



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

NANOFIBRAS ANTIMICROBIANAS PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Eng^a SUELEN GOETTEMS KUNTZLER

PROF.^a DR.^a MICHELE GREQUE DE MORAIS

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

NANOFIBRAS ANTIMICROBIANAS PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Eng^a SUELEN GOETTEMS KUNTZLER

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos do programa
de pós-graduação em Engenharia e
Ciência de Alimentos

Prof.^a Dr.^a MICHELE GREQUE DE MORAIS
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2017

Ficha catalográfica

K966n Kuntzler, Suelen Goettems.
Nanofibras antimicrobianas para aplicação em alimentos /
Suelen Goettems Kuntzler. – 2017.
146 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande
– FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande/RS, 2017.

Orientadora: Dr^a. Michele Greque de Moraes.

1. Biopolímero 2. Compostos fenólicos 3. *Electrospinning*
4. *Spirulina* I. Moraes, Michele Greque de II. Título.

CDU 664

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Suelen Goettems Kuntzler e aprovada em 31 de março de 2017, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Michele Greque de Moraes

Profa. Dra. Michele Greque de Moraes – FURG

Álvaro Renato Guerra Dias

Prof. Dr. Álvaro Renato Guerra Dias – UFPel

Vilásia Guimarães Martins

Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG.

Jorge Alberto Vieira Costa

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã, minha sobrinha e ao meu namorado pela compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, força e coragem para superar as dificuldades

Aos meus pais, Gilberto e Ingrid, pelo amor, incentivo, apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim

A minha irmã Helen e a minha sobrinha Antonella pelo carinho, risadas e fofura que me deram forças para continuar

A minha vó Nelly pelo carinho e apoio emocional e ao meu vô, Hilário, que já partiu dessa vida, mas que ainda vive em meu coração

Ao meu namorado, Guilherme, por tolerar minha ausência e estar presente me incentivando, pela paciência em todas as horas de crises e desesperos e, pelo carinho, conselhos e momentos de diversão que passamos juntos

A minha querida e sempre presente orientadora, Prof.^a Dr.^a Michele Morais, pelo incentivo e sugestões para melhorar nosso trabalho, pela dedicação, amizade, confiança e pelas palavras que me guiaram nessa trajetória

Aos iniciantes científicos, Ana Claudia Almeida e Jorge da Maia, pela dedicação e responsabilidade inclusive em domingos e feriados ensolarados

Aos técnicos Adriano e Roque, pela disposição e ajuda na solução de problemas

Aos colegas dos Laboratórios de Microbiologia e Bioquímica e Engenharia Bioquímica, em especial: Ana Paula Cassuriaga, Bruna Cardias, Bruna Vaz, Etiele Morais, Juliana Moreira e Lívia Uebel, pelo apoio com o trabalho, amizade, alegria e momentos de descontração

A Universidade, pela ótima infraestrutura para desenvolver este trabalho e pelo apoio financeiro

Ao corpo docente, coordenação e administração do curso de pós-graduação que através de seus conhecimentos e boa vontade contribuíram para nossa formação

A CAPES, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho

Gostaria de agradecer a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para esta
conquista

Muito Obrigada!

“O Senhor é meu Pastor e nada me faltará.”
Salmo 23:1

NOMENCLATURA

A - área da seção transversal

Al – alongamento

CF - compostos fenólicos

CIM - concentração inibitória mínima

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

Dc - diâmetro do capilar

d_i - distância inicial de separação

d_r - diferença entre a distância no momento da ruptura e a distância inicial

DRX - difração de raios-X

DSC – calorimetria diferencial de varredura

F_m - força máxima no momento da ruptura das nanofibras

FTIR - Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier

PE - potencial elétrico

PEO - poli (óxido de etileno)

PHB - poli (hidroxibutirato)

TA - taxa de alimentação

T_{fd} - temperatura final de degradação

T_{fusão} - temperatura de fusão

TGA – análise termogravimétrica

T_{id} - temperatura inicial de degradação

T_m - temperatura de máxima degradação

Tr - tensão de ruptura ou resistência à tração

X_c – cristalinidade

ΔH – entalpia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros do *electrospinning*.43

