foram colhidos manualmente, separados dos galhos, selecionados e submetidos a uma lavagem prévia para a retirada de impurezas. Em seguida, os mesmos foram acondicionados em sacos de

polietileno e armazenados em freezer vertical com circulação de ar (Consul CVU30, Brasil) sob temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

O OEPR foi extraído pelo processo de hidrodestilação através do equipamento *Clevenger* seguindo especificações definidas por Dannenberg et al. (2016). Aproximadamente 200 g dos frutos de pimenta rosa foram triturados em liquidificador (Oster Classic 4126, Brasil) juntamente a 1 L de água destilada. Essa mistura foi adicionada em um balão com capacidade para 2 L, que foi então conectado ao equipamento *Clevenger* e aquecido até temperatura de ebulição por 2 h, utilizando uma manta de aquecimento. Após a obtenção do OEPR, este foi desidratado por filtração em funil com sulfato de sódio (Na_2SO_4) e armazenado em ultrafreezer (CL200-86V, Brasil) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) em frasco de vidro âmbar devidamente vedado com parafilme até o momento das análises. Foram mensurados o rendimento e a densidade do OEPR.

2.2.4 Composição química do OEPR

A determinação da composição química do OEPR foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado ao detector de massas (GC/MS - QP 2010SE - Shimadzu®), seguindo método descrito por Victoria et al. (2012), com adaptações. O equipamento foi preparado com uma coluna capilar RTX-5MS (Restek®) (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). O detector seletivo de massas operou no modo de ionização por impacto de elétrons (IE) com um intervalo de varredura de massa de 40 a 700 m/z a 70 eV. Foi utilizado hélio como gás de arraste a um fluxo de 0,98 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 e 280 $^{\circ}\text{C}$; respectivamente. A temperatura do forno foi programada partindo de 60 $^{\circ}\text{C}$ por 3 min, seguido de um aumento de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$, na qual permaneceu por 10 min. A identificação dos compostos foi baseada no espectro de massas (em comparação com a biblioteca espectral Wiley 275, 6ª edição), e as concentrações apresentadas como porcentagens relativas da área de cada pico sobre a área total.

2.2.5 Preparo das soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram preparadas utilizando PLA 8%, [8 g PLA dissolvido em 100 mL da mistura clorofórmio:acetona (3:1)] e submetidas a agitação (Fisatom, modelo 752/6, Brasil) por 3 h, até a total dissolução dos *pellets* de PLA, definida por meio de testes preliminares. Em seguida, foram adicionadas

concentrações de 10, 20 ou 30% (v/v, em base seca) de OEPR e uma nova agitação foi realizada por mais 3 h. A concentrações de óleo foram definidas baseando-se em testes preliminares. A solução contendo somente PLA foi usada como controle.

2.2.6 Viscosidade aparente e condutividade das soluções poliméricas

Conforme capítulo 1, item 1.2.3.

2.2.7 Produção das fibras ultrafinas por *electrospinning*

Conforme capítulo 1, item 1.2.4.

2.2.8 Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas

Conforme capítulo 1, item 1.2.5.

2.2.9 Estabilidade térmicas das fibras ultrafinas por TGA

Conforme capítulo 1, item 1.2.6.

2.2.10 Caracterização estrutural das fibras ultrafinas por FTIR-ATR

Conforme capítulo 1, item 1.2.7.

2.2.11 Ângulo de contato (molhabilidade)

Conforme capítulo 1, item 1.2.8.

2.2.12 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do OEPR e das fibras ultrafinas contendo OEPR foi avaliada frente a quatro bactérias patogênicas relevantes para alimentos. As bactérias Gram-positivas testadas foram *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12598. As bactérias Gram-negativas foram *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Escherichia coli* ATCC 11230.

2.2.12.1 Teste de disco-difusão do OEPR e das fibras ultrafinas

A eficácia do OEPR contra os micro-organismos foi avaliada pela técnica de disco-difusão (CLSI, 2015a). As culturas bacterianas foram diluídas em água peptonada (0,1%) a partir de 10^8 UFC/mL (0,5 McFarland) obtendo-se a concentração

de 10 UFC/mL.. Este inóculo foi espalhado com *swabs* estéreis na superfície de Agar Mueller-Hinton (Kasvi®), em placas de Petri. Discos de papel esterilizados foram dispostos sobre o ágar e adicionou-se 10 µL de OEPR em cada um, para cada bactéria testada. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas a 37 °C. Após 24 h, foi verificada a existência ou ausência de halos de inibição e medidos com paquímetro digital, expressos em mm.

A eficácia das fibras ultrafinas de PLA/OEPR também foi avaliada pelo mesmo procedimento, apenas substituindo os discos de papel filtro por amostras circulares de membranas de fibras (2,4 ± 0,1 cm de diâmetro, ≈3 mg), que foram expostas sob luz ultravioleta por 15 min de cada lado.

2.2.12.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do OEPR

A concentração inibitória mínima (CIM) de OEPR foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2015b). O OEPR foi diluído em caldo *Brain Heart Infusion* suplementado com tween 80 a 3%. As bactérias foram inoculadas para atingir concentrações iniciais de 10⁴ UFC/mL em cada poço. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e as leituras foram realizadas com leitor de placas (placa Robonik® Readwel) no comprimento de onda de 625 nm, considerando o CIM como a maior diluição onde não houve crescimento celular visível.

Para detectar a concentração bactericida mínima (CBM), alíquotas de 10 µL de cada poço onde não ocorreu crescimento visível a olho nu no teste de CIM foram inoculadas em placas contendo meio BHI. A concentração onde não houve crescimento neste novo meio foi considerada a CBM.

2.2.12.3 Atividade antimicrobiana do OEPR em micro-atmosfera

A avaliação antimicrobiana dos compostos voláteis presentes no OEPR foi avaliada seguindo a metodologia de Ghabraie et al. (2016), para cada bactéria separadamente. Alíquotas de 0,1 mL de células bacterianas (1x10⁴ UFC/mL) foram inoculadas em ágar BHI (Merck®). Na tampa de cada placa foram dispostos três discos de papel filtro estéreis aos quais adicionou-se 15 µL de OEPR puro ou 15 µL de óleo a uma concentração de 30%, mesma concentração contida nas fibras. O controle negativo continha discos de papel de filtro estéreis impregnados com água destilada estéril. As placas foram lacradas com parafilme, invertidas e incubadas a 37

°C por 24 h. A ação antimicrobiana foi expressa como um percentual de redução de UFC após o tratamento com OEPR, em relação ao controle.

2.2.12.4 Aplicação das fibras ultrafinas em *cream cheese*

Com base nos resultados encontrados na análise antimicrobiana por micro-atmosfera, realizaram-se ensaios para a avaliação microbiológica do efeito da volatilização do OEPR sobre *cream cheese* contaminado experimentalmente com *L. monocytogenes* ou *S. aureus* (APHA, 2001). A concentração dos componentes das fibras ultrafinas foram 8% de PLA e 30% de OEPR devido à melhor atividade antimicrobiana encontrada, com relação as concentrações de 10 e 20% de OEPR. A partir do *cream cheese* adquirido do mercado local, foram retiradas 30 g de amostra de cada pote, sendo transferidas para tubos de ensaio com rosca, previamente esterilizados. Após, inoculou-se 10^2 UFC/g das bactérias, separadamente, na superfície do ágar. A disposição das amostras encontra-se na Figura 8.



Figura 8 - Simulação das embalagens de *cream cheese* no ensaio de avaliação antimicrobiana.

No controle, não ocorreu inoculação e o selo de vedação usado foi apenas papel alumínio, com posterior fechamento da tampa. No controle positivo, ocorreu inoculação e o selo de vedação também foi apenas papel alumínio. Já nos experimentos, ocorreu inoculação e o selo de vedação usado foi papel alumínio contendo as fibras ultrafinas do tratamento PLA/OEPR 30%. Todos os tubos foram armazenados em refrigeração (5 ± 1 °C). O processo foi monitorado ao longo do

tempo, sendo retirada uma alíquota de 5 g um dia após a inoculação, e após 7, 14 e 21 dias. A cada ponto retirado, a amostra foi inserida em sacos de homogeneização estéreis e diluída com água peptonada 0,1%, sendo submetida ao homogeneizador de amostras (MA440, Marconi).

Após, foi utilizado o método de plaqueamento direto em superfície das diluições seriadas (10^{-1} até 10^{-3}) previamente preparadas. Inoculou-se 0,1 mL de cada diluição na superfície do meio solidificado nas placas de Petri, sendo estas incubadas a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por $26\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Para *L. monocytogenes* o meio utilizado foi Oxford modificado (MOX, Neogen®) e para *S. aureus*, o meio Baird Parker suplementado (Merck®).

2.2.13 Análise estatística

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata, e os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Grau de maturação dos frutos de pimenta rosa, rendimento de extração e composição química do OEPR

A cor é um atributo importante para a determinação do estágio de maturação de frutos. A análise colorimétrica possui a vantagem de não ser destrutiva, que no caso da avaliação de estágios de maturação de frutos permite determinar características sem remoções de amostras (MOTTA et al., 2015). Neste estudo, verificou-se que os frutos da pimenta rosa apresentaram valores médios de $L = 36,48$; $a^* = 17,52$; $b^* = 7,13$, estando de acordo com os resultados de Dannenberg et al. (2016) que também avaliaram os frutos de pimenta rosa e mostraram valores de $L = 36,42$, $a^* = 17,19$ e $b^* = 6,75$, caracterizando-os como maduros.

O rendimento de extração do OEPR foi de aproximadamente 6,7% em base úmida e a densidade foi de 0,85 g/mL. Investigações de Ribeiro et al. (2015) com fruto de mesma espécie indicaram 4,0% de extração e densidade de 0,87 g/mL. De forma similar, Dannenberg et al. (2016) encontraram rendimento de 3,6% e densidade do OEPR de 0,87 g/mL. Dessa forma, observou-se que o estudo em questão mostrou maior rendimento de extração em comparação a outros relatos da literatura, apresentando densidade análoga.

De acordo com a Tabela 2, OEPR apresentou 25 constituintes tendo como principais o mirceno (28,26%) como composto majoritário seguido por α -pineno (20,27%), germacreno D (15,32%) e limoneno (10,57%).

Tabela 2 - Perfil da composição química do óleo essencial de frutos maduros de pimenta rosa (OEPR).

Composto fenólico	Tempo de retenção (min)	Área do pico (%)
4-Careno	4,1	0,1
α -pineno	4,2	20,2
p-Menth-8-en-2-ol acetate	4,6	0,1
(+)-Sabineno	5,2	1,5
(-)- β -Pineno	5,3	3,0
Mirceno	5,8	28,2
Limoneno	6,9	10,5
δ -Elemeno	19,4	0,7
α -Copaeno	20,9	1,1
ι -Gurjuneno	22,3	0,6
β -Caryophyllen	22,6	2,7
α -Caryophyllene	24,0	0,2
Germacreno D	25,1	15,3
(+)-Ledeno	25,7	1,6
α -Muuroleno	26,0	0,8
γ -Muurolene	26,5	0,6
δ -Cadineno	26,9	5,6
Di-epi- α -cedreno	27,1	0,4
Germacreno B	28,0	0,3
Germacreno D-4-ol	28,8	0,8
14-Methylcholest-8-ene-3,6-diol	29,9	0,3
δ -Cadinol	31,3	1,4
τ -Muurolol	31,5	0,1
α -Cadinol	31,8	1,4
5 β ,7 β H,10 α -Eudesm-11-en-1 α -ol	33,0	1,6

A composição do OEPR foi similar ao de óleos essenciais de frutos provenientes da mesma localidade, como encontrado por Dannenberg et al. (2019), que detectaram β -mirceno em maior quantidade (41,0%) seguido de β -cubebeno (12,2%) e limoneno (8,9%). Ainda relacionando aos frutos da mesma localização, Dourado (2012) também relatou a presença destes compostos ao analisar frutos maduros de *S. terebinthifolius* Raddi, identificando mirceno (48,1%) como predominante seguido de 5,14% de α -Pineno, 1,9% de limoneno, e 0,3% de β -cubebeno.

Por outro lado, Barbosa et al. (2007) observaram como composto majoritário de OEPR Δ^3 -careno (30,0%), seguido por β -felandreno (18,5%) e α -pineno (14,3%). Santos et al. (2010) também avaliaram OEPR e obtiveram 20,4% de mirceno, 17% de limoneno e 10,8% de germacreno D. Ennigrou et al. (2011) encontraram predominantemente germacreno (27,1%) seguido por α -felandreno (22,1%) e β -cubebeno (10,0%). Santos-Cavalcanti et al. (2015) indicaram concentrações de 44,9% de α -pineno, 17,6 % de germacreno D e 15,1% de β -pineno.

A variabilidade na composição dos fitoquímicos dos óleos essenciais desta espécie pode ser influenciada pelo tipo de solo da localidade, idade da planta e diferentes métodos de extração (TLILI et al., 2018). Na busca por moléculas bioativas, a exploração de recursos naturais aparece como uma alternativa promissora e há uma grande reserva dessas substâncias em óleos essenciais. A complexidade de seus constituintes químicos torna extremamente difícil o desenvolvimento de resistência em micro-organismos (SALEM et al., 2018).

A atividade antimicrobiana varia com o tipo de óleo essencial e a cepa do micro-organismo que será inibida sendo que a composição química dos óleos influencia diretamente nesse processo. A ação antimicrobiana dos óleos pode ser atribuída à sua capacidade de penetrar através das membranas para o interior da célula, exibindo atividade inibitória sobre as propriedades funcionais (HUANG et al., 2014). O uso de moléculas antioxidantes naturais, ao contrário dos sintéticos, é preferencial pelos consumidores para evitar deterioração oxidativa de alimentos. De fato, o uso de antioxidantes sintéticos como butil hidroxitolueno (BHT) e terc-butilhidroquinona (TBHQ) são suspeitos de causar efeitos colaterais carcinogênicos (CALEJA et al., 2017).

De acordo com Inoue (2004), o mirceno, componente majoritário do OEPR encontrado neste estudo (28,26%), contribui em grande proporção para a atividade antimicrobiana do óleo essencial, principalmente frente a *S. aureus*. Desta forma, o perfil cromatográfico de OEPR encontrado indica o possível efeito antimicrobiano, podendo ser aplicado potencialmente para o desenvolvimento de novos materiais, como embalagens bioativas para alimentos.

2.3.2 Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas contendo PLA e OEPR

A viscosidade aparente das soluções e a condutividade elétrica das soluções de PLA com diferentes concentrações de OEPR estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Viscosidade aparente e condutividade elétrica de soluções poliméricas com PLA e diferentes concentrações de OEPR.

OEPR (%)	Viscosidade aparente (mPa/s)	Condutividade elétrica (μ S/cm)
0	128,8 \pm 1,6 ^a	0,62 \pm 0,01 ^a
10	100,1 \pm 0,2 ^b	0,38 \pm 0,01 ^b
20	69,9 \pm 0,3 ^c	0,34 \pm 0,02 ^c
30	60,3 \pm 0,6 ^d	0,28 \pm 0,01 ^d

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. OEPR = Óleo essencial de pimenta rosa

A incorporação do OEPR reduziu estatisticamente a viscosidade da solução polimérica, diminuindo conforme o aumento na concentração de OEPR. Silva et al. (2018) também reportaram que a adição de óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) diminuiu a viscosidade da solução polimérica contendo isolado de proteína de soja, óxido de polietileno (PEO) e zeína. Similarmente, Teilaghi et al. (2020) encontraram o mesmo comportamento em soluções de zeína adicionadas de 5, 10 e 15% de óleo essencial de semente de cominho (*Nigella sativa*). Pelissari et al. (2012) relataram que a viscosidade de uma solução está associada às interações entre as moléculas componentes e depende das concentrações e naturezas dos solutos e dos reagentes utilizados. Desta forma, possivelmente a presença do OEPR interfere nas interações e ligações inerentes entre as moléculas da solução de PLA, enfraquecendo

assim as ligações entre seus componentes constituintes, resultando em uma menor viscosidade da solução.

A presença do óleo também reduziu a condutividade elétrica das soluções significativamente, em todas as concentrações. Rafiq et al. (2018) avaliaram o efeito da incorporação de óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) e canela (*Cinnamomum cassia*) na formação de nanofibras de PVA e alginato de sódio, onde verificaram que a presença deles influenciou na diminuição da condutividade elétrica. Em outro estudo, Mori et al. (2015) observaram que a adição de óleo essencial de candeia (*Eremanthus erythropappus*) para desenvolver nanofibras de PLA mostrou desempenho semelhante aos estudos citados, apresentando a mesma característica de redução da condutividade com o aumento da concentração de óleo.

Assim como a viscosidade, a condutividade elétrica é afetada por diferentes fatores, como a força iônica do meio e o tipo de polímeros e solvente (GHORANI et al., 2015). Com isso, para um sistema de solvente constante no processo de *electrospinning*, a modificação na razão de massa das misturas de polímeros e bioativos presentes ou no tipo de polímeros são os principais fatores para as alterações da condutividade elétrica.

2.3.3 Morfologia e distribuição de diâmetro das fibras ultrafinas com PLA e diferentes concentrações de OEPR

As fibras ultrafinas contendo apenas PLA (controle) exibiram morfologia livre de *beads*, com diâmetro médio de 426 nm. A adição de OEPR propiciou a redução do diâmetro das fibras ultrafinas nos tratamentos contendo 10, 20 e 30% de OEPR em relação ao controle, apresentando valores de 239, 226 e 167 nm, respectivamente, como indicado na Figura 9. Comportamento similar foi encontrado em estudo realizado por Unalan et al. (2019), que desenvolveram nanofibras de policaprolactona carregadas com óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) pela técnica de *electrospinning*, mostrando que a adição do óleo levou a uma ligeira diminuição no diâmetro das fibras.