ARTIGO 1 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DA BIOMASSA DA MICROALGA SPIRULINA SP. LEB 18

Tabela 1 - Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de compostos fenólicos em *Spirulina* sp. LEB 18.....57

Tabela 2 - Resultados dos halos de inibição dos compostos fenólicos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.62

Tabela 3 - Resultados do teste da macrodiluição com contagem de colônias.64

ARTIGO 2 - POLI(HIDROXIBUTIRATO) E COMPOSTOS FENÓLICOS MICROALGAIS PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Tabela 1 – Condições do processo de *electrospinning* potencial elétrico (PE, kV), taxa de alimentação (TA, $\mu\text{L/h}$), diâmetro do capilar (D_c , mm) e diâmetros médios (D_m , nm) obtidos para nanofibras de PHB1.....81

Tabela 2 - Resultados das propriedades térmicas e mecânicas das nanofibras.86

ARTIGO 3 - COMPOSTOS FENÓLICOS MICROALGAIS COM AÇÃO ANTIBACTERIANA ADICIONADOS EM NANOFIBRAS DE QUITOSANA E PEO

Tabela 1 - Resultados do diâmetro do capilar (D_c , mm); concentração de quitosana/PEO (% m/v); diâmetro médio (D_m , nm) e fotos das nanofibras obtidas.107

Tabela 2 - Resultados das propriedades térmicas das amostras poliméricas.....111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	31
Figura 2 - Estrutura química do PHB	34
Figura 3 - Biopolímero PHB produzido pela microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	35
Figura 4 - Estrutura química do monômero da quitosana	36
Figura 5 - Estrutura química do PEO	37
Figura 6 - Equipamento <i>electrospinning</i>	42
Figura 7 - Diagrama esquemático da técnica de <i>electrospinning</i>	43

ARTIGO 1 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DA BIOMASSA DA MICROALGA SPIRULINA SP. LEB 18

Figura 1 - Cromatograma dos compostos fenólicos da <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 identificados por CLAE.....	59
Figura 2 - Cromatograma dos padrões fenólicos.....	60
Figura 3 - Halos de inibição <i>Escherichia coli</i> ATCC 25972 (a) e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (b) dos discos contendo compostos fenólicos da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	62

ARTIGO 2 - POLI(HIDROXIBUTIRATO) E COMPOSTOS FENÓLICOS MICROALGAIS PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Figura 1 - Nanofibras desenvolvidas a partir de 35 % de PHB1, 2,4 % NaCl (a) e 35 % de PHB1, 2,4 % NaCl e 1% compostos fenólicos (b)	82
Figura 2 - Ângulo de contato das nanofibras de 35% PHB (a) e 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos (b).....	84
Figura 3 - Espectro FTIR das amostras	88
Figura 4 - Resultado DRX das amostras	89
Figura 5 - EDS das nanofibras de PHB contendo compostos fenólicos (a), nanofibras de PHB (b), PHB sólido (c) e MEV do PHB sólido (d).....	90

**ARTIGO 3 - COMPOSTOS FENÓLICOS MICROALGAIS COM AÇÃO
ANTIBACTERIANA ADICIONADOS EM NANOFIBRAS DE QUITOSANA E PEO**

Figura 1 - Nanofibras desenvolvidas a partir de 3% quitosana/2 % PEO (a) e 3% quitosana/2% PEO e 1% compostos fenólicos (b).....	108
Figura 2 – Molhabilidade das nanofibras de 3% quitosana/2% PEO (a) e 3% quitosana/2%PEO/1% de compostos fenólicos (b).....	109
Figura 3 - Espectro de absorção do infravermelho das amostras.....	114
Figura 4 - Resultado DRX das amostras.....	115