A presença do OEPR na formulação promoveu a formação de *beads* e grumos, provavelmente decorrentes da insuficiente evaporação do solvente utilizado. Mori et al. (2015) relataram que em misturas de PLA e óleo essencial de candeia (*Eremanthus erythropappus*), o acréscimo do óleo influenciou no aumento do diâmetro das

nanofibras e redução na quantidade de *beads*. Ainda, Scaffaro et al. (2018) observaram que a presença de carvacrol nas membranas funcionais de PLA afetaram a morfologia das nanofibras induzindo ao acréscimo nos seus diâmetros.

A presença de *beads* (Figuras 9c, 9e, 9g) geralmente é associada negativamente à formação do material. Porém, supõe-se que eles podem ser não tão negativos assim, já que as suas estruturas podem abrigar alguma porcentagem do composto bioativo presente na estrutura e ser liberado gradativamente no ambiente em que estiver em contato (GREENFIELD et al., 2019).

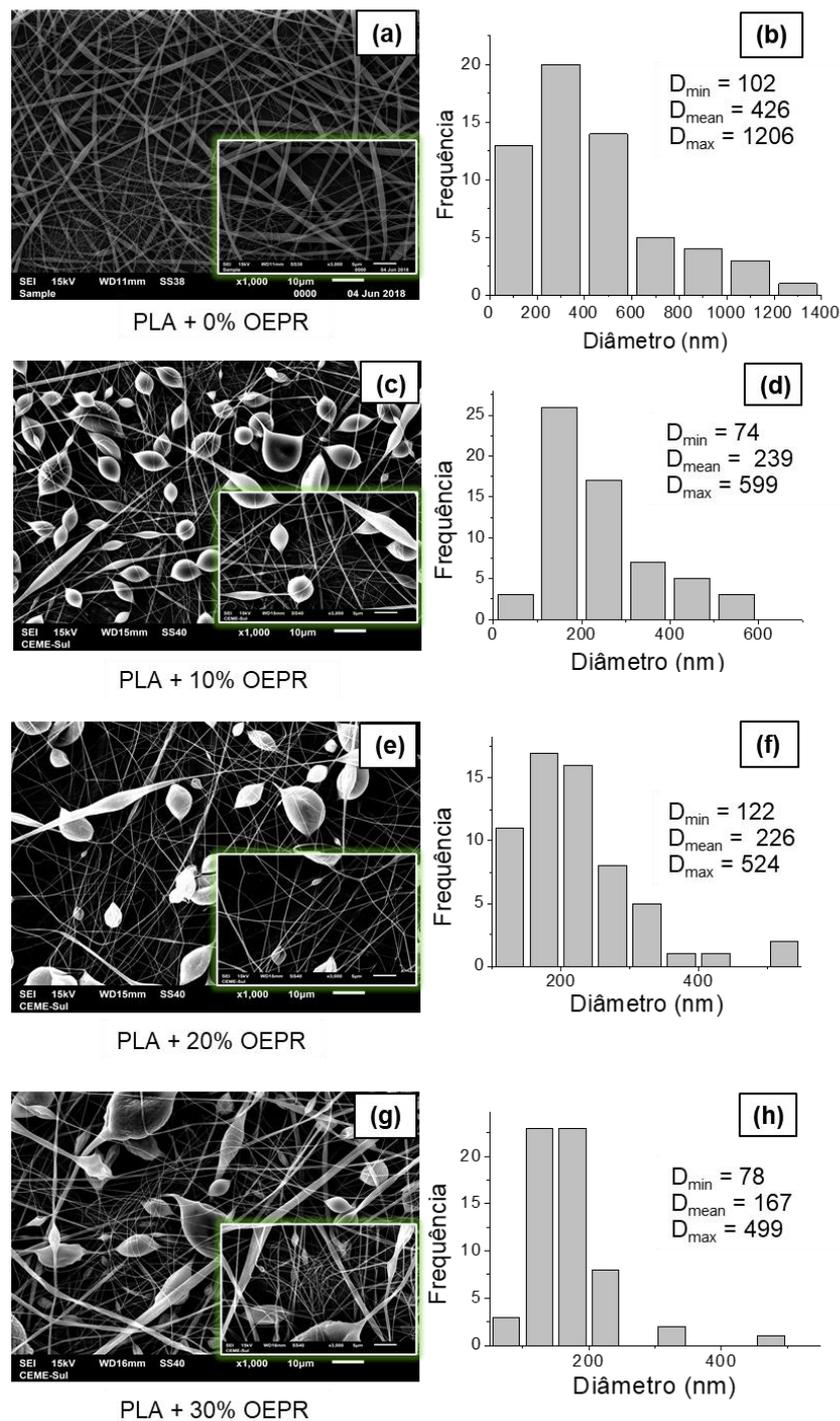


Figura 9 - Morfologia e distribuição de frequência das fibras ultrafinas com poli (ácido láctico) (PLA) e diferentes concentrações de óleo essencial de pimenta rosa (OEPR).

Em nanofibras compostas por PEO e proteína de soja, Silva et al. (2018) verificaram que a adição de óleo essencial de gengibre também proporcionou o aumento o diâmetro das mesmas. De acordo com Bhardwaj e Kundu (2010), soluções que possuem condutividades baixas resultam no alongamento insuficiente do jato a ser eletrofiado pelas forças elétricas e levam à produção de nanofibras com diâmetros

maiores. Entretanto, foi observado que no presente estudo, o comportamento se mostrou oposto aos dados da maior parte da literatura. Tal fato pode ser explicado pela inconstância do estiramento da solução, por algumas vezes fazendo com que ocorresse até o entupimento da agulha, influenciando na heterogeneidade do material formado, sendo que ora a solução foi depositada no coletor na forma de fibras e ora na forma de *beads*. Segundo Haider et al. (2018), a presença dos *beads* é atribuída à influência da força gravitacional e outro fator importante que pode causar estas distorções na estrutura das fibras é a densidade de carga superficial, já que qualquer mudança neste parâmetro também pode afetar a morfologia da nanofibra.

2.3.4 Estabilidade térmica das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEPR

A Tabela 4 mostra a temperatura de decomposição inicial (T_{Di}) e final (T_{Df}) juntamente com o percentual de perda de massa.

Tabela 4 - Perfis de temperatura e perda de massa dos constituintes isolados e das fibras ultrafinas avaliadas por TGA.

Amostra	T_{Di} (°C)	T_{Df} (°C)	T (°C)	Perda de massa (%)
Componentes individuais				
OEPR	44,9	120,5	82,3	58,4
	119,1	181,2	151,4	27,1
PLA	305,4	382,6	360,7	89,8
Fibras ultrafinas				
OEPR (%)				
10	131,8	164,5	148,6	2,2
	282,1	376,5	355,6	77,7
20	120,2	173,2	154,5	11,5
	321,0	382,3	362,8	56,3
30	106,2	172,3	145,9	13,7
	301,6	376,2	356,1	62,4

T_{Di} = Temperatura de decomposição inicial; T_{Df} = Temperatura de decomposição final; T = temperatura onde ocorreu a maior perda de massa. OEPR = Óleo essencial de pimenta rosa; PLA = poli (ácido láctico).

Como pode ser visto, o OEPR apresentou dois picos de degradação, um próximo a 82,3 °C, indicando 58,4% de perda de massa, sendo característico de desidratação (LOCALI-PEREIRA et al., 2020), e outro próximo a 151,4 °C, mostrando 27,1% de perda de massa, que se refere à decomposição do composto (LOCALI-PEREIRA et al., 2019). O PLA mostrou um estágio de decomposição a 360,7 °C e aproximadamente 90% de perda de massa. A temperatura de degradação do PLA puro em torno de 300 °C foi relatada por Thangaraju et al. (2012), sendo característica deste polímero. De acordo com a Figura 10, a incorporação do OEPR proporcionou menor estabilidade térmica nos tratamentos com 10, 20 e 30%, indicando perdas de massa a partir de 106 °C, em comparação com fibras produzidas com PLA puro.

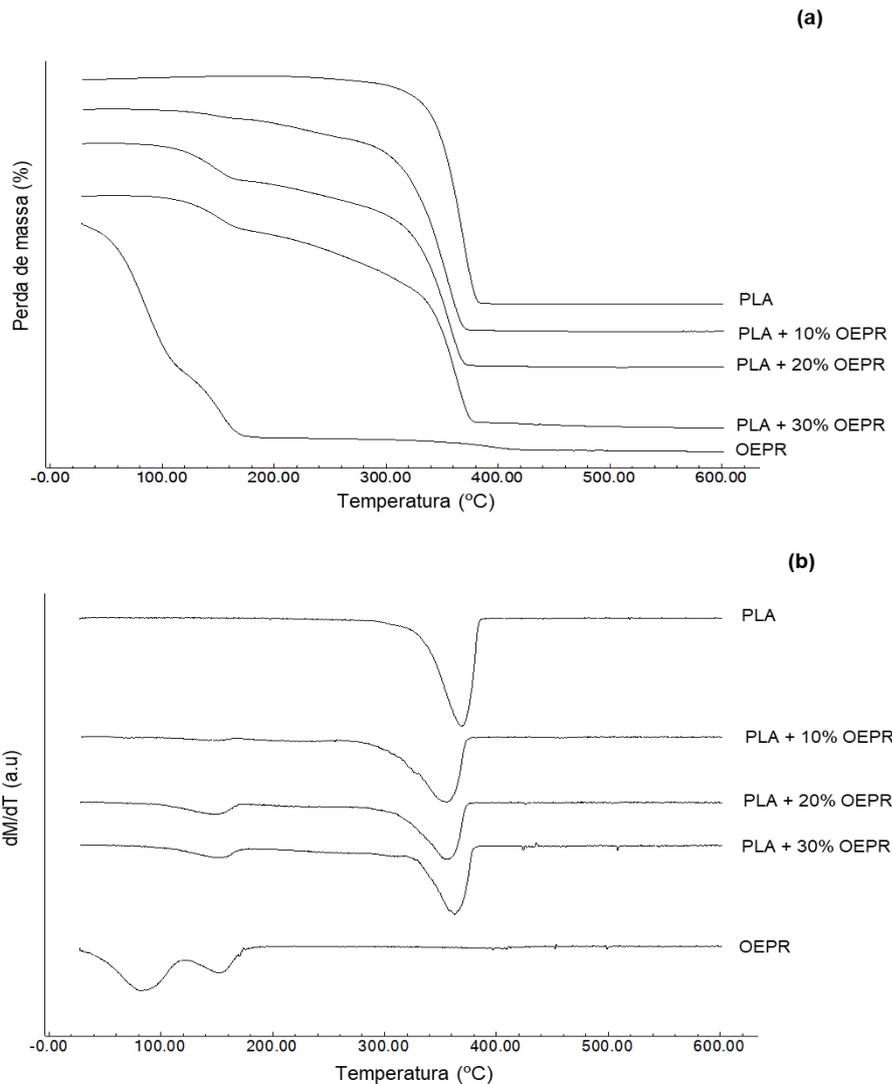


Figura 10 - Curvas da análise termogravimétrica (TGA) (a) e da primeira derivada (b) dos constituintes isolados e das fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEPR.

Ainda, observou-se que nas fibras ultrafinas, o PLA protegeu o OEPR pois as T_{Di} apresentadas foram de 131,8, 120,2 e 106,2 para 10, 20 e 30% de OEPR frente a T_{Di} de 44,9 °C do OEPR puro. Dessa forma, ressalta-se a importância de encapsular o OEPR, pois ele no seu estado natural, começa a se degradar antes. Com isso, este material pode ser aplicado em embalagens alimentares que não serão submetidas a processos que exijam temperaturas acima de 100 °C.

2.3.5 Caracterização estrutural das fibras ultrafinas com OEPR através da espectroscopia FTIR

As interações químicas entre o PLA e o OEPR foram averiguadas pelo espectro de FTIR o qual se encontra na Figura 11. As absorções características do PLA são três fortes bandas devido às vibrações do grupo C-CO-O-C, ou seja, a banda derivada ao estiramento do C=O em 1747 cm^{-1} , a banda proveniente ao estiramento assimétrico do C-O em aproximadamente 1195 cm^{-1} e, em 1110 cm^{-1} , proveniente do estiramento simétrico C-O-C. A inexistência de uma banda intensa na região $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ (estiramento do grupamento O-H) é um indicativo de ausência de subprodutos de hidrólise do PLA (PALMIERI et al., 2020).

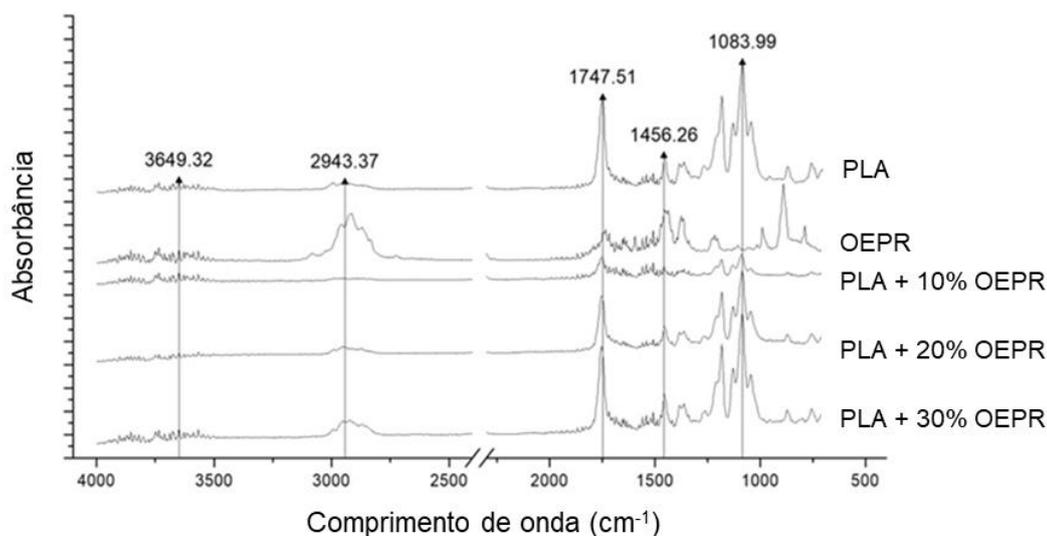


Figura 11 - Espectro FTIR-ATR dos constituintes isolados e das fibras ultrafinas com PLA e diferentes concentrações de OEPR.

Para o OEPR puro, o espectro exibiu banda característica em torno de 750 cm^{-1} relacionado à ligação C-H aromática. Ainda, bandas entre $1400\text{ e }1500\text{ cm}^{-1}$ correspondem a ligações C=C provenientes de anéis aromáticos característicos do óleo (MUKHERJI e PRABHUNE, 2014). Bandas que aparecem entre $2750\text{ e }3000\text{ cm}^{-1}$ provavelmente estão relacionadas a ligações O-H de compostos terpenóides (BOUGHENDJIOUA e DJEDI, 2017).

Foi possível observar que nas bandas em torno de 900 cm^{-1} , relacionada a compostos monoterpênicos do óleo, e 2943 cm^{-1} , atribuída a ligações C-H de metilas e metilenos (ORÉFICE et al., 2004), as bandas se apresentaram mais acentuadas no

OEPR puro em comparação às menores intensidades mostradas nos tratamentos com 10% (quase imperceptível), 20 e 30% nas fibras ultrafinas. Desta forma, pode-se inferir que provavelmente ocorreu determinada perda do OEPR durante o processo de *electrospinning*, por meio de volatilização.

2.3.6 Molhabilidade das membranas formadas por fibras ultrafinas com diferentes concentrações de OEPR

Para determinar o caráter de molhabilidade das membranas de fibras ultrafinas, foram medidos os ângulos de contato com a água, conforme Figura 12.

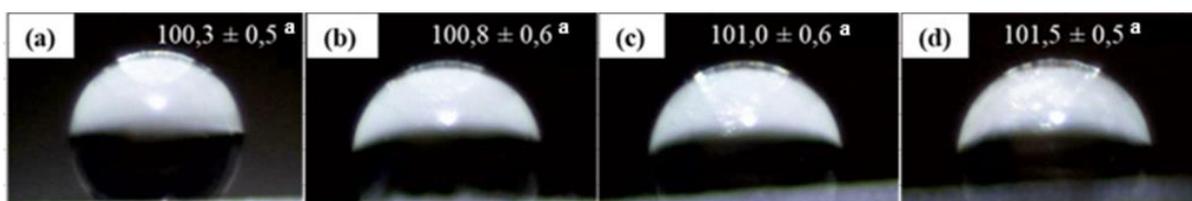


Figura 12 - Ensaio de molhabilidade para fibras ultrafinas de PLA (a), PLA + 10% OEPR (b), PLA + 20% OEPR e PLA + 30% OEPR.

Independente da composição, todos os tratamentos apresentaram ângulo de contato maior do que 90°, implicando em caráter hidrofóbico das membranas de fibras ultrafinas formadas. Este desempenho era esperado devido ao fato de o PLA possuir um caráter hidrofóbico, de acordo com a maior parte da literatura (SUN et al., 2020). Como os óleos essenciais são compostos por moléculas altamente hidrofóbicas (DHIFI et al., 2016), esperava-se que a presença do OEPR incrementaria a repulsão pela água. Entretanto, não ocorreu aumento significativo nesse aspecto ao adicionar o OEPR nas diferentes concentrações.

2.3.7 Atividade antimicrobiana

2.3.7.1 CIM, CBM e disco-difusão

Os resultados de CIM e CBM do OEPR estão apresentados na Tabela 5. O menor valor de CIM observado foi para *S. aureus*, com 256,9 mg/mL, sendo a menor concentração de óleo capaz de impedir o crescimento desta bactéria.

Tabela 5 - CIM e CBM do OEPR e halos de inibição do OEPR e das fibras ultrafinas contendo 30% de OEPR.

Bactéria	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	Halos (mm)	
			OEPR	Fibras ultrafinas
<i>L. monocytogenes</i>	513,8	642,3	11,5 ± 1,1 ^a	5,6 ± 1,2 ^b
<i>S. aureus</i>	256,9	385,3	13,2 ± 1,7 ^a	7,9 ± 1,2 ^a
<i>E.coli</i>	-	-	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
<i>S. enteritidis</i>	770,7	770,7	9,6 ± 0,9 ^b	0,0 ± 0,0 ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. CIM = Concentração inibitória mínima; CBM= Concentração bactericida mínima; OEPR = Óleo essencial de pimenta rosa.

Para *E. coli*, o OEPR não indicou efeito antimicrobiano, provavelmente porque bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos óleos essenciais do que as Gram-positivas. No entanto, *S. enteritidis* que também é uma bactéria Gram-negativa, apresentou uma pequena sensibilidade ao OEPR, com CIM e CBM de 770,7 mg/mL. A sensibilidade das bactérias Gram-positivas aos óleos essenciais se deve às características da sua estrutura. Aproximadamente 90% - 95% da parede celular das bactérias Gram-positivas consiste em peptidoglicano, ao qual outras moléculas, como ácido teicóico e proteínas, estão ligadas (NAZZARO et al., 2013). A estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas permite que as moléculas hidrofóbicas penetrem facilmente nas células e atuem tanto na parede celular quanto no citoplasma. Os compostos fenólicos, que também estão presentes nos óleos essenciais, comumente apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Seu efeito depende da quantidade do composto presente: em baixas concentrações, podem interferir com enzimas envolvidas na produção de energia e, em concentrações mais elevadas, podem desnaturar proteínas (TIWARI et al., 2009). Dannenberg et al. (2019) desenvolveram investigações acerca do óleo essencial de pimenta rosa e constataram que a CIM para *S. aureus* (ATCC 6538) e *L. monocytogenes* (ATCC 7644) foi de 0,68 e 1,36 mg/mL, respectivamente e a CBM foi de 2,72 mg/mL, para ambas. Dourado (2012) também pesquisou sobre o potencial antimicrobiano e antioxidante de OEPR e obteve CIM frente a *L. monocytogenes* (ATCC 7644) foi de 2,73 e CBM de 5,46 µg/mL, e frente a *S. aureus* (ATCC 23235), a CIM foi de 10,92 e CBM de 21,84 µg/mL. Em comparação ao presente estudo, estes

valores estão bem abaixo, fato que pode ser justificado pela época da colheita dos frutos, clima, situação do solo, precipitações e tipos diferentes de cepa utilizadas.

Quanto aos halos de inibição, aqueles maiores ou iguais a 10 mm foram considerados satisfatórios, indicando atividade antimicrobiana. Observou-se que o efeito do OEPR não mostrou diferença significativa entre *L. monocytogenes* e *S. aureus*, com halos de $11,5 \pm 1,1$ e $13,2 \pm 1,7$ mm, respectivamente.

A partir dos resultados da CIM e CBM, selecionaram-se as concentrações para aplicar nas soluções poliméricas que posteriormente produziram as fibras ultrafinas. Tais concentrações foram fixadas em 10, 20 e 30% de OEPR, visto que estas condições, em testes preliminares, indicaram sucesso na formação de fibras. Quanto aos halos de inibição desenvolvidos pela presença de fibras contendo 30% de OEPR, tanto para *L. monocytogenes* quanto para *S. aureus*, ficaram abaixo de 10 mm, sendo considerados insatisfatórios. Entretanto, é importante ressaltar que durante o processo de *electrospinning*, pode ter ocorrido perda dos 30% de OEPR ou de parte dessa quantia, diluição bem inferior ao OEPR puro, por volatilização.

2.3.7.2 Análise por micro-atmosfera do OEPR

O teste de micro-atmosfera é baseado na ação de compostos voláteis, que podem inibir significativamente o crescimento de algumas bactérias. As reduções na carga microbiana neste ensaio foram realizadas apenas para as bactérias Gram-positivas, já que as Gram-negativas não apresentaram resultados positivos para a ação antimicrobiana no ensaio de disco-difusão das fibras ultrafinas. Foi possível observar que o OEPR puro (100%) indicou reduções em torno de 90% para ambas as bactérias. Por outro lado, a concentração de 30% de OEPR mostrou redução da contagem de células por volta de 40% para *L. monocytogenes* e 50% para *S. aureus*, conforme Figura 13. Em uma situação hipotética de aplicação das mesmas condições em alimentos, dependendo da carga microbiana inicial contida no produto alimentar, esse resultado de redução poderia proporcionar a garantia de segurança.

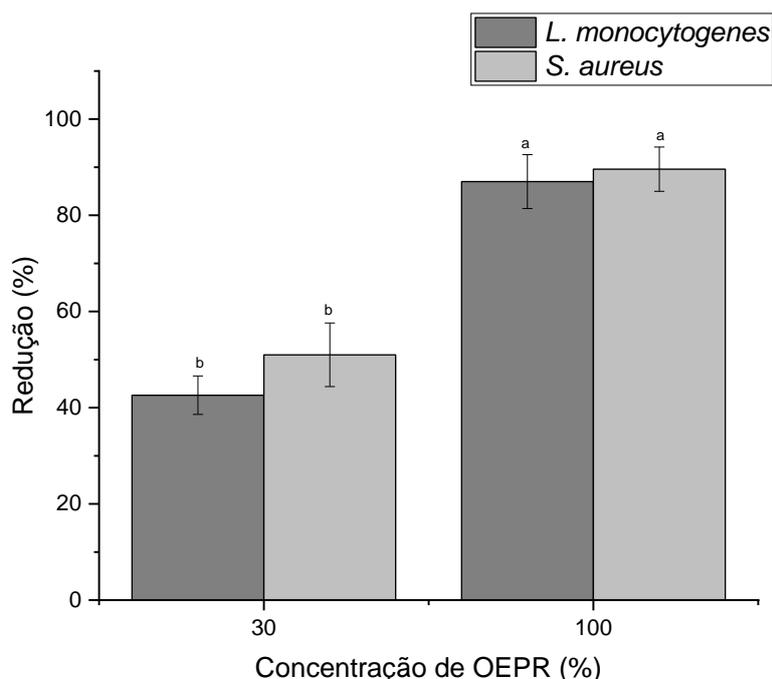


Figura 13 - Atividade antimicrobiana do OEPR por ação de voláteis por meio do ensaio de micro-atmosfera sobre o crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Em estudo similar utilizando OEPR, Dannenberg et al. (2017) verificaram que em micro-atmosfera a redução foi de 100% no desenvolvimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* e, 16 e 15% para *E. coli* e *S. Typhimurium*. Antunes et al. (2017) desenvolveram nanofibras com óleo essencial de eucalipto e observaram que nas concentrações de 0,25, 0,38 e 0,63 $\mu\text{L}/\text{cm}^3$ houve total inibição do crescimento de células viáveis de *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Silva et al. (2018) avaliaram a aplicação de nanofibras com PEO, proteína isolada de soja e óleo essencial de gengibre, constatando que este último influenciou na redução de aproximadamente 43% na contagem de *L. monocytogenes*, ao usar concentrações de 0,2 e 0,3 $\mu\text{L}/\text{cm}^3$.

De acordo com Trombetta et al. (2005), bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis à fase vapor que contenha terpenos, fato que pode ser observado neste estudo, já que o OEPR apresentou maior quantidade de mirceno, considerado um monoterpeno. O fato de um mesmo óleo essencial agir de formas distintas frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pode ser explicada pela estrutura desses micro-organismos, tendo o primeiro grupo uma parede celular única, de camada espessa contendo em sua maior parte peptidoglicano, e o segundo, contendo parede

celular de peptidoglicano além de múltiplas camadas bastante complexas, com lipoproteína e lipopolissacarídeos (SAIDA et al., 2020).

No presente estudo, provavelmente os principais componentes majoritários, que foram mirceno, α -pineno e limoneno, podem ter agido em sinergismo para efetivar a atividade antimicrobiana. Porém, os mecanismos de ação são complexos e exigem investigações mais aprofundadas sobre a matéria-prima e substrato ao qual irá atuar. De acordo com Saad et al. (2013), os mecanismos de ação dos óleos irão depender da sua composição química. A localização de um ou mais grupos funcionais pode influenciar na sua atividade antimicrobiana. Como exemplo, o timol e o carvacrol possuem efeitos antimicrobianos semelhantes, mas têm mecanismos de ação diferentes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Reyes-Jurado et al. (2019) relataram que na fase vapor, o óleo se dispersa livremente, tendo um impacto particular contra os micro-organismos devido à sua ação superficial, tornando-os mais suscetíveis aos voláteis.

Desta forma, a capacidade antimicrobiana volátil do OEPR, sem necessitar contato direto com o alimento, impulsiona investigações para o desenvolvimento de sistemas de embalagens que podem controlar a multiplicação de bactérias patogênicas e deteriorantes.

2.3.7.3 Aplicação das fibras ultrafinas em *cream cheese*

Para a avaliação do efeito das membranas de fibras ultrafinas desenvolvidas, foi escolhido o tratamento com a concentração que continha 30% de OEPR por ter apresentado melhores resultados nas avaliações antimicrobianas frente às bactérias Gram-positivas. A análise para a verificação e quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC/g) também foi realizada 24 h após o início do experimento. No entanto, os resultados não foram expressos porque não ocorreu crescimento suficiente de ambas as bactérias.

Para *L. monocytogenes*, observou-se que a presença das fibras ultrafinas no período de 7 dias não indicou inibição de crescimento, relacionado ao controle positivo. O mesmo comportamento foi mostrado no período de 14 dias. Entretanto, em 21 dias, notou-se uma redução significativa na contagem de colônias, por volta de 26%, conforme indicado na Figura 14.

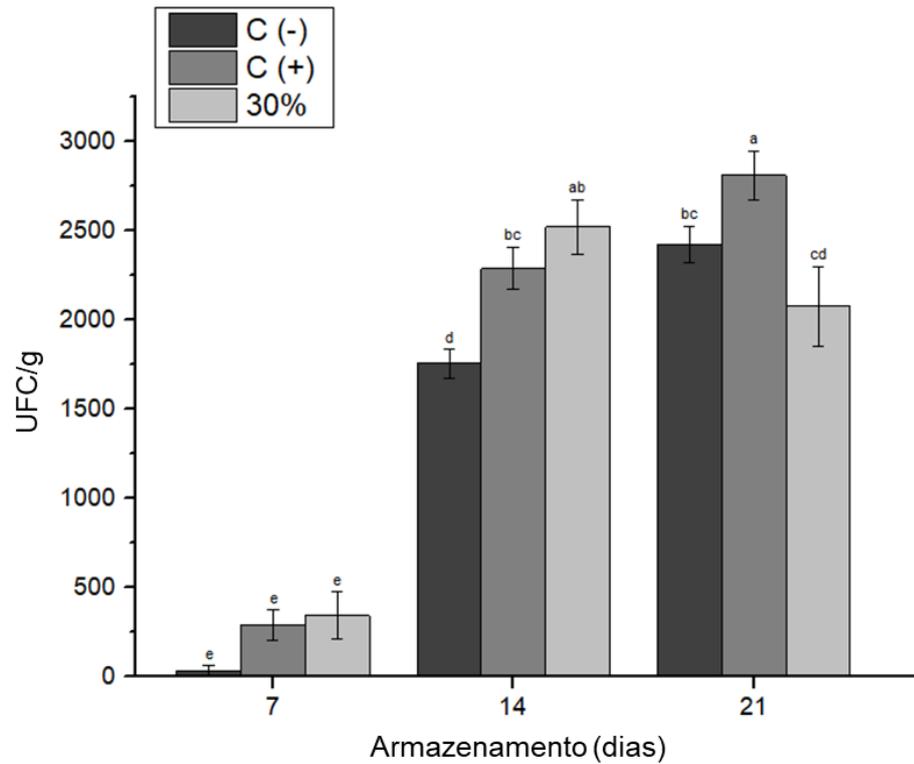


Figura 14 - Avaliação do efeito da aplicação das fibras ultrafinas e do tempo de armazenamento na presença de *L. monocytogenes*. C (-) = Controle negativo; C (+) = Controle positivo; 30% = Fibras ultrafinas com 30% de OEPR.

Para *S. aureus*, a presença das fibras ultrafinas no período de 7 dias indicou uma redução no conteúdo de células, mas não foi significativa. Por outro lado, em 14 dias ocorreu uma redução significativa de aproximadamente 30%. Comportamento análogo foi identificado pós 21 dias, com redução significativa ainda maior, por volta de 62%, conforme apontado na Figura 15.

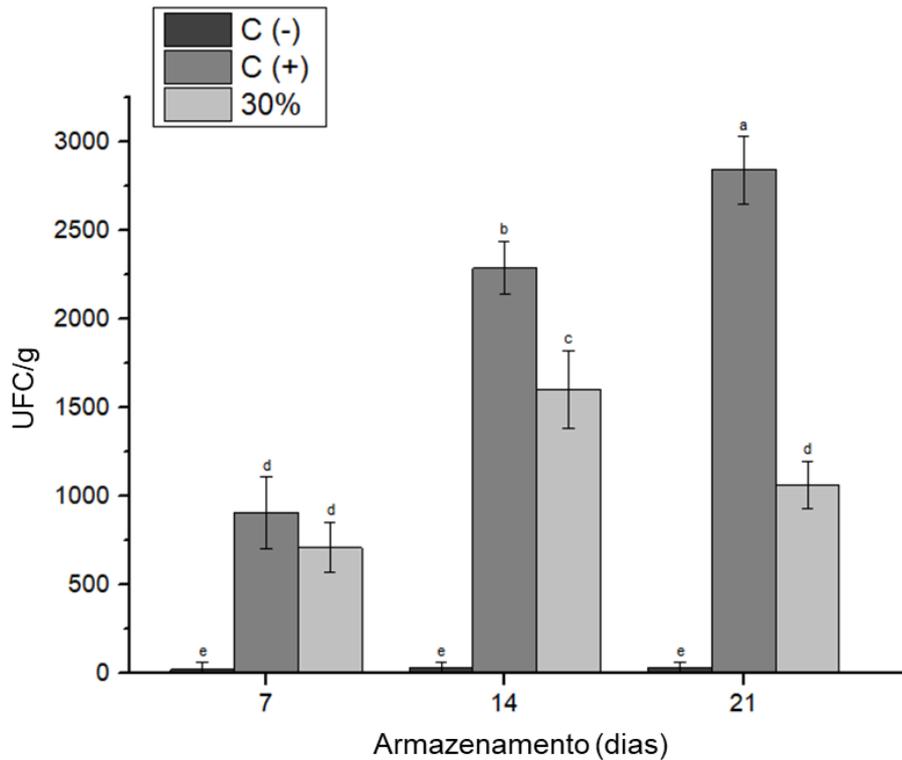


Figura 15 - Avaliação do efeito da aplicação das fibras ultrafinas e do tempo de armazenamento na presença de *S. aureus*. C (-) = Controle negativo; C (+) = Controle positivo; 30% = Fibras ultrafinas com 30% de OEPR.

Considerando que o prazo de validade indicado no alimento avaliado é de 5 dias após a abertura da embalagem, os resultados obtidos para ambas as bactérias mostraram que até o término do prazo, a presença das fibras na embalagem foi indiferente. No entanto, se as fibras fossem inseridas na tampa da embalagem no momento do envase, logo após a fabricação do produto, provavelmente ocasionaria um efeito positivo, já que os compostos voláteis ficariam detidos na embalagem hermeticamente fechada. Os resultados também serviram para mostrar o perfil de comportamento do produto durante um maior período de armazenamento, sugerindo que o OEPR tenha sido liberado gradativamente

Dannenberget al. (2017) estudaram o efeito da presença de OEPR em filmes de acetato de celulose produzidos pela técnica de *casting* e aplicados em queijos, constatando que a liberação do óleo está relacionada à afinidade entre os compostos apolares do óleo essencial e do alimento avaliado. Silva et al. (2018) produziram nanofibras contendo óleo essencial de gengibre e aplicaram em fatias de queijo minas, verificando que a presença do material indicou redução significativa de colônias de *L.*

monocytogenes no terceiro e nono dia de armazenamento, sendo que neste último apresentou cerca de 17% de redução em relação ao controle positivo.

Logo, supõe-se que os voláteis do OEPR tenham entrado em contato, em um primeiro momento, ao menos com a superfície da camada do *cream cheese*. À medida que o tempo de armazenamento foi passando, a retenção do OEPR foi prolongada dentro da embalagem, fazendo com que estes compostos agissem mais ativamente. Com isso, os dados mostrados neste estudo estimulam o desenvolvimento de outras pesquisas investigativas em alimentos que tenham como característica o prazo de validade mais prolongado, já que o OEPR se mostrou eficaz na redução da contagem de células no vigésimo primeiro dia.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais é comumente avaliada por meio de métodos de contato direto entre patógeno e o agente microbiano, através de métodos de difusão e diluição. Entretanto, a função dos óleos essenciais na fase vapor como agentes antimicrobianos vem ganhando mais importância a cada dia. Tyagi et al. (2010) sugeriram que os óleos essenciais na fase de vapor possuem maior atividade antimicrobiana, uma vez que os compostos ativos são altamente voláteis. Segundo Kloucek et al. (2012), cada constituinte presente no óleo tem uma volatilidade diferente, portanto, quando o óleo é introduzido em um microambiente fechado, os voláteis começam a se dispersar em taxas distintas na fase vapor dentro do espaço em questão, de acordo com o grau de volatilidade, até atingirem o equilíbrio.

Assim, observou-se que as fibras ultrafinas mostraram um bom resultado, contribuindo para a redução microbiana quando comparado ao controle positivo. Além disso, a liberação dos compostos dos óleos essenciais para o alimento por meio da volatilização não necessitou de contato direto, permitindo a redução de características sensoriais indesejáveis que podem vir a ocorrer no alimento.

2.4 Conclusão

Através dos resultados obtidos, verificou-se que o OEPR apresentou um perfil de compostos químicos variado, com predomínio do mirceno. Entre as bactérias testadas, apenas a *E. coli* não apresentou sensibilidade ao OEPR. Na análise por micro-atmosfera, observou-se que o OEPR puro proporcionou a redução de 90% da carga microbiana de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Já o OEPR na concentração de 30% propiciou uma redução de 40% para *L. monocytogenes* e 50% para *S. aureus*.