SUMÁRIO

NOMENCLATURA	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
CAPÍTULO I	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPÍTULO II.....	27
3 REFERENCIAL TEÓRICO	29
3.1 PROBLEMAS CAUSADOS POR MICRO-ORGANISMOS NOS ALIMENTOS	29
3.2 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS NATURAIS	30
3.3 MICROALGA <i>Spirulina</i>	31
3.4 BIOPOLÍMERO E POLÍMEROS	33
3.4.1 Poli(hidroxibutirato)	33
3.4.2 Quitosana	35
3.4.3 Poli (óxido de etileno)	37
3.5 NANOTECNOLOGIA EM ALIMENTOS	38
3.6 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS	39
3.7 PROCESSO DE <i>ELECTROSPINNING</i>	41
3.7.1 Propriedades da solução polimérica	43
3.7.2 Condições do processo	45
3.7.3 Condições do ambiente.....	47
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
CAPÍTULO III	50
5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	51
ARTIGO 1 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	52
1 Introdução	54
2 Metodologia.....	55
2.1 Obtenção da biomassa de microalga <i>spirulina</i> sp. LEB 18.....	55
2.2 Extração dos compostos fenólicos.....	55
2.3 Perfil de compostos fenólicos.....	56
2.4 Método de difusão com discos	57
2.5 Método da macrodiluição com contagem de colônias.....	58
2.6 Análise estatística	58
3 Resultados e Discussão	59
3.1 Perfil dos compostos fenólicos no extrato de <i>spirulina</i> sp. LEB 18	59
3.2 Ensaio da atividade antibacteriana	61
4 Conclusão	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Artigo 2 -POLI(HIDROXIBUTIRATO) E COMPOSTOS FENÓLICOS MICROALGAIS PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	70
1 Introdução	72
2 Metodologia	73
2.1 Obtenção da biomassa de microalga <i>spirulina</i> sp. LEB 18	73
2.2 Extração do PHB com clorofórmio.....	73
2.3 Extração do PHB com hipoclorito de sódio 4 % utilizando pré-tratamento com clorofórmio.....	74
2.4 Extração dos compostos fenólicos	74
2.5 Preparo das soluções poliméricas	75
2.6 Desenvolvimento de nanofibras.....	75
2.7 Quantificação do biopolímero.....	75
2.8 Forma e diâmetro das nanofibras	76
2.9 Viscosidade das soluções	76
2.10 Porosidade.....	76
2.11 Transições endotérmicas e exotérmicas das nanofibras.....	76
2.12 Estabilidade térmica das nanofibras e conteúdo de solvente residual	77
2.13 Determinação da resistência à tração e alongamento no ponto de ruptura	77
2.14 Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	78
2.15 Ângulo de contato	78
2.16 Difração de raios-X.....	78
2.17 Teste antimicrobiano.....	79
2.18 Análise estatística.....	79
3 Resultados e Discussão	79
3.1 Influência dos parâmetros do processo e da solução polimérica no diâmetro das nanofibras.....	79
3.2 Molhabilidade e porosidade das nanofibras.....	83
3.3 Propriedades térmicas e mecânicas.....	85
3.4 Análise química e estrutural das nanofibras	88
3.5 Composição das nanofibras e quantificação do PHB	90
3.6 Propriedade antibacteriana.....	91
4 Conclusão.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
Artigo 3 - COMPOSTOS FENÓLICOS MICROALGAIS COM AÇÃO ANTIBACTERIANA ADICIONADOS EM NANOFIBRAS DE QUITOSANA E PEO	98
1 Introdução	100
2 Metodologia	101
2.1 Obtenção da biomassa de microalga <i>spirulina</i> sp. LEB 18	101
2.2 Extração dos compostos fenólicos	101
2.3 Preparo das soluções poliméricas	102
2.4 Desenvolvimento de nanofibras.....	102
2.5 Forma e diâmetro das nanofibras	102
2.6 Viscosidade das soluções	103
2.7 Porosidade.....	103
2.8 Transições endotérmicas e exotérmicas das nanofibras.....	103
2.9 Estabilidade térmica das nanofibras e conteúdo de solvente residual	104
2.10 Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	104
2.11 Ângulo de contato	104