As fibras ultrafinas aplicadas à embalagem do *cream cheese* apresentaram efeito inibitório somente no vigésimo primeiro dia de armazenamento, para *L. monocytogenes*. Para *S. aureus*, as fibras com 30% de OEPR inibiram o crescimento das colônias no décimo quarto e vigésimo primeiro dia, com reduções de 30 e 62%, respectivamente.

O OEPR influenciou na redução da condutividade e viscosidade das soluções poliméricas, afetando a morfologia das fibras, sendo constatada a presença de *beads* nos tratamentos onde estava incluído. A constituição química estrutural das fibras pelo FTIR apresentou grupamentos químicos característicos dos materiais utilizados e foi possível observar uma possível evaporação do OEPR nos tratamentos. A análise térmica constatou que o OEPR puro inicia sua degradação térmica e 44,9 °C, sendo assim, o PLA teve a função de protegê-lo, pois as fibras ultrafinas de todos os tratamentos com OEPR tiveram o primeiro pico de temperatura de degradação entre 106 e 131 °C. Por fim, através da análise de molhabilidade por ângulo de contato, a hidrofobicidade do OEPR não influenciou na potencialização da hidrofobicidade das fibras ultrafinas.

CAPÍTULO 3

Desenvolvimento e caracterização de filmes bicamada a base de amido recobertos com fibras ultrafinas contendo óleo essencial de pimenta rosa

3.1 Introdução

O estudo e o desenvolvimento de embalagens de alimentos é multidisciplinar. Engloba principalmente engenharia, microbiologia, química, e outras ciências, sendo promissor, pois visa manter a qualidade dos alimentos e suas matérias-primas devido à oxidação e deterioração microbiana (NEMAT et al., 2019). O crescimento populacional acelerado vem promovendo um acréscimo considerável na geração de resíduos sólidos, sendo que cerca de 40% desses resíduos são constituídos por materiais plásticos não biodegradáveis derivados de fonte fóssil, impactando altamente o meio ambiente (BORRELLE et al., 2020).

Desta forma, pesquisas utilizando polímeros biodegradáveis para o desenvolvimento de embalagens alimentares a partir de filmes têm ganhado importância na indústria. Entre os métodos mais utilizados para a fabricação de filmes, está a técnica de *casting*, que envolve a difusão de uma solução polimérica em um substrato e a remoção por evaporação do solvente, que causa a orientação molecular das moléculas de polímero, resultando na formação do filme (DENG et al., 2018). Na conservação de alimentos, os filmes agem como uma barreira a elementos externos, como sujidades, gases, umidade e compostos aromáticos, controlando a transferência de massa (umidade, oxigênio, dióxido de carbono) (OTONI et al., 2017).

Dentro da variedade de polímeros biodegradáveis existentes, destaca-se o amido, visto que além de ser uma matéria-prima abundante, atóxica, biodegradável, comestível e de baixo custo de comercialização, está disponível em todo o mundo e possui elevada capacidade de formação de gel (DAI et al., 2019). O amido é um polissacarídeo considerado como a principal substância de reserva para plantas e é composto por duas macromoléculas, a amilose e a amilopectina, as quais se diferenciam conforme a fonte botânica, variedades de uma mesma espécie e de acordo com o grau de maturação (THAKUR et al., 2019).

O feijão e o trigo estão entre as principais fontes de amido da alimentação humana e diversos estudos relatam o uso do amido dessas fontes no desenvolvimento de filmes biodegradáveis (LIMA et al., 2017; SONG et al., 2018; BRUNI et al., 2018; VANIER et al., 2019). O elevado teor de amilose no amido de feijão é a principal característica que leva a rápida retrogradação, facilitando a formação dos filmes, formando uma película fina, resistente e transparente (ROY et al., 2020). O armazenamento de feijão em condições adversas de alta temperatura e umidade o

torna suscetível a um fenômeno de endurecimento, também conhecido como *hard-to-cook* (HTC). Feijões com este defeito são caracterizados por longos períodos de cozimento, sendo de menor valor nutritivo e menos aceitáveis pelos consumidores (REYES-MORENO et al., 1993). Dessa forma, visto que a maioria das vezes esses feijões são descartados pela falta de mercado comprador, ele se torna um resíduo agroindustrial que pode ser aproveitado para outras funções que agreguem valor, como a produção de filmes. Ressalta-se, entretanto, que amidos nativos não apresentam propriedades adequadas para o desenvolvimento de embalagens, pois possuem alta solubilidade em água, são muito higroscópicos, têm baixo ponto de fusão, alta retrogradação e piores propriedades mecânicas em comparação com os materiais baseados em polímeros sintéticos (LOMELÍ-RAMÍREZ et al., 2014).

Para otimizar as propriedades de estruturas baseadas em amido, fibras ultrafinas produzidas por *electrospinning* podem ser aplicadas no filme, formando bi ou multicamadas que podem interagir com o alimento a ser embalado, estendendo sua vida útil ao aprimorar as propriedades de barreira dos filmes, por exemplo (CHERPINSKI et al., 2018). Os materiais eletrofiados podem ser produzidos com as propriedades estruturais desejadas pelo controle dos parâmetros empregados no processo de *electrospinning* e nas propriedades da solução. Além disso, as fibras ultrafinas apresentam maior relação superfície-volume e propriedades estruturalmente ajustáveis, podendo oferecer muitos benefícios em embalagens alimentares (TANG et al., 2019). Como matérias-primas eletrofiáveis, também há um diverso campo de polímeros disponíveis (TORRES-GINER, 2011), como PLA e lignina de casca de arroz, e também alguns compostos bioativos como óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) (OEPR), todos citados nos Capítulos 1 e 2 deste presente trabalho.

Os sistemas de embalagens multicamadas visam produzir uma estrutura com propriedades otimizadas, podendo incorporar compostos funcionais (FABRA et al., 2013). Como exemplo, Figueroa-López et al. (2018) que desenvolveram sistemas multicamadas contendo filme de gelatina revestido com nanofibras de policaprolactona (PCL) contendo oleoresina de pimenta preta com o objetivo de melhorar a resistência à água e o desempenho mecânico dos filmes de gelatina convencionais, para aplicação em embalagem ativas de alimentos. Como resultado, as multicamadas reduziram a molhabilidade e aprimoraram as propriedades de barreira, alongamento e ruptura. Por fim, a adição da oleoresina no revestimento

forneceu um forte comportamento antimicrobiano contra *S. aureus*, resultando em uma liberação controlada dos componentes ativos antimicrobianos durante pelo menos os primeiros dez dias após o processamento. Fabra et al. (2016) compararam a adição de nanofibras de policaprolactona (PCL), PLA e polihidroxibutirato (PHB) nas propriedades de barreira de oxigênio e vapor de água quando adicionadas a filmes de amido de milho. Constataram que a adição das nanofibras levou a uma queda exponencial da permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água à medida que a quantidade de nanofibras aumentava. Em outro estudo, Tampau et al. (2020) avaliaram filmes de amido sobrepostos com nanofibras de policaprolactona carregadas com carvacrol, verificando que a presença do carvacrol limitou a biodegradabilidade do sistema multicamadas, aumentando o tempo de decomposição do material.

De acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi unir os estudos acerca dos capítulos anteriores para desenvolver e caracterizar uma estrutura bicamada contendo filme de amido de trigo ou feijão produzido pela técnica de *casting*, aliado às fibras ultrafinas de PLA/lignina/OEPR produzidas pela técnica de *electrospinning*. A composição escolhida para a produção das fibras ultrafinas foi 8% de PLA, 2,5% de lignina e 30% de óleo essencial de pimenta rosa (OEPR), sendo a solução caracterizada pela viscosidade aparente e condutividade, e as fibras caracterizadas pela morfologia, composição química, propriedades térmicas, molhabilidade e atividade antioxidante. A estrutura bicamada foi caracterizada quanto às propriedades colorimétricas, umidade e solubilidade em água, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e atividade antioxidante.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material

Os materiais utilizados nesta etapa do estudo foram PLA (Ingeo 4032D), lignina extraída de casca de arroz pelo processo organossolve, frutos maduros de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), amidos de trigo Topázio e de feijão Carioca HTC.

3.2.2 Extração do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR)

De acordo com o capítulo 2, item 2.2.3.

3.2.3 Composição química do OEPR

De acordo com o capítulo 2, item 2.2.4.

3.2.4 Extração de amido de trigo e feijão

Primeiramente, foi necessário obter a farinha de trigo. Para isso, os grãos de trigo foram acondicionados (umidificação dos grãos) a umidade de 14%, sendo colocado em repouso durante 24 h, para posterior moagem (moinho Chopan, CD1). Logo, o amido foi extraído conforme o processo sugerido por Knight e Olson (1984). Uma mistura de farinha de trigo e água foi preparada em uma proporção de 2:1 (p:v). A massa formada foi lavada com água até completa remoção do amido, e então a mistura de amido e água foi filtrada em peneira de 200 mesh. O filtrado foi centrifugado (Centrífuga KASVI®) a 3500 rpm, durante 20 min. Após a centrifugação, a camada escura na parte superior do material precipitado foi removida e o restante do decantado foi ressuspensão em água destilada e centrifugado (especificações centrífuga) novamente. O processo foi repetido por três vezes. O amido foi seco em estufa com circulação de ar a 40 °C por 16 h até aproximadamente 12% de umidade.

O amido de feijão carioca foi isolado de acordo com Rupollo et al. (2011), com algumas modificações, com a centrifugação da camada de amido suspensa em água destilada a 4000 rpm por 10 min. A camada superior acastanhada foi descartada e a camada inferior foi ressuspensão em água destilada e recentrifugado a 4000 rpm por 10 min. Este processo foi repetido três vezes. O material resultante foi seco em estufa com circulação de ar (Ethik®) a 40 °C por 16 h até o teor de umidade ficar em torno de 9%. O amido seco foi moído usando moinho analítico básico (IKA, A11, EUA) e armazenado a 17 ± 2 °C.

3.2.5 Produção dos filmes de amido pela técnica de *casting*

Os filmes de amido de trigo foram elaborados conforme descrito por Bruni et al. (2018), através do preparo de uma solução filmogênica, onde foram utilizados 3 g de amido, 100 mL de água destilada e 0,30 g de glicerol/g de amido seco. As soluções foram aquecidas a 90 °C por 30 min. Em seguida, 20 g de cada solução filmogênica foram espalhadas em placas de acrílico e secas em estufa com circulação de ar a 35 °C por 16 h. Antes das avaliações, os filmes foram acondicionados por 4 dias a 25 °C

± 3 °C com umidade relativa de $55 \pm 3\%$ controlada usando solução saturada de nitrato de magnésio.

Os filmes de amido de feijão foram preparados pelo método descrito por Biduski et al. (2017), com algumas modificações. As soluções foram preparadas com a seguinte proporção: 3,0 g amido: 0,3 g de glicerol: 100 mL de água destilada e agitadas a 300 rpm durante 10 min a 90 °C usando um banho termostatizado (Quimis, Q214M2). Por fim, 20 g da solução filmogênica foram espalhados em placas de acrílico e secos em estufa com circulação de ar forçada (Ethik, Brasil) por 20 h a 30 °C. Antes da caracterização, os filmes foram condicionados por 4 dias em um dessecador a 25 ± 3 °C com umidade relativa de $50 \pm 3\%$ controlada usando uma solução saturada de nitrato de magnésio.

3.2.6 Caracterização das fibras ultrafinas

3.2.6.1 Desenvolvimento das fibras ultrafinas via *electrospinning*

Testes preliminares foram realizados fixando-se a concentração do PLA em 8% e da lignina em 2,5%, pelo fato deste conjunto ter apresentado maior potencial antioxidante no capítulo 1 deste trabalho. Com este parâmetro fixado, variou-se as concentrações de OEPR no capítulo 2 em 10, 20 e 30% e novamente as fibras foram submetidas à verificação da atividade antioxidante, indicando a concentração de 30% como a melhor. Por isso optou-se por utilizar as fibras ultrafinas compostas por 8% de PLA, 2,5% de lignina e 30% de OEPR para serem depositadas sobre os filmes de amido. Os parâmetros utilizados durante processamento do *electrospinning* foram os mesmos aplicados nos estudos anteriores, conforme capítulo 1, item 1.2.4.

3.2.6.2 Viscosidade aparente e condutividade elétrica da solução polimérica

De acordo com o capítulo 1, item 1.2.3.

3.2.6.3 Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas

De acordo com o capítulo 1, item 1.2.5.

3.2.6.4 Propriedades térmicas

De acordo com o capítulo 1, item 1.2.6.

3.2.6.5 Caracterização química por FTIR-ATR

De acordo com o capítulo 1, item 1.2.7.

3.2.6.6 Ângulo de contato

De acordo com o capítulo 1, item 1.2.8.

3.2.6.7 Atividade antioxidante por DPPH e ABTS

De acordo com o capítulo 1, item 1.2.9.

3.2.7 Caracterização da estrutura bicamada

3.2.7.1 Elaboração da bicamada

Após a produção dos filmes de amido de trigo e feijão, estes foram devidamente identificados e pesados para saber qual a quantidade de fibras foi depositada em cada um. Em seguida, foram colocados no alvo coletor das fibras, de acordo com a Figura 16. O tempo decorrente da coleta para cada conjunto de quatro filmes foi de 6 h.

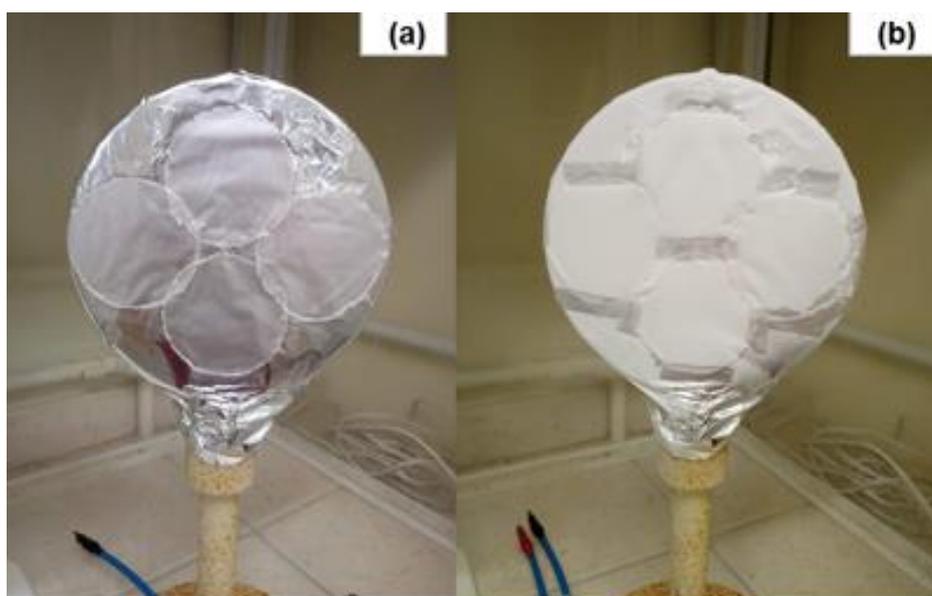


Figura 16 - Filmes de amido de trigo dispostos no coletor de alumínio antes da sobreposição das fibras (a) e filmes de amido de trigo com as finas ultrafinas sobrepostas (b)

Os tratamentos avaliados neste estudo tiveram a seguinte identificação: FAT (filme de amido de trigo), FAT + PLA (filme de amido de trigo com fibras de PLA), FAT + PLA/lig/OEPR (filme de amido de trigo com fibras de PLA, lignina e óleo essencial nas concentrações citadas acima), FAF (filme de amido de feijão), FAF + PLA (filme de amido de feijão com fibras de PLA) e FAF + PLA/lig/OEPR (filme de amido de feijão com fibras de PLA, lignina e óleo essencial nas concentrações citadas acima).

3.2.7.2 Morfologia

A morfologia da superfície e da seção transversal dos filmes bicamada foi visualizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL, JSM-6610LV, New Jersey, EUA) com tensão de aceleração de 10 kV, de acordo com Halal et al. (2017). Para as seções transversais, as amostras foram fraturadas sob nitrogênio líquido antes da visualização. Em seguida, as amostras foram então colocadas em um *stub* e revestidas com ouro usando um *sputter* Desk V (JEOL, New Jersey, EUA) e avaliadas com aumento de 50 e 500 vezes.

3.2.7.3 Propriedades ópticas

A cor e a opacidade dos filmes bicamadas foram determinadas em colorímetro (MINOLTA, CR 400, Japão), acoplado a processador DP-100, com iluminante D65 e ângulo de 10°. Foi utilizado sistema de avaliação CIEL*a*b (Comissão Internacional de Iluminação), com parâmetros de cor: L*, a*, e b*, onde L* corresponde à luminosidade (0=preto e 100 = branco); a* e b* são coordenadas de cromaticidade: a* corresponde à variação de cor de verde (-60) a vermelho (+60); b*corresponde à variação de cor de azul (-60) a amarelo (+60).

3.2.7.4 Umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA)

O teor de umidade dos filmes bicamadas foi determinado medindo-se a perda de peso do filme, após secagem em estufa a 105 °C até o peso ser constante. Os resultados foram expressos como uma porcentagem do teor de umidade das amostras (AACC, 1995).

A solubilidade em água dos filmes bicamadas foi calculada como a porcentagem de matéria seca do solubilizado no filme após imersão por 24 h em água

a 25 °C, conforme Equação 2, de acordo com o método descrito por Gontard et al. (1994).

$$MS (\%) = \frac{[(massa\ inicial - massa\ final) \times 100]}{massa\ inicial (g)} \quad \text{Eq. (2)}$$

Os testes de permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes bicamadas foram realizados seguindo método padrão ASTM E96-95 (ASTM, 1995). Cada amostra foi colocada e selada na abertura circular de uma célula de permeação contendo cloreto de cálcio anidro (0% UR). As células foram condicionadas em dessecadores com uma solução saturada de cloreto de sódio (75% de UR) a 25 °C até as amostras atingirem as condições de estado estacionário. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada através da Equação 3.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t} \times \frac{X}{A \Delta P} \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde:

PVA= Permeabilidade ao vapor de água (g.mm/kPa.dia.m²);

ΔW = Ganho de massa (g);

X= espessura do filme (mm);

t= tempo (dias);

A= Área exposta (m²);

ΔP = Diferença de pressão parcial (kPa).