2.12 Difração de raios-X	104
2.13 Teste antimicrobiano	105
2.14 Análise estatística	105
3 Resultados e Discussão	106
3.1 Influência dos parâmetros do processo e da solução polimérica na formação das nanofibras	106
3.2 Molhabilidade e porosidade das nanofibras de quitosana/PEO.....	109
3.3 Propriedades térmicas.....	110
3.4 Análise da composição química e estrutura das nanofibras	113
3.5 Propriedade antibacteriana das nanofibras	115
4 Conclusão	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
CAPÍTULO VI.....	122
6 CONCLUSÃO GERAL	123
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	124
CAPÍTULO V	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
APÊNDICES	145

CAPÍTULO I

RESUMO

As microalgas como a *Spirulina* sp. LEB 18 apresentam compostos biologicamente ativos como os compostos fenólicos que possuem atividade antifúngica e antibacteriana. O poli(hidroxibutirato) (PHB) é um biopolímero extraído da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 que apresenta características como biodegradabilidade e propriedades mecânicas semelhantes aos plásticos convencionais, podendo ser alternativa aos materiais termoplásticos de origem petroquímica. Além disso, os polímeros quitosana e poli (óxido de etileno) (PEO) também apresentam importantes características como biodegradabilidade, biocompatibilidade com células e tecidos e propriedade antimicrobiana, os quais podem ser aplicados na produção de embalagens de alimentos. As nanofibras poliméricas produzidas por *electrospinning* são nanomateriais que em função do polímero utilizado apresentam elevada área superficial em relação ao volume, alta porosidade que permite a incorporação de compostos e propriedades mecânicas semelhantes aos filmes. O objetivo do trabalho foi desenvolver nanofibras poliméricas contendo compostos fenólicos obtidos da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com potencial propriedade antibacteriana. Na primeira etapa deste trabalho foi realizada a extração dos compostos fenólicos e a atividade antimicrobiana do extrato foi testada através dos métodos de difusão com discos e macrodiluição. Os dois métodos foram realizados com as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Na outra etapa, a biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi utilizada para extração do biopolímero PHB, o qual foi solubilizado em clorofórmio e a solução polimérica foi testada no *electrospinning* para produção de nanofibras. Os polímeros quitosana e PEO também foram utilizados para o desenvolvimento de nanofibras. Após, os compostos fenólicos foram incorporados às nanofibras, as quais foram conduzidas às análises mecânicas, termogravimétricas, de molhabilidade, físico-químicas, morfológicas e microbiológicas. Dessa forma, os compostos fenólicos presentes na microalga e identificados por cromatografia foram os ácidos gálico e cafeico capazes de formar halos de inibição de $11,0 \pm \leq 0,1$ e $15,7 \pm 0,6$ mm com a concentração mínima inibitória de 200 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25972, respectivamente. As nanofibras poliméricas contendo os compostos fenólicos apresentaram diâmetro médio de 810 ± 85 nm e 214 ± 37 nm para PHB e blenda de quitosana/PEO, respectivamente. A partir da análise do ângulo de contato foi possível determinar que as nanofibras de PHB e a blenda de quitosana/PEO ambas com os compostos fenólicos apresentam caráter hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente. As propriedades térmicas confirmaram a incorporação dos compostos e possibilitaram a utilização das nanofibras como embalagens de alimentos por apresentarem temperatura de máxima degradação de 287,0 e 323 °C, para nanofibras de PHB e blenda de quitosana/PEO, respectivamente. O espectro FTIR confirmou a incorporação dos compostos fenólicos nas nanofibras e a análise da atividade biológica determinou que as nanofibras de PHB e blenda de quitosana/PEO contendo os compostos fenólicos apresentaram halos de inibição de $7,5 \pm 0,4$ e $6,4 \pm 1,1$ mm para o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Esta alternativa nanobiotecnológica de caráter inovador contribui para à ciência pois as nanofibras quando aplicadas em alimentos podem aumentar as propriedades mecânicas e térmicas adequando-as ao uso como embalagens. Além disso, a adição de compostos fenólicos com a atividade antibacteriana auxilia a embalagem a interagir com o alimento de forma desejável, protegendo os produtos alimentares do ambiente externo e proporcionando maior segurança alimentar para o consumidor.

Palavras-chave: Biopolímero. Compostos fenólicos. *Electrospinning*. *Spirulina*.