3.2.7.5 Propriedades mecânicas

A espessura do filme foi determinada por um micrômetro com aproximação de 0,001 mm, em 8 posições aleatórias ao redor do filme, onde taxas médias foram usadas nos cálculos.

A resistência à tração, calculada pela Equação 4 e a porcentagem de alongamento na ruptura dos filmes, calculada pela equação 5, foram avaliadas por um ensaio de tração utilizando um Analisador de Textura (TA.XTplus, Stable Micro Systems) baseado no método ASTM D882-91 (1995).

$$RT = \frac{Fm}{A} \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde:

RT: resistência à tração (Mpa);

F_m: força máxima no momento da ruptura do filme (N);

A: área da secção transversal (m²).

$$E = \frac{dr}{di} \quad \text{Eq. (5)}$$

E = Elongação (%);

d_i = distância inicial de separação (cm);

d_r = distância no momento da ruptura (cm)

3.2.8 Análise estatística

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

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Características da solução polimérica e das fibras ultrafinas

A condutividade elétrica e a viscosidade aparente da solução polimérica contendo PLA/2,5%lig/30%OEPR foi de $0,44 \pm 0,02 \mu\text{S/cm}$ e $70,5 \pm 0,5 \text{ mPa/s}$, respectivamente. Comparado aos resultados dos capítulos anteriores, verificou-se que a mistura dos três componentes propiciou a redução da condutividade em relação ao tratamento com PLA/2,5%lig, que apresentou $0,87 \mu\text{S/cm}$. Em contrapartida, propiciou um aumento na condutividade em relação ao tratamento com PLA/30%OEPR, que teve $0,28 \mu\text{S/cm}$. De forma análoga, a viscosidade sofreu uma diminuição em relação ao tratamento com PLA/2,5%lig, que teve valor de 130 mPa/s . Entretanto, o tratamento com PLA/30%OEPR apresentou menor viscosidade, de 60 mPa/s . Com isso, este resultado indicou uma menor capacidade de eletrofiação em relação aos capítulos anteriores.

A morfologia das fibras está ilustrada na Figura 17 e apresentou-se semelhante às desenvolvidas nos capítulos anteriores, com alguns *beads* e diâmetro médio de 136 nm , sendo mais fina que as fibras ultrafinas produzidas nos estudos antecedentes nos tratamentos com PLA/2,5%lig, com 587 nm , e PLA/30%OEPR, com 167 nm .

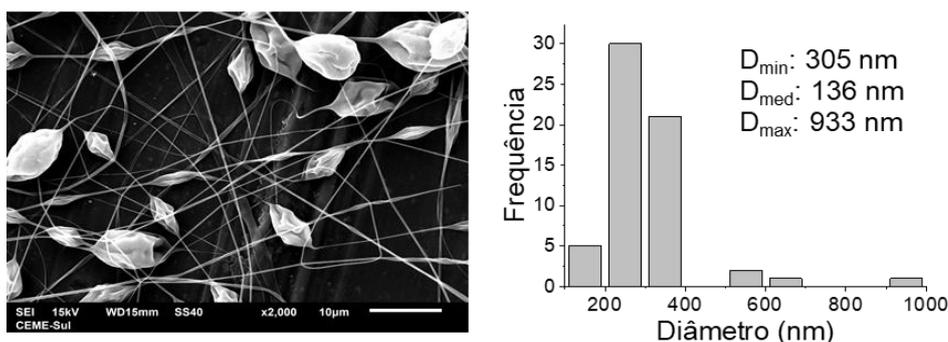


Figura 17 - Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas de PLA/lig/OEPR.

Segundo Jian et al. (2018), os diâmetros das fibras eletrofiadas podem ser ajustados alterando as concentrações dos polímeros utilizados. Neste estudo, a união dos três componentes influenciou na redução do diâmetro médio das fibras. Observou-se a formação de gotas, provenientes da própria solução polimérica, provavelmente devido a possíveis alterações nas condições ambientais relacionadas ao local onde o equipamento estava no momento da coleta.

Por meio da análise de FTIR foi possível observar as mesmas bandas presentes nos estudos dos capítulos anteriores, pronunciadas em 750 cm^{-1} , característica do PLA, 1500 cm^{-1} , referente à presença de lignina e 2943 cm^{-1} , comprovando a presença do OEPR. Quanto à estabilidade térmica, a Tabela 6 indica três picos de perda de massa, sendo o maior detectado com temperatura em torno de 368 °C e perda de 48,6%, fato que indica uma boa resistência térmica.

Tabela 6 - Perfis de temperatura e perda de massa da membrana de fibras ultrafinas de PLA/lig/OEPR avaliadas por TGA, com três estágios de decomposição.

TDi (°C)	TDf (°C)	T (°C)	Perda de massa (%)
118,6	171,5	148,4	17,3
207,6	254,5	231,4	8,1
320,2	393	368,3	48,6

TDi = Temperatura de decomposição inicial; TDf = Temperatura de decomposição final; T = temperatura onde ocorreu a maior perda de massa.

A molhabilidade mostrou comportamento similar aos estudos anteriores, indicando ângulo de contato de $103,4 \pm 0,4^\circ$, ligeiramente maior que o tratamento com PLA/2,5%lig, que teve $101,8 \pm 0,4^\circ$ e com o tratamento PLA/30%OEPR, com $101,5 \pm$

0,5°. Tal comportamento pode ser explicado pela natureza hidrofóbica dos materiais utilizados (RAMEZANI et al., 2018; REHMAN et al., 2020; SHARMA, 2021).

Por fim, o ensaio de atividade antioxidante demonstrou que as fibras contendo os três componentes tiveram inibição de $77,9 \pm 0,4$ e $77,3 \pm 0,4\%$, frente aos radicais DPPH e ABTS, respectivamente. O tratamento com PLA/2,5% de lignina indicou cerca de $70 \pm 0,6\%$ de capacidade inibitória também para ambos os radicais e não foi realizada a análise antioxidante para os tratamentos do capítulo dois, referentes a presença do OEPR. Ainda assim, pode-se constatar que tanto a lignina quanto o OEPR auxiliaram no aumento do potencial antioxidante das membranas de fibras ultrafinas formadas neste tratamento.

3.3.2 Características das estruturas bicamadas

De acordo com Fabra et al. (2013), a análise microestrutural de filmes multicamadas fornece informações sobre o arranjo dos diferentes componentes do filme e ajuda a entender o mecanismo de transporte de água e gás através dos filmes, bem como sua interação com a luz que determina propriedades ópticas. A massa média de fibras ultrafinas depositadas em cada filme, tanto de PLA quanto de PLA/lig/OEPR, foi de 0,61 g. A morfologia da superfície e da seção transversal dos filmes está indicada na Figura 18.

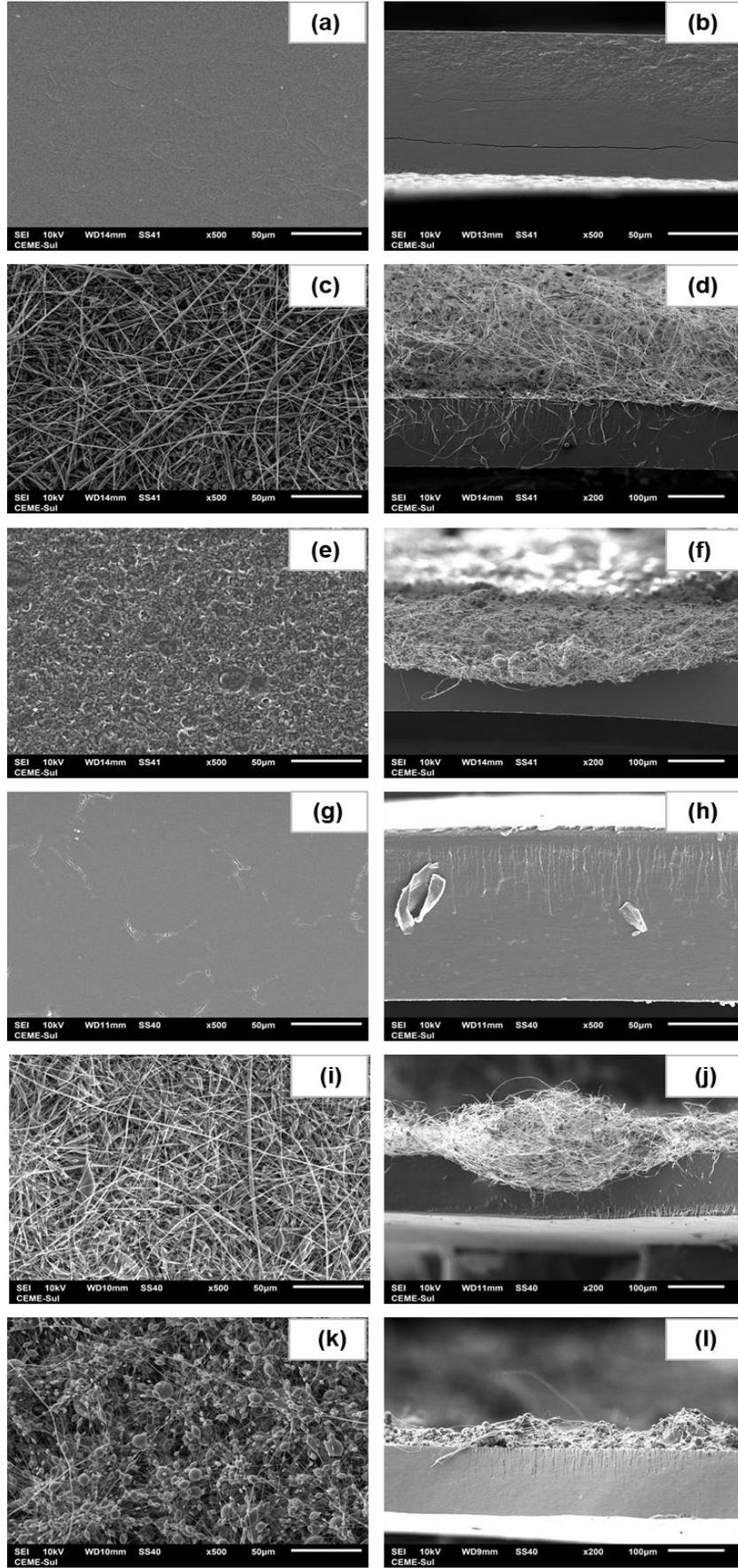


Figura 18 - Morfologia dos filmes bicamadas referentes a: superfícies dos tratamentos FAT (filme de amido de trigo), FAT + PLA (filme de amido de trigo e fibras de poli ácido láctico), FAT + PLA/lig/OEPR (filme de amido de trigo e fibras de poli ácido láctico, lignina e óleo essencial de pimenta rosa), FAF (filme de amido de feijão), FAF + PLA (filme de amido de feijão e fibras de poli ácido láctico), FAF + PLA/lignina/OEPR (filme de amido de feijão e fibras de poli ácido láctico, lignina e óleo essencial de pimenta rosa) - (a, c, e, g, i, k) e seção transversal dos tratamentos FAT, FAT + PLA, FAT + PLA/lignina/OEPR, FAF, FAF + PLA, FAF + PLA/lignina/OEPR (b, d, f, h, j, l).

A superfície do FAT e FAF apresentou algumas descontinuidades, mais destacadas na Figura g. A disposição das fibras depositadas sobre o filme foi aleatória e heterogênea, formando emaranhados, o que pode ser constatado na Figura 18d, 18f, 18j, 18l. As seções transversais dos filmes indicaram homogeneidade, exceto para FAT (Figura 18b), que indicou uma fissura. O maior diâmetro médio das fibras foi encontrado no tratamento com FAF + PLA, apresentando 316 nm e o menor, no tratamento de FAF + PLA/lig/OEPR, com 297 nm, conforme indicado na Tabela 7. Estes resultados apontam fibras ultrafinas de menor diâmetro comparado aos estudos dos capítulos anteriores. Ressalta-se que embora tenham sido utilizadas as mesmas condições de processo de eletrofiação em todos os tratamentos, foi observada uma maior quantidade de *beads* na superfície do FAF + PLA/lig/OEPR (Figura 18k).

Tabela 7 - Diâmetros das fibras ultrafinas depositadas na superfície dos filmes bicamadas.

Tratamento	Diâmetro mínimo (nm)	Diâmetro médio (nm)	Diâmetro máximo (nm)
FAT + PLA	71	303	784
FAT + PLA/lig/OEPR	-	-	-
FAF + PLA	66	316	751
FAF + PLA/lig/OEPR	59	297	722

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. FAT + PLA= Filme de amido de trigo com fibras ultrafinas de PLA; FAT + PLA/lig/OEPR= Filme de amido de trigo com fibras ultrafinas de PLA, lignina e OEPR; FAF + PLA = Filme de amido de feijão com fibras ultrafinas de PLA e FAF + PLA/lig/OEPR= Filme de amido de feijão com fibras ultrafinas de PLA, lignina e OEPR.

Neppalli et al. (2010) relataram que a presença de fibras com diâmetro muito pequeno, típico de produtos eletrofiados, favoreceram uma boa adesão interfacial entre a matriz, que seria o filme, e as fibras depositadas sobre ele. Estes autores observaram que as fibras com diâmetro maior (cerca de 800 nm) mostraram uma interface muito mais pobre em adesão nos filmes compostos preparados com policaprolactona e fibras de náilon. Portanto, eles concluíram que a real vantagem de usar a eletrofiação para a fabricação de fibras de reforço, foi a possibilidade de produzir, na estrutura, um subconjunto de fibras com um diâmetro muito fino, que foram capazes de interagir de forma muito eficiente com a matriz em que foram dispersas.

As propriedades ópticas dos filmes são relevantes para embalagens, pois influenciam, principalmente, na apresentação do produto embalado e estão relacionadas à cor, brilho e transparência (BERTUZZI et al., 2007). A opacidade de um filme é um indicador da quantidade de luz que o atravessa e quanto maior o valor de opacidade, menor será a quantidade de luz que atravessa o filme podendo esta barreira ser importante para controlar a incidência de luz nos produtos alimentares (REICHERT et al., 2020).

Visualmente, observou-se que o FAF apresentou uma transparência maior em comparação ao FAT, que indicou maior opacidade, resultados diferentes significativamente e confirmados através da Tabela 8. Fakhouri et al. (2007) desenvolveram filmes e coberturas à base de amidos nativos para aplicação em uvas Crimson, constatando aproximadamente 11,5% de umidade. Em estudo realizado por Evangelho et al. (2021), foi verificado que o filme de amido de feijão carioca nativo indicou cerca de 8,5% de opacidade. Com isso, vemos que a opacidade pode variar em função do teor de amilose dos amidos, pois suas moléculas em solução, devido à linearidade, tendem a orientar-se paralelamente, aproximando-se o suficiente para se formarem pontes de hidrogênio entre hidroxilas de cadeias adjacentes. Como resultado, a afinidade do polímero por água é reduzida, favorecendo a formação de pastas opacas e filmes resistentes (THAKUR et al., 2019).

Tabela 8 - Propriedades ópticas dos filmes bicamadas.

Tratamento	Propriedades ópticas			Opacidade (%)
	L	a*	b*	
FAT	89,78 ± 0,5 ^a	+1,44 ± 0,01 ^a	-1,46 ± 0,03 ^b	13,4 ± 0,2 ^e
FAT + PLA	89,58 ± 1,2 ^a	+0,94 ± 0,07 ^b	-0,94 ± 0,07 ^c	67,5 ± 0,6 ^c
FAT + PLA/lig/OEPR	86,58 ± 0,2 ^b	+0,65 ± 0,06 ^c	+9,01 ± 0,10 ^a	71,3 ± 0,4 ^a
FAF	90,46 ± 0,1 ^a	+1,50 ± 0,03 ^a	-0,50 ± 0,05 ^d	10,1 ± 0,1 ^f
FAF + PLA	90,28 ± 0,4 ^a	+0,86 ± 0,03 ^b	+0,84 ± 0,05 ^c	64,8 ± 0,9 ^d
FAF + PLA/lig/OEPR	86,78 ± 0,1 ^b	+0,06 ± 0,02 ^d	+8,89 ± 0,16 ^a	68,6 ± 0,3 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. FAT= Filme de amido de trigo FAT + PLA= Filme de amido de trigo com fibras ultrafinas de PLA; FAT + PLA/lig/OEPR= Filme de amido de trigo com fibras ultrafinas de PLA, lignina e OEPR; FAF = Filme de amido de trigo; FAF + PLA = Filme de amido de feijão com fibras ultrafinas de PLA e FAF + PLA/lig/OEPR= Filme de amido de feijão com fibras ultrafinas de PLA, lignina e OEPR.

Segundo Fabra et al. (2013), a transparência dos filmes está diretamente relacionada com a superfície e estrutura interna do material. Dependendo da aplicação, é importante que os filmes apresentem baixa opacidade, ou seja, maior transparência para visualização do produto na embalagem (ZAVAREZE et al., 2012). Como a deposição das fibras sobre os filmes de amido proporcionaram uma maior barreira, observou-se que a opacidade das bicamadas contendo as fibras tanto de PLA quanto de PLA/lig/OEPR apresentaram maior valor. Com isso, as bicamadas desenvolvidas com PLA/lig/OEPR podem ser uma boa alternativa para serem aplicadas na preservação de alimentos suscetíveis à deterioração pela luz, bem como oxidação lipídica e degradação de pigmentos naturais.

O parâmetro de luminosidade apresentou valor médio de 90, exceto para os tratamentos FAT + PLA/lig/OEPR e FAF + PLA/lig/OEPR, que mostraram valor médio de 86. Embora tenham ocorrido diferenças significativas, o aspecto visual foi bem semelhante entre os tratamentos. Os valores de croma b* dos filmes bicamada contendo lignina foram significativamente maiores em relação aos outros, apresentando coloração mais amarelada, fato também comprovado visualmente. Os valores do croma a* próximos de zero mostram que os filmes não tenderam às cores verde e vermelha.

A resistência à tração é a máxima tensão suportada pelo filme até o momento da sua ruptura. Neste parâmetro, as bicamadas de FAF tanto com PLA quanto com

PLA/lig/OEPR apresentaram maior resistência à tração quando comparadas as bicamadas de FAT, conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Propriedades mecânicas dos filmes bicamadas.

Tratamento	Resistência à tração (MPa)	Elongação (%)
FAT	3,3 ± 1,0 ^c	49,5 ± 1,4 ^b
FAT + PLA	3,4 ± 1,1 ^{bc}	76,0 ± 1,2 ^a
FAT + PLA/lig/OEPR	1,7 ± 0,2 ^c	34,0 ± 1,4 ^d
FAF	5,9 ± 1,4 ^{ab}	49,1 ± 0,8 ^b
FAF + PLA	4,3 ± 0,2 ^{abc}	44,7 ± 1,5 ^c
FAF + PLA/lig/OEPR	6,7 ± 0,1 ^a	44,9 ± 0,8 ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. FAT= Filme de amido de trigo FAT + PLA= Filme de amido de trigo com fibras ultrafinas de PLA; FAT + PLA/lig/OEPR= Filme de amido de trigo com fibras ultrafinas de PLA, lignina e OEPR; FAF = Filme de amido de trigo; FAF + PLA = Filme de amido de feijão com fibras ultrafinas de PLA e FAF + PLA/lig/OEPR= Filme de amido de feijão com fibras ultrafinas de PLA, lignina e OEPR.

Suh et al. (2020) compararam as características de filmes de amidos nativos extraídos de feijão, batata, mandioca e castanha, verificando resistência à tração maior no filme de amido de feijão, com valor de aproximadamente 4 MPa. Lima et al. (2017) constataram que o filme de amido de feijão mostrou resistência à tração de 3,5 MPa e após adição de 40% de tetrahidrossilicato (TEOS), esse valor subiu para 6,6 MPa. Por outro lado, Baranzelli et al. (2019) avaliaram filmes com amido de trigo germinado e verificaram que o filme de amido nativo, sem germinação, teve 1,5 MPa de resistência à tração. Ainda, Bruni et al. (2020) produziram filmes biocompósitos de amido de trigo adicionados de nanocristais de celulose provenientes de arroz, aveia e casca de eucalipto, verificando que o filme de amido de trigo nativo teve 2,6 MPa de resistência à tração. Dessa forma, observou-se que geralmente, os filmes de amido de trigo possuem menor resistência à tração. Com isso, o filme bicamada contendo amido de feijão, lignina e OEPR, pelo fato de ser mais denso e robusto, seria uma boa alternativa para ser aplicado em embalagens que necessitam de maior resistência mecânica.

Em outro aspecto, a maior porcentagem de alongação foi observada no tratamento com FAT+PLA, indicando 76%. FAT e FAF nativos não apresentaram

diferença significativa, ambos com cerca de 49%. Wilfer et al. (2021) avaliaram o efeito do tipo de amido nas propriedades de filmes comestíveis, verificando que o filme de amido de trigo apresentou 10% de alongação, menor taxa frente a outras fontes de amido, como arroz, milho e batata. Em contrapartida, Song et al. (2018) investigaram sobre o efeito da adição de óleo essencial de orégano em filmes de amido de trigo, constatando que o filme de amido nativo teve 30% de alongação. A presença das fibras ultrafinas em FAT e FAF parece ter reduzido o potencial de alongação, talvez por formarem uma membrana muito fina. Além disso, o PLA é um polímero que tem baixas propriedades de alongamento (EL-HADI, 2017), o que pode ter contribuído para essa redução da taxa de alongação. O tratamento com FAF+PLA/lig/OEPR apresentou cerca de 45% de alongação frente a 34% de alongação do tratamento com FAT+PLA/lig/OEPR, diferindo estatisticamente. Esse resultado indica que o tratamento com FAF+PLA/lig/OEPR proporcionou uma estrutura mais flexível e elástica que pode se moldar ao produto embalado e pode facilitar o manuseio no cotidiano, podendo ser aplicada por exemplo em embalagens de frios fatiados, como salame, queijos e presunto.

As características quanto à espessura, umidade, solubilidade em água e PVA estão apresentadas na Tabela 10. A espessura dos filmes é um parâmetro importante, pois afeta diretamente as propriedades de barreira. As bicamadas que continham as fibras se mostraram mais espessas em relação ao FAT e FAF, justamente pelo fato de possuírem uma maior porcentagem de massa sobre elas.

Quanto à umidade, menores valores foram constatadas nos FAF, com cerca de 18% em comparação ao conjunto de FAT, com cerca de 26%. Luchese et al., (2018) avaliaram o impacto da fonte de amido nas propriedades físico-químicas e biodegradabilidade de diferentes filmes, encontrando valores entre 19 e 24% de umidade nos filmes de amido de trigo com diferentes tratamentos. Em outra pesquisa, Fang et al. (2020) verificaram 15% umidade em filmes de amido de feijão. No presente estudo, notou-se que a adição das fibras não ocasionou diferença significativa dentro do conjunto de tratamentos apenas com FAT, nem do conjunto de tratamento apenas com FAF.

Tabela 10 - Parâmetros de espessura, umidade, solubilidade em água e PVA dos filmes.

Tratamento	Espessura (mm)	Umidade (%)	Solubilidade em água (%)	PVA (g.mm/m ² dia kPa)
FAT	0,134 ± 0,002 ^e	26,4 ± 1,2 ^a	31,5 ± 0,9 ^a	2,6 ± 0,4 ^{abc}
FAT+PLA	0,144 ± 0,001 ^d	27,1 ± 0,3 ^a	29,5 ± 0,6 ^{ab}	2,3 ± 0,2 ^{bc}
FAT+PLA/lig/OEPR	0,174 ± 0,002 ^a	25,0 ± 0,2 ^a	27,3 ± 0,6 ^b	1,9 ± 0,2 ^c
FAF	0,156 ± 0,004 ^c	18,8 ± 0,6 ^b	18,1 ± 1,0 ^c	3,5 ± 0,3 ^a
FAF+PLA	0,165 ± 0,004 ^b	17,4 ± 0,6 ^b	15,7 ± 0,6 ^c	3,2 ± 0,3 ^{ab}
FAF+PLA/lig/OEPR	0,172 ± 0,002 ^a	18,1 ± 0,5 ^b	16,0 ± 0,4 ^c	2,1 ± 0,3 ^{bc}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. FAT= Filme de amido de trigo; FAT + PLA= Filme de amido de trigo com fibras ultrafinas de PLA; FAT + PLA/lig/OEPR= Filme de amido de trigo com fibras ultrafinas de PLA, lignina e OEPR; FAF = Filme de amido de trigo; FAF + PLA = Filme de amido de feijão com fibras ultrafinas de PLA e FAF + PLA/lig/OEPR= Filme de amido de feijão com fibras ultrafinas de PLA, lignina e OEPR.

A solubilidade em água é uma propriedade importante dos filmes à base de amido. As aplicações potenciais podem exigir insolubilidade na água para aumentar a integridade do produto e a resistência à água. No entanto, em outros casos, a solubilidade do filme em água antes do consumo do produto pode ser útil, como no encapsulamento de alimentos ou aditivos (BERTUZZI et al., 2007). Neste estudo, composições com FAT indicaram maior solubilidade em água, por volta de 30% quando comparado às composições com FAF, que apresentaram aproximadamente 16%, diferindo estatisticamente. Com este resultado, sugere-se que a combinação com FAT+PLA/lig/OEPR pode ser uma boa alternativa para embalagens alimentares de produtos com menor teor de água na sua composição, como arroz, feijão e macarrão.

Segundo Domene-López et al. (2019), a solubilidade tem uma ligação direta com os componentes estruturais do filme e interfere na propriedade de PVA. A obtenção de filmes com boas propriedades de PVA, isto é, com baixa permeabilidade dentro de uma grande faixa de umidade relativa, implica na utilização de material insolúvel ou de pouca solubilidade em água, mas isto não desqualifica o filme, que dependerá do produto a ser aplicado. Na Tabela 10, podemos observar que o PVA diminuiu na presença das fibras de PLA e de PLA/lig/OEPR, tanto para FAT como

para FAF, provavelmente porque ambos os materiais componentes das fibras possuem caráter hidrofóbico, atuando como uma barreira ao vapor de água. De acordo com Debeaufort et al. (1998), filmes com baixa PVA podem ser indicados para embalagem de alimentos com alta umidade, para evitar a desidratação da superfície, perda de peso, alterações físicas, químicas e organolépticas como em vegetais, carnes e queijos.

3.4 Conclusão

A partir de resultados prévios, foram desenvolvidas fibras ultrafinas com 8% de PLA, 2,5% de lignina e 30% de OEPR. A estrutura química das fibras indicou bandas características dos componentes, indicando a real incorporação dos mesmos. Ainda, apresentaram boa resistência térmica, visto que a maior perda de massa encontrada, de 48,6%, se deu em 368,3 °C. Além disso, indicaram caráter hidrofóbico, com ângulo de 103° e alta atividade antioxidante, com 77,9 e 77,3% de inibição frente aos radicais DPPH e ABTS, respectivamente.

Os filmes bicamada dos tratamentos com a adição de fibras ultrafinas de PLA e PLA/lig/OEPR mostraram através da análise morfológica, superfície rica em fibras, distribuídas heterogênea e aleatoriamente. Os diâmetros médios das fibras depositadas na superfície dos filmes de amido ficaram entre 297 e 303 nm. O filme bicamada do tratamento FAT+PLA/lig/OEPR apresentou maior opacidade, com 71%, sendo indicado para embalar alimentos sensíveis a exposição da luz tanto natural como artificial.

Por outro lado, o tratamento com FAF+PLA/lig/OEPR demonstrou ser uma estrutura mais rígida, com resistência à tração de 6,7 MPa, servindo para embalagens que devem fornecer maior proteção ao produto. Além disso, indicou maior alongação em relação ao tratamento com FAT+PLA/lig/OEPR, com aproximadamente 45%. Ainda, também apresentou menor teor de umidade, com 15%, e menor solubilidade em água, com 16%, indicando afinidade para formar embalagens que envolvam alimentos com alto teor de água. Em relação a PVA, o tratamento com FAF+PLA/lig/OEPR não diferiu estatisticamente do tratamento FAT+PLA/lig/OEPR, com aproximadamente 2,0 g.mm/m²dia.kPa. Logo, ambos os tratamentos são promissores para aplicação em embalagens alimentares, pois o conjunto de polímeros e compostos bioativos utilizados neste estudo mostraram resultados potenciais na preservação de alimentos.

Considerações Finais

Foram produzidas fibras ultrafinas de PLA, PLA/lignina, PLA/OEPR, PLA/lignina/OEPR e dentre elas, a que foi julgada com maior potencial de preservação de alimentos, foi aplicada sobre filmes de amido de trigo e feijão, formando uma estrutura bicamada que servirá de base para futuras embalagens alimentares.

No primeiro capítulo, caracterizou-se as fibras ultrafinas de PLA/lignina, onde foi verificado que a lignina foi a maior responsável pela atividade antioxidante. No segundo capítulo, reconheceu-se principalmente o efeito antimicrobiano do OEPR incorporado às fibras ultrafinas de PLA e no terceiro capítulo, demonstrou-se a união dos dois estudos anteriores ao desenvolvimento de filmes bicamada, tendo como base filmes biodegradáveis de amido.

O estudo geral apresentado nesta tese diz respeito à busca e mistura de diferentes compostos bioativos e biopolímeros para desenvolver novas estruturas de embalagens alimentares. Estes resultados foram apenas o princípio de uma gama de investigações que ainda são necessárias para aprimorar a tecnologia de filmes que apresentem mais de uma camada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC - AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the american association of cereal chemists**. 9^a ed. St. Paul, v. 1 e 2, 1995.

AADIL, K. R., BARAPATRE, A., SAHU, S., JHA, H., & TIWARY, B. N. Free radical scavenging activity and reducing power of Acacia nilotica wood lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 220-227, 2014.

AADIL, K. R., MUSSATTO, S. I., & JHA, H. Synthesis and characterization of silver nanoparticles loaded poly (vinyl alcohol)-lignin electrospun nanofibers and their antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 763-767, 2018.

AGO, M., OKAJIMA, K., JAKES, J. E., PARK, S., & ROJAS, O. J. Lignin-based electrospun nanofibers reinforced with cellulose nanocrystals. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 3, p. 918-926, 2012.

AHMED, F. E., LALIA, B. S., & HASHAIKEH, R. A review on electrospinning for membrane fabrication: challenges and applications. **Desalination**, v. 356, p. 15-30, 2015.

ALHARBI, H. F., LUQMAN, M., FOUAD, H., KHALIL, K. A., & ALHARTHI, N H. Viscoelastic behavior of core-shell structured nanofibers of PLA and PVA produced by coaxial electrospinning. **Polymer Testing**, v. 67, p. 136-143, 2018.

ALTAN, A.; AYTAC, Z.; UYAR, T. Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly (lactic acid) for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 48-59, 2018.

ANTUNES, M. D., DA SILVA DANNENBERG, G., FIORENTINI, Â. M., PINTO, V. Z., LIM, L. T., DA ROSA ZAVAREZE, E., & 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.

APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4^a ed, p.25-36, 2001.

ARRIETA, M. P., FORTUNATI, E., DOMINICI, F., RAYÓN, E., LÓPEZ, J., & KENNY, J. M. PLA-PHB/cellulose based films: Mechanical, barrier and disintegration properties. **Polymer Degradation and Stability**, v. 107, p. 139-149, 2014.

ASTM. Standard test methods of water vapor trans- mission of materials. In: **Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, E 96-95, 1995.

ASTM. Tensile properties of thin plastic sheeting. In: **Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, D 882, 1995.

BARANZELLI, J., KRINGEL, D. H., MALLMANN, J. F., BOCK, E., MELLO EL HALAL, S. L., PRIETTO, L., ... & RENATO GUERRA DIAS, A. Impact of wheat (*Triticum aestivum* L.) germination process on starch properties for application in films. **Starch-Stärke**, v. 71, n. 7, p. 1800262, 2019.

BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., CLEMENTE, A. D., PAULA, V. F. D., & ISMAIL, F. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.

BECK, R. J., ZHAO, Y., FONG, H., & MENKHAUS, T. J. Electrospun lignin carbon nanofiber membranes with large pores for highly efficient adsorptive water treatment applications. **Journal of Water Process Engineering**, v. 16, p. 240-248, 2017.

BENTO, J. A. C., LANNA, A. C., BASSINELLO, P. Z., OOMAH, B. D., PIMENTA, M. E. B., CARVALHO, R. N., & MOREIRA, A. S. Aging indicators for stored carioca beans. **Food Research International**, v. 134, p. 109249, 2020.

BERTUZZI, M. A.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J. C. Physicochemical characterization of starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 17-25, 2007.

BHARDWAJ, N., & KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325-347, 2010.

BHAT, R., KHALIL, H. P. S. A., & KARIM, A. A. Exploring the antioxidant potential of lignin isolated from black liquor of oil palm waste. **Comptes Rendus Biologies**, v. 332, n. 9, p. 827-831, 2009.

BHUSHANI, J. A; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospaying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 1, p. 21-33, 2014.

BIDUSKI, B., DA SILVA, F. T., DA SILVA, W. M., EL HALAL, S. L. D. M., PINTO, V. Z., DIAS, A. R. G., & DA ROSA ZAVAREZE, E. Impact of acid and oxidative modifications, single or dual, of sorghum starch on biodegradable films. **Food Chemistry**, v. 214, p. 53-60, 2017.

BONILLA, J., ATARÉS, L., VARGAS, M., & CHIRALT, A. Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 303-312, 2013.

BORRELLE, S. B., RINGMA, J., LAW, K. L., MONNAHAN, C. C., LEBRETON, L., MCGIVERN, A., ... & ROCHMAN, C. M. Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution. **Science**, v. 369, n. 6510, p. 1515-1518, 2020.

BOUGHENDJIOUA, H., & DJEDDI, S. Fourier transformed infrared spectroscopy analysis of constituents of lemon essential oils from Algeria. **Am. J. Opt. Photonics**, v. 5, p. 30-5, 2017.

BOURGIN, PBAULP; CORMEAU, IBACI; SAINT-MATIN, TBAULP. A first step towards the modelling of the thermoforming of plastic sheets. **Journal of materials processing technology**, v. 54, n. 1, p. 1-11, 1995.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRUNI, G. P., DE OLIVEIRA, J. P., EL HALAL, S. L. M., FLORES, W. H., GUNDEL, A., DE MIRANDA, M. Z., ... & DA ROSA ZAVAREZE, E. Phosphorylated and cross-linked wheat starches in the presence of polyethylene oxide and their application in biocomposite films. **Starch-Stärke**, v. 70, n. 7-8, p. 1700192, 2018.

BRUNI, G. P., DE OLIVEIRA, J. P., GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G., FABRA, M. J., MARTINS, V. G., DA ROSA ZAVAREZE, E., & LÓPEZ-RUBIO, A. Electrospun β -carotene-loaded SPI: PVA fiber mats produced by emulsion-electrospinning as bioactive coatings for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, p. 100-426, 2020.

BRUNI, G. P., DE OLIVEIRA, J. P., FONSECA, L. M., DA SILVA, F. T., DIAS, A. R. G., & DA ROSA ZAVAREZE, E. Biocomposite films based on phosphorylated wheat starch and cellulose nanocrystals from rice, oat, and eucalyptus husks. **Starch-Stärke**, v. 72, n. 3, p. 1900051, 2020.

CALEJA, C., BARROS, L., ANTONIO, A. L., OLIVEIRA, M. B. P., & FERREIRA, I. C. A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. **Food chemistry**, v. 216, p. 342-346, 2017.