ANTIMICROBIAL NANOFIBERS FOR FOOD APPLICATION

ABSTRACT

Microalgae such as *Spirulina* sp. LEB 18 present biologically active compounds as THE phenolic compounds which have antifungal and antibacterial activity. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biopolymer extracted from *Spirulina* sp. LEB 18 with characteristics such as biodegradability and mechanical properties similar to conventional plastics, and can be an alternative to thermoplastic materials petrochemical origin. Besides that, chitosan and polyethylene oxide (PEO) polymers also have important characteristics as biodegradability, cell and tissue biocompatibility, antimicrobial property, being an interesting choice for applications in food packaging. Polymeric nanofibers produced by electrospinning are nanomaterials that due to the polymer used have a high surface area in relation to volume, high porosity that allows the incorporation of compounds and mechanical properties similar to the films. The aim this work was to develop polymeric nanofibers containing phenolic compounds obtained from *Spirulina* sp. LEB 18 biomass with potential antibacterial property. In the first stage of this work it was performed the phenolic compounds extraction from biomass and the extract antimicrobial activity it was tested by disc diffusion and macrodilution methods. Both methods were conducted with bacteria *Escherichia coli* ATCC 25972 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. In another step, *Spirulina* sp. LEB 18 biomass was used for the extraction PHB biopolymer, which was solubilized in chloroform and polymer solution was tested in the electrospinning to produce nanofiber. The chitosan and PEO polymers were also used for nanofibers development. After, the phenolic compounds was incorporated into nanofibers, which were conducted to mechanical analysis, thermogravimetric, wettability, physical-chemical, morphological and microbiological. Thus, the phenolic compounds present in microalgae and identified by chromatography were gallic and caffeic acids capable of growth inhibition zones $11.0 \pm \leq 0,1$ and 15.7 ± 0.6 mm with minimum inhibitory concentration of 200 and $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25972 microorganisms, respectively. Polymeric nanofibers containing phenolic compounds had an average diameter of 810 ± 85 nm and 214 ± 37 nm for PHB and chitosan/PEO blends, respectively. From the contact angle analysis it was possible to determine that PHB and chitosan/PEO blends nanofibers both with the phenolic compounds have hydrophobic and hydrophilic character, respectively. Thermal properties confirmed the incorporation of the compounds and allowed the application in the nanofibers as food packaging because they presented a maximum degradation temperature of 287.0 °C and 323 °C for PHB and chitosan/PEO blends, respectively. The FTIR spectrum confirmed the incorporation of the phenolic compounds in the nanofibers and the biological activity analysis determined that PHB and chitosan/PEO blends nanofibers containing the phenolic compounds presented inhibition zones of 7.5 ± 0.4 mm and 6.4 ± 1.1 for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. This innovative nanobiotechnological alternative contributes to science because nanofibers when applied in food can increase mechanical and thermal properties suiting them for use as packaging. Moreover, phenolic compounds addition with antimicrobial activity helps the packaging to interact with the food in a desirable manner, protecting food products from the external environment and providing greater food safety for the consumer.

Keywords: Biopolymer. Electrospinning. Phenolic compounds. *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento de micro-organismos nos alimentos é uma das principais causas de deterioração e perdas de produtos processados e *in natura* (MANSFELD, 2007). Uma tendência para controlar micro-organismos deteriorantes de alimentos e garantir a conservação é empregar compostos antimicrobianos de origem natural, que não causam toxicidade para humanos e meio ambiente. Dessa forma, as microalgas podem ser fonte biológica de compostos com atividade antimicrobiana. A *Spirulina* (*Arthrospira*) apresenta em sua biomassa compostos fenólicos, vitaminas, pigmentos, minerais, polissacarídeos e carotenoides que possuem diversas atividades biológicas (KULSHRESHTHA et al., 2008; PRIYADARSHANI; RATH, 2012; SEMARY, 2012). Algumas propriedades da microalga *Spirulina* e de compostos extraídos da biomassa já foram estudadas, como a atividade antioxidante (COLLA, FURLONG; COSTA, 2007) e atividade antifúngica (SOUZA et al., 2011).

A microalga *Spirulina* também apresenta em sua biomassa o biopolímero poli(hidroxibutirato