CARPENA, M., NUÑEZ-ESTEVEZ, B., SORIA-LOPEZ, A., GARCIA-OLIVEIRA, P., & PRIETO, M. A. Essential Oils and Their Application on Active Packaging Systems: A Review. **Resources**, v. 10, n. 1, p. 7, 2021

CERQUEIRA, M. A., FABRA, M. J., CASTRO-MAYORGA, J. L., BOURBON, A. I., PASTRANA, L. M., VICENTE, A. A., & LAGARON, J. M. Use of electrospinning to develop antimicrobial biodegradable multilayer systems: Encapsulation of cinnamaldehyde and their physicochemical characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 11, p. 1874-1884, 2016.

CHERPINSKI, A., TORRES-GINER, S., CABEDO, L., MÉNDEZ, J. A., & LAGARON, J. M. Multilayer structures based on annealed electrospun biopolymer coatings of interest in water and aroma barrier fiber-based food packaging applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 24, p. 45-50, 2018.

CLSI. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**, v. 35, n. 1, 2015a.

CLSI. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**, v.35, n.2, 2015b.

COLLINS, M. N., NECHIFOR, M., TANASĂ, F., ZĂNOAGĂ, M., MCLOUGHLIN, A., STRÓŻYK, M. A., ... & TEACĂ, C. A. Valorization of lignin in polymer and composite systems for advanced engineering applications—a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 828-849, 2019.

DAI, L.; ZHANG, J.; CHENG, F. Effects of starches from different botanical sources and modification methods on physicochemical properties of starch-based edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 897-905, 2019

DALLMEYER, I., KO, F., & KADLA, J. F. Electrospinning of technical lignins for the production of fibrous networks. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 30, n. 4, p. 315-329, 2010.

DALTON, N., LYNCH, R. P., COLLINS, M. N., & CULEBRAS, M. Thermoelectric properties of electrospun carbon nanofibres derived from lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 472-479, 2019.

DANNENBERG, G. S., FUNCK., CRUXEN, C. E. S., MARQUES, J. L., SILVA, W. P., 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.

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

DANNENBERG, G. S., FUNCK, G. D., SILVA, W. P., & FIORENTINI, A. M. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, v. 95, p. 115-120, 2019.

DEBEAUFORT, F., QUEZADA-GALLO, J. A., & VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, n. 4, p. 299-313, 1998.

DEITZEL, J. M., KLEINMEYER, J., HARRIS, D. E. A., & TAN, N. B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, n. 1, p. 261-272, 2001.

DENG, L., KANG, X., LIU, Y., FENG, F., & ZHANG, H. Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 324-332, 2018.

DHIFI, W., BELLILI, S., JAZI, S., BAHLOUL, N., & MNIF, W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DOMENE-LÓPEZ, D., DELGADO-MARÍN, J. J., MARTIN-GULLON, I., GARCÍA-QUESADA, J. C., & MONTALBÁN, M. G. Comparative study on properties of starch films obtained from potato, corn and wheat using 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate as plasticizer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 845-854, 2019.

DONG, X., DONG, M., LU, Y., TURLEY, A., JIN, T., & WU, C. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1629-1634, 2011.

DOURADO, M. T. **Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi): propriedades químicas e biológicas**. 2012. 120 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

DUDEFOI, W., VILLARES, A., PEYRON, S., MOREAU, C., ROPERS, M. H., GONTARD, N., & CATHALA, B. Nanoscience and nanotechnologies for biobased materials, packaging and food applications: New opportunities and concerns. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 46, p. 107-121, 2018.

EL DAMATTY, A. A., & HUSSAIN, I. An Economical Solution for the Environmental Problem Resulting from the Disposal of Rice Straw. In: **Appropriate Technologies for Environmental Protection in the Developing World**. Springer, Dordrecht, 2009. p. 15-23.

EL-HADI, A. M. Increase the elongation at break of poly (lactic acid) composites for use in food packaging films. **Scientific Reports**, v. 7, n.1, p. 1-14, 2017.

EL HALAL, S. L. M., COLUSSI, R., BIDUSKI, B., EVANGELHO, J. A. D., BRUNI, G. P., ANTUNES, M. D., ZAVAREZE, E. D. R. Morphological, mechanical, barrier and properties of films based on acetylated starch and cellulose from barley. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 2, p. 411-419, 2017.

EL ASBAHANI, A., MILADI, K., BADRI, W., SALA, M., ADDI, E. A., CASABIANCA, H., ... & ELAISSARI, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

ENNIGROU, A., HOSNI, K., CASABIANCA, H., VULLIET, E., & SMITI, S. Leaf volatile oil constituents of schinus terebinthifolius and schinus molle from Tunisia. **Foodbalt**, v. 1, p. 90-92, 2011.

ENESCU, D., CERQUEIRA, M. A., FUCINOS, P., & PASTRANA, L. M. Recent advances and challenges on applications of nanotechnology in food packaging. A literature review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110814, 2019.

ESPINOZA ACOSTA, J. L., TORRES CHÁVEZ, P. I., RAMÍREZ-WONG, B., BELLO-PÉREZ, L. A., VEGA RÍOS, A., CARVAJAL MILLÁN, E., ... & LEDESMA OSUNA, A. I. Mechanical, thermal, and antioxidant properties of composite films prepared from durum wheat starch and lignin. **Starch-Stärke**, v. 67, n. 5-6, p. 502-511, 2015.

EVANGELHO, J. A., BIDUSKI, B., DA SILVA, W. M., DE MELLO EL HALAL, S. L., LENHANI, G. C., ZANELLA PINTO, V., ... & DA ROSA ZAVAREZE, E. Carioca bean starch upon synergic modification: characteristics and films properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 1, p. 253-261, 2021.

FAKHOURI, F. M., FONTES, L. C. B., GONÇALVES, P. V. D. M., MILANEZ, C. R., STEEL, C. J., & COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 369-375, 2007.

FABRA, M. J., LOPEZ-RUBIO, A., & LAGARON, J. M. High barrier polyhydroxyalcanoate food packaging film by means of nanostructured electrospun interlayers of zein. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 106-114, 2013.

FABRA, M. J., LÓPEZ-RUBIO, A., CABEDO, L., & LAGARON, J. M. Tailoring barrier properties of thermoplastic corn starch-based films (TPCS) by means of a multilayer design. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 483, p. 84-92, 2016.

FANG, Y., WANG, W., QIAN, H., WU, K., XIAO, M., NI, X., ... & CHEN, S. Regular film property changes of konjac glucomannan/mung bean starch blend films. **Starch-Stärke**, v. 72, n. 5, p. 1900149, 2020.

FIGUEROA-LOPEZ, K. J., CASTRO-MAYORGA, J. L., ANDRADE-MAHECHA, M. M., CABEDO, L., & LAGARON, J. M. Antibacterial and Barrier Properties of Gelatin Coated by Electrospun Polycaprolactone Ultrathin Fibers Containing Black Pepper Oleoresin of Interest in Active Food Biopackaging Applications. **Nanomaterials**, v. 8, n. 4, p. 199, 2018.

FOMBUENA, V., BALART, J., BORONAT, T., SÁNCHEZ-NÁCHER, L., & GARCIA-SANOQUERA, D. Improving mechanical performance of thermoplastic adhesion joints by atmospheric plasma. **Materials & Design**, v. 47, p. 49-56, 2013.

FONSECA, L. M., DE OLIVEIRA, J. P., CRIZEL, R. L., DA SILVA, F. T., DA ROSA ZAVAREZE, E., & BORGES, C. D. Electrospun starch fibers loaded with pinhão (*Araucaria angustifolia*) coat extract rich in phenolic compounds. **Food Biophysics**, p. 1-13, 2020.

FRANCO, P. Q., SILVA, J. C., BORGES, J. P. Produção de fibras de hidroxiapatita por electrofiação. **Ciência & Tecnologia dos Materiais**, v. 22, n. 1, 2010.

GAO, Y., QU, W., LIU, Y., HU, H., COCHRAN, E., & BAI, X. Agricultural residue-derived lignin as the filler of polylactic acid composites and the effect of lignin purity on the composite performance. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 35, p. 47915, 2019.

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.

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

GILBERT, B., & FAVORETO, R. Schinus terebinthifolius Raddi. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 6, n. 01, p. 43-56, 2013.

GOMES, F. S., PROCÓPIO, T. F., NAPOLEÃO, T. H., COELHO, L. C. B. B., & PAIVA, P. M. G. Antimicrobial lectin from *S chinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.

GONTARD, N., DUCHEZ, C., CUQ, J. L., & GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

GORDOBIL, O., EGÜÉS, I., LLANO-PONTE, R., & LABIDI, J. Physicochemical properties of PLA lignin blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, p. 330-338, 2014.

GREENFELD, I., RODRICKS, C. W., SUI, X., & WAGNER, H. D. Beaded fiber composites—Stiffness and strength modeling. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v.125, p. 384-400, 2019.

GROSS, R. A., & KALRA, B. Biodegradable polymers for the environment. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 803-807, 2002.

GUO, J., CHEN, X., WANG, J., HE, Y., XIE, H., & ZHENG, Q. The influence of compatibility on the structure and properties of PLA/Lignin biocomposites by chemical modification. **Polymers**, v. 12, n. 1, p. 56, 2020.

HAIDER, S., AL-ZEGHAYER, Y., ALI, F. A. A., HAIDER, A., MAHMOOD, A., AL-MASRY, W. A., ... & AIJAZ, M. O. Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. **Journal of Polymer Research**, v. 20, n. 4, p. 1-11, 2013.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1165-1188, 2018.

HÄRDELIN, L., PERZON, E., HAGSTRÖM, B., WALKENSTRÖM, P., & GATENHOLM, P. Influence of molecular weight and rheological behavior on electrospinning cellulose nanofibers from ionic liquids. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 4, p. 2303-2310, 2013.

HEINEMANN, A. B., RAMIREZ-VILLEGAS, J., STONE, L. F., & DIDONET, A. D. (2017). Climate change determined drought stress profiles in rainfed common bean production systems in Brazil. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 246, p. 64-77, 2017.

HUANG, D. F., XU, J. G., LIU, J. X., ZHANG, H., & HU, Q. P. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. **Microbiology**, v. 83, n. 4, p. 357-365, 2014.

HYLDGAARD, M., MYGIND, T., & MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 12, 2012.

INOUE, Y. The Antibacterial Effects of Myrcene on *Staphylococcus aureus* and Its Role in the Essential Oil of the Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*). **Natural Medicines**, v. 1, p. 10–14, 2004.

JIAN, S., ZHU, J., JIANG, S., CHEN, S., FANG, H., SONG, Y., ... & HOU, H. Nanofibers with diameter below one nanometer from electrospinning. **RSC advances**, v.8, n. 9, p. 4794-4802, 2018.

KAI, D., TAN, M. J., CHEE, P. L., CHUA, Y. K., YAP, Y. L., & LOH, X. J. Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. **Green Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1175-1200, 2016.

KAI, D., JIANG, S., LOW, Z. W., & LOH, X. J. Engineering highly stretchable lignin-based electrospun nanofibers for potential biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 30, p. 6194-6204, 2015.

KALAMI, S., CHEN, N., BORAZJANI, H., & NEJAD, M. Comparative analysis of different lignins as phenol replacement in phenolic adhesive formulations. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 520-528, 2018.

KHAN, M. T. H. Natural Products as Potential Resources for Antifungal Substances: A Survey. In: **Antifungal Metabolites from Plants**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 157-165.

KIM, I., VISWANATHAN, K., KASI, G., SADEGHI, K., THANAKKASARANEE, S., & SEO, J. Poly (lactic acid)/ZnO bionanocomposite films with positively charged ZnO as potential antimicrobial food packaging materials. **Polymers**, v. 11, n. 9, p. 1427, 2019.

KLAPISZEWSKI, Ł., BULA, K., SOB CZAK, M., & JESIONOWSKI, T. Influence of processing conditions on the thermal stability and mechanical properties of PP/silica-lignin composites. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, 2016.

KLOUCEK, P., SMID, J., FRANKOVA, A., KOKOSKA, L., VALTEROVA, I., & PAVELA, R. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of

essential oils in vapor phase. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 161-165, 2012.

KNIGHT, J. W. & OLSON, R. M. Wheat starch: Production, modification and uses, Chapter 15 in **Starch: Chemistry and Technology**, 1984.

LAUBERTE, L., FABRE, G., PONOMARENKO, J., DIZHBITE, T., EVTUGUIN, D. V., TELYSHEVA, G., & TROUILLAS, P. Lignin modification supported by DFT-based theoretical study as a way to produce competitive natural antioxidants. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1794, 2019.

LIAO, J. J., ABD LATIF, N. H., TRACHE, D., BROSSE, N., & HUSSIN, M. H. Current advancement on the isolation, characterization and application of lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

LIM, C. T. Nanofiber technology: current status and emerging developments. **Progress in Polymer Science**, v. 70, p. 1-17, 2017.

LIMA, K. O., BIDUSKI, B., DA SILVA, W. M. F., FERREIRA, S. M., MONTENEGRO, L. M. P., DIAS, A. R. G., & BIANCHINI, D. Incorporation of tetraethylorthosilicate (TEOS) in biodegradable films based on bean starch (*Phaseolus vulgaris*). **European Polymer Journal**, v. 89, p. 162-173, 2017.

LIU, W., DONG, Y., LIU, D., BAI, Y., & LU, X. Nanowhiskers (CNWs) Composite Nanofibers: Microstructural and Properties Analysis. **Journal of Composites Science**, v. 2, n. 1, p. 4, 2018.

LISPERGUER, J., PEREZ, P., & URIZAR, S. Structure and thermal properties of lignins: characterization by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 4, p. 460-463, 2009.

LOCALI-PEREIRA, A. R., LOPES, N. A., MENIS-HENRIQUE, M. E. C., JANZANTTI, N. S., & NICOLETTI, V. R. Modulation of volatile release and antimicrobial properties of pink pepper essential oil by microencapsulation in single-and double-layer structured matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, p. 108890, 2020.

LOCALI-PEREIRA, A. R. L., CATTELAN, M. G., & NICOLETTI, V. R. Microencapsulation of pink pepper essential oil: Properties of spray-dried pectin/SPI double-layer versus SPI single-layer stabilized emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 581, p. 123806, 2019.

LOMELÍ-RAMÍREZ, M. G., BARRIOS-GUZMÁN, A. J., GARCÍA-ENRIQUEZ, S., DE JESÚS RIVERA-PRADO, J., & MANRÍQUEZ-GONZÁLEZ, R. Chemical and mechanical evaluation of bio-composites based on thermoplastic starch and wood particles prepared by thermal compression. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 2960-2974, 2014.

- LÓPEZ-PEDEMONTE, T., ROIG-SAGUÉS, A., DE LAMO, S., HERNÁNDEZ-HERRERO, M., & GUAMIS, B. Reduction of counts of *Listeria monocytogenes* in cheese by means of high hydrostatic pressure. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 59-66, 2007.
- LUCHESE, C. L., BENELLI, P., SPADA, J. C., & TESSARO, I. C. Impact of the starch source on the physicochemical properties and biodegradability of different starch-based films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 33, p. 46564, 2018.
- MEDEIROS, K. C., MONTEIRO, J. C., DINIZ, M. F., MEDEIROS, I. A., SILVA, B. A., & PIUVEZAM, M. R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 23-28, 2007.
- MERINO, D., MANSILLA, A. Y., GUTIÉRREZ, T. J., CASALONGUÉ, C. A., & ALVAREZ, V. A. Chitosan coated-phosphorylated starch films: Water interaction, transparency and antibacterial properties. **Reactive and Functional Polymers**, v. 131, p. 445-453, 2018.
- MICHELIN, M., LIEBENTRITT, S., VICENTE, A. A., & TEIXEIRA, J. A. Lignin from an integrated process consisting of liquid hot water and ethanol organosolv: Physicochemical and antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 159-169, 2018.
- MOREIRA, J. B., TERRA, A. L. M., COSTA, J. A. V., & DE MORAIS, M. G. Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1855-1862, 2018.
- MORI, C. L., PASSOS, N. A. D., OLIVEIRA, J. E., ALTOÉ, T. F., MORI, F. A., MATTOSO, L. H. C., TONOLI, G. H. D. Nanostructured polylactic acid/candeia essential oil mats obtained by electrospinning. **Journal of Nanomaterials**, v. 16, n. 1, p. 33, 2015.
- MOTTA, J. D., QUEIROZ, A. J., FIGUEIRÊDO, R. M. F., & DE SOUSA, K. D. S. M. Índice de cor e sua correlação com parâmetros físicos e físico-químicos de goiaba, manga e mamão. **Comunicata Scientiae**, v.6, n.1, p. 74-82, 2015.
- MUKHERJI, R., & PRABHUNE, A. Novel glycolipids synthesized using plant essential oils and their application in quorum sensing inhibition and as antibiofilm agents. **The Scientific World Journal**, 2014.
- MÜLLER, J., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., & CHIRALT, A. Poly (lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. **European Polymer Journal**, v. 95, p. 56-70, 2017.

- NASERI, N., ALGAN, C., JACOBS, V., JOHN, M., OKSMAN, K., & MATHEW, A. P. Electrospun chitosan-based nanocomposite mats reinforced with chitin nanocrystals for wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 7-15, 2014.
- NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE MARTINO, L., COPPOLA, R., & DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.
- NEMAT, B., RAZZAGHI, M., BOLTON, K., & ROUSTA, K. The role of food packaging design in consumer recycling behavior—A literature review. **Sustainability**, v. 11, n. 16, p. 4350, 2019.
- NEPPALLI, R., MAREGA, C., MARIGO, A., BAJGAI, M. P., KIM, H. Y., & CAUSIN, V. Poly (ϵ -caprolactone) filled with electrospun nylon fibres: A model for a facile composite fabrication. **European Polymer Journal**, v. 46, n. 5, p. 968-976, 2010.
- NOFAR, M., SACLIGIL, D., CARREAU, P. J., KAMAL, M. R., & HEUZEY, M. C. Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 307-360, 2019.
- OLIVEIRA, J. E., MEDEIROS, E. S., CARDOZO, L., VOLL, F., MADUREIRA, E. H., MATTOSO, L. H. C., & ASSIS, O. B. G. Development of poly (lactic acid) nanostructured membranes for the controlled delivery of progesterone to livestock animals. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 2, p. 844-849, 2013.
- ORÉFICE, R. L., VASCONCELOS, W. L., & MORAES, M. A. S. Phase stability of polycarbonate-polystyrene blends evaluated by micro-FTIR, thermal analyses and scanning electron microscopy. **Polímeros**, v. 14, n. 2, p. 129-133, 2004.
- OROUMEI, A., FOX, B., & NAEBE, M. Thermal and rheological characteristics of biobased carbon fiber precursor derived from low molecular weight organosolv lignin. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 4, p. 758-769, 2015.
- OTONI, C. G., AVENA-BUSTILLOS, R. J., AZEREDO, H. M., LOREVICE, M. V., MOURA, M. R., MATTOSO, L. H., & MCHUGH, T. H. Recent advances on edible films based on fruits and vegetables—a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 5, p. 1151-1169, 2017.
- PALMIERI, S., PIERPAOLI, M., RIDERELLI, L., QI, S., & RUELLO, M. L. Preparation and Characterization of an Electrospun PLA-Cyclodextrins Composite for Simultaneous High-Efficiency PM and VOC Removal. **Journal of Composites Science**, v. 4, n. 2, p. 79, 2020.
- PANDEY, A. K., KUMAR, P., SINGH, P., TRIPATHI, N. N., & BAJPAI, V. K. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2161, 2017.
- PARIT, M., SAHA, P., DAVIS, V. A., & JIANG, Z. Transparent and homogenous cellulose nanocrystal/lignin UV-protection films. **ACS Omega**, v. 3, n. 9, p. 10679-10691, 2018.

PELISSARI, F. M., YAMASHITA, F., GARCIA, M. A., MARTINO, M. N., ZARITZKY, N. E., & GROSSMANN, M. V. E. Constrained mixture design applied to the development of cassava starch–chitosan blown films. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 2, p. 262-267, 2012.

PETERS, R. J., BOUWMEESTER, H., GOTTARDO, S., AMENTA, V., ARENA, M., BRANDHOFF, P., ... & ASCHBERGER, K. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 155-164, 2016.

PFISTER, B., & ZEEMAN, S. C. Formation of starch in plant cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 14, p. 2781-2807, 2016.

PILLAY, V., DOTT, C., CHOONARA, Y. E., TYAGI, C., TOMAR, L., KUMAR, P., DESENDO, V. M. A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013.

POURSORKHABI, V., MOHANTY, A. K., & MISRA, M. Electrospinning of aqueous lignin/poly (ethylene oxide) complexes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 2, 2015.

PRAKASH, B., KUJUR, A., YADAV, A., KUMAR, A., SINGH, P. P., & DUBEY, N. K. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1-11, 2018.

PREIS, E., ANDERS, T., ŠIRC, J., HOBZOVA, R., COCARTA, A. I., BAKOWSKY, U., & JEDELSKÁ, J. (2020). Biocompatible indocyanine green loaded PLA nanofibers for in situ antimicrobial photodynamic therapy. **Materials Science and Engineering: C**, 115, 111068.

PUCCIARIELLO, R., VILLANI, V., BONINI, C., D'AURIA, M., & VETERE, T. Physical properties of straw lignin-based polymer blends. **Polymer**, v. 45, n. 12, p. 4159-4169, 2004.

QUEIRES, L. C., CRÉPIN, M., VACHEROT, F., DE LA TAILLE, A., & RODRIGUES, L. E. In vitro effects of polyphenols extracted from the aroeira plant (*Schinus terebinthifolius raddi*) on the growth of prostate cancer cells (LNCaP, PC-3 AND DU145). **Brazilian Journal of Medicine and Human Health**, v. 1, n. 1, 2013.

RADUSIN, T., TOMŠIK, A., ŠARIĆ, L., RISTIĆ, I., GIACINTI BASCHETTI, M., MINELLI, M., & NOVAKOVIĆ, A. Hybrid Pla/wild garlic antimicrobial composite films for food packaging application. **Polymer Composites**, v. 40, n. 3, p. 893-900, 2019.

RAFIQ, M., HUSSAIN, T., ABID, S., NAZIR, A., & MASOOD, R. Development of sodium alginate/PVA antibacterial nanofibers by the incorporation of essential oils. **Materials Research Express**, v. 5, n. 3, p. 035007, 2018.

RAMAKOTI, B., DHANAGOPAL, H., DEEPA, K., RAJESH, M., RAMASWAMY, S., & TAMILARASAN, K. Solvent fractionation of organosolv lignin to improve lignin homogeneity: Structural characterization. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100293, 2019.

RAMEZANI, N., & SAIN, M. Thermal and physiochemical characterization of lignin extracted from wheat straw by organosolv process. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 7, p. 3109-3116, 2018.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REHMAN, A., JAFARI, S. M., AADIL, R. M., ASSADPOUR, E., RANDHAWA, M. A., & MAHMOOD, S. Development of active food packaging via incorporation of biopolymeric nanocarriers containing essential oils. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.

REICHERT, C. L., BUGNICOURT, E., COLTELLI, M. B., CINELLI, P., LAZZERI, A., CANESI, I., ... & SCHMID, M. Bio-based packaging: Materials, modifications, industrial applications and sustainability. **Polymers**, v. 12, n. 7, p. 1558, 2020.

REYES-JURADO, F., NAVARRO-CRUZ, A. R., OCHOA-VELASCO, C. E., PALOU, E., LÓPEZ-MALO, A., & ÁVILA-SOSA, R. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 10, p. 1641-1650, 2020.

REYES-MORENO, C., PAREDES-LÓPEZ, O., & GONZALEZ, E. Hard-to-cook phenomenon in common beans—A review. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 227-286, 1993.

RIBBA, L., GARCIA, N. L., D'ACCORSO, N., & GOYANES, S. Disadvantages of starch-based materials, feasible alternatives in order to overcome these limitations. In: **Starch-Based Materials in Food Packaging**. Academic Press, p. 37-76, 2017.

RIBEIRO, A. C. **Efeito da adição de óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) microencapsulado em queijo minas frescal. 2015. 86 f.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

ROMANI, V. P., HERNÁNDEZ, C. P., MARTINS, V. G. Pink pepper phenolic compounds incorporation in starch/protein blends and its potential to inhibit apple browning. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 151-158, 2018.

ROSA, M. P., BECK, P. H., MÜLLER, D. G., MOREIRA, J. B., DA SILVA, J. S., & DURIGON, A. M. M. Extraction of organosolv lignin from rice husk under reflux conditions. **Biological and Chemical Research**, p. 87-98, 2017.

- ROSSETO, M., KREIN, D. D., BALBÉ, N. P., & DETTMER, A. Starch–gelatin film as an alternative to the use of plastics in agriculture: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 15, p. 6671-6679, 2019.
- ROY, K., THORY, R., SINHMAR, A., PATHERA, A. K., & NAIN, V. Development and characterization of nano starch-based composite films from mung bean (*Vigna radiata*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 242-251, 2020.
- RUPOLLO, G., VANIER, N. L., DA ROSA ZAVAREZE, E., DE OLIVEIRA, M., PEREIRA, J. M., PARAGINSKI, R. T., ... & ELIAS, M. C. Pasting, morphological, thermal and crystallinity properties of starch isolated from beans stored under different atmospheric conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1403-1409, 2011.
- SAAD, N. Y., MULLER, C. D., & LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013.
- SADEGHIFAR, H., & ARGYROPOULOS, D. S. Correlations of the antioxidant properties of softwood kraft lignin fractions with the thermal stability of its blends with polyethylene. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 2, p. 349-356, 2015.
- SAIDA, C. H., IMANE, Z., FAIROUZ, S., NABAHAHAT, B., GONZÁLEZ-MAS, M. C., BLÁZQUEZ, M. A., ... & MOHAMED, A. Chemical composition and antibacterial effect of *Smyrniolus olusatrum* L. Fruit Essential Oil. **Mediterranean Journal of Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 577-584, 2020.
- SAITO, T., BROWN, R. H., HUNT, M. A., PICKEL, D. L., PICKEL, J. M., MESSMAN, J. M., NASKAR, A. K. Turning renewable resources into value-added polymer: development of lignin-based thermoplastic. **Green Chemistry**, v. 14, n. 12, p. 3295-3303, 2012.
- SALAS, C., AGO, M., LUCIA, L. A., & ROJAS, O. J. Synthesis of soy protein–lignin nanofibers by solution electrospinning. **Reactive and Functional Polymers**, v. 85, p. 221-227, 2014.
- SALEM, N., KEFI, S., TABBEN, O., AYED, A., JALLOULI, S., FERES, N., SGHAIER, A. Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence synergism with antimicrobial standards. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 115-125, 2018.
- SANTOS, A. C., ROSSATO, M., SERAFINI, L. A., BUENO, M., CRIPPA, L. B., SARTORI, V. C., ... & MOYNA, P. Antifungal effect of *Schinus molle* L., Anacardiaceae, and *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, essential oils of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SANTOS-CAVALCANTI, A., ALVES, M. D. S., SILVA, L. C. P. D., PATROCÍNIO, D. D. S., SANCHES, M. N., CHAVES, D. S. D. A., & SOUZA, M. A. A. D. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 356-362, 2015.

SCAFFARO, R., MAIO, A., & LOPRESTI, F. Effect of graphene and fabrication technique on the release kinetics of carvacrol from polylactic acid. **Composites Science and Technology**, 2018.

SCHAEFER, D., & CHEUNG, W. M. Smart packaging: Opportunities and challenges. **Procedia CIRP**, v. 72, p. 1022-1027, 2018.

SEN, S., PATIL, S., ARGYROPOULOS, D. S. Thermal properties of lignin in copolymers, blends, and composites: a review. **Green Chemistry**, v.11, p.4862-4887, 2015.

SHANKAR, S., RHIM, J. W., & WON, K. Preparation of poly (lactide)/lignin/silver nanoparticles composite films with UV light barrier and antibacterial properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1724-1731, 2018.

SHARMA, S. Polylactic Acid (PLA) and Its Composites: An Eco-friendly Solution for Packaging. **Sustainable Food Packaging Technology**, p. 107-132, 2021.

SILVA, T. F., MENEZES, F., MONTAGNA, L. S., LEMES, A. P., & PASSADOR, F. R. Effect of lignin as accelerator of the biodegradation process of poly (lactic acid)/lignin composites. **Materials Science and Engineering: B**, v. 251, p. 114441, 2019.

SILVA, F. T., DA CUNHA, K. F., FONSECA, L. M., ANTUNES, M. D., EL HALAL, S. L. M., FIORENTINI, Â. M., ... & DIAS, A. R. G. Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 107-115, 2018.

SINGH, S. K., & DHEPE, P. L. Isolation of lignin by organosolv process from different varieties of rice husk: understanding their physical and chemical properties. **Bioresource technology**, v. 221, p. 310-317, 2016.

SONG, X.; ZUO, G.; CHEN, F. Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1302-1309, 2018.

SOUZA, A. R. M., ARTHUR, V., & NOGUEIRA, D. P. The effect of irradiation in the preservation of pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 1082-1083, 2012.

SUH, J. H., OCK, S. Y., PARK, G. D., LEE, M. H., & PARK, H. J. Effect of moisture content on the heat-sealing property of starch films from different botanical sources. **Polymer Testing**, v. 89, p. 106612, 2020.

SUN, X., YANG, S., XUE, B., HUO, K., LI, X., TIAN, Y., ... & ZHENG, Q. Super-hydrophobic poly (lactic acid) by controlling the hierarchical structure and polymorphic transformation. **Chemical Engineering Journal**, v. 397, p. 125297, 2020.

TAMPAU, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., & CHIRALT, A. Biodegradability and disintegration of multilayer starch films with electrospun PCL fibres encapsulating carvacrol. **Polymer Degradation and Stability**, v. 173, p. 109100, 2020.

TANG, Y., ZHOU, Y., LAN, X., HUANG, D., LUO, T., JI, J., ... & WANG, W. Electrospun gelatin nanofibers encapsulated with peppermint and chamomile essential oils as potential edible packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 2227-2234, 2019.

TEJADO, A., PENA, C., LABIDI, J., ECHEVERRIA, J. M., & MONDRAGON, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1655-1663, 2007.

TEILAGHI, SHIVA; MOVAFFAGH, JEBRAEEL; BAYAT, ZAKIYEH. Preparation as Well as Evaluation of the Nanofiber Membrane Loaded with Nigella sativa Extract Using the Electrospinning Method. **Journal of Polymers and the Environment**, p. 1-12, 2020.

THAKALI, A., & MACRAE, J. D. A review of chemical and microbial contamination in food: What are the threats to a circular food system?. **Environmental Research**, v. 194, p. 110635, 2021.

THANGARAJU, E., SRINIVASAN, N. T., KUMAR, R., SEHGAL, P. K., & RAJIV, S. Fabrication of electrospun poly l-lactide and curcumin loaded poly l-lactide nanofibers for drug delivery. **Fibers and Polymers**, v. 13, n. 7, p. 823-830, 2012.

THAKUR, R., PRISTIJONO, P., SCARLETT, C. J., BOWYER, M., SINGH, S. P., & VUONG, Q. V. Starch-based films: Major factors affecting their properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 1079-1089, 2019.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 71-78, 2003.

TIWARI, B. K., VALDRAMIDIS, V. P., O'DONNELL, C. P., MUTHUKUMARAPPAN, K., BOURKE, P., & CULLEN, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5987-6000, 2009.

TLILI, N., YAHIA, Y., FERIANI, A., LABIDI, A., GHAZOUANI, L., NASRI, N., & KHALDI, A. Schinus terebinthifolius vs Schinus molle: A comparative study of the effect of species and location on the phytochemical content of fruits. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 559-565, 2018.

TORRES-GINER, S. Electrospun nanofibers for food packaging applications. In: **Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging**. 2011. p. 108-125.

TROMBETTA, D., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., VENUTI, V., CRISTANI, M., DANIELE, C., ... & BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

TYAGI, A. K., & MALIK, A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 205-210, 2010.

ULIANA, M. P., FRONZA, M., SILVA, A. G., VARGAS, T. S., ANDRADE, T. U.; SCHERER, R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016.

UNALAN, I., SLAVIK, B., BUETTNER, A., GOLDMANN, W. H., FRANK, G., & BOCCACCINI, A. R. Physical and antibacterial properties of peppermint essential oil loaded poly (ϵ -caprolactone)(PCL) electrospun fiber mats for wound healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 346, 2019.

UYAR, T., KNY, E. Electrospun materials for tissue engineering and biomedical applications: Research, design and commercialization. **Woodhead Publishing**, 2017.

VALENTE, T. A. M., SILVA, D. M., GOMES, P. S., FERNANDES, M. H., SANTOS, J. D., & SENCADAS, V. Effect of sterilization methods on electrospun poly (lactic acid)(PLA) fiber alignment for biomedical applications. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 5, p. 3241-3249, 2016.

VANIER, N. L., DE OLIVEIRA, J. P., BRUNI, G. P., EL HALAL, S. L. M., VILLANOVA, F. A., ZAVAREZE, E. D. R., ... & BASSINELLO, P. Z. Characteristics of starch from different bean genotypes and its effect on biodegradable films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 1207-1214, 2019.

VEGA-LUGO, A. C., & LIM, L. T. Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly (lactic acid) electrospun fibers. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 933-940, 2009.

VICTORIA, F. N., RADATZ, C. S., SACHINI, M., JACOB, R. G., ALVES, D., SAVEGNAGO, L., ... & LENARDÃO, E. J. Further analysis of the antimicrobial activity of α -phenylseleno citronellal and α -phenylseleno citronellol. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 95-99, 2012.

WEN, P., WEN, Y., ZONG, M. H., LINHARDT, R. J., & WU, H. Encapsulation of bioactive compound in electrospun fibers and its potential application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 42, p. 9161-9179, 2017.

WANG, L., SCHNEPP, Z., & TITIRICI, M. M. Rice husk-derived carbon anodes for lithium ion batteries. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 1, n. 17, p. 5269-5273, 2013.

WANG, J., TIAN, L., LUO, B., RAMAKRISHNA, S., KAI, D., LOH, X. J., ... & MO, X. Engineering PCL/lignin nanofibers as an antioxidant scaffold for the growth of neuron and Schwann cell. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 356-365, 2018.

WILFER, P. B., GIRIDARAN, G., JEEVAHAN, J. J., JOSEPH, G. B., KUMAR, G. S., & THYKATTUSERRY, N. J. Effect of starch type on the film properties of native starch based edible films. **Materials Today: Proceedings**, 44, 3903-3907, 2021.

XU, W., SHEN, R., YAN, Y., & GAO, J. Preparation and characterization of electrospun alginate/PLA nanofibers as tissue engineering material by emulsion eletrospinning. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 428-438, 2017.

YANG, D., LI, Y., & NIE, J. Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 538-543, 2008.

YANG, W., FORTUNATI, E., DOMINICI, F., GIOVANALE, G., MAZZAGLIA, A., BALESTRA, G. M., ... & PUGLIA, D. Effect of cellulose and lignin on disintegration, antimicrobial and antioxidant properties of PLA active films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 360-368, 2016.

ZAVAREZE, E. D. R., HALAL, S. L. M. E., TELLES, A. C., & PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.V. Filmes biodegradáveis à base de proteínas miofibrilares de pescado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. SPE, p. 53-57, 2012.

ZHANG, T., WANG, Z., YIN, Y., CAI, R., YAN, S., & LI, W. Starch content and granule size distribution in grains of wheat in relation to post-anthesis water deficits. **Journal of Agronomy and crop science**, v. 196, n. 1, p. 1-8, 2010.

ZHANG, S., ZHANG, Y., LIU, L., & FANG, G. Antioxidant activity of organosolv lignin degraded using SO₄²⁻/ZrO₂ as catalyst. **BioResources**, v. 10, n. 4, p. 6819-6829, 2015.

ZHAO, L., DUAN, G., ZHANG, G., YANG, H., HE, S., & JIANG, S. Electrospun functional materials toward food packaging applications: A review. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 150, 2020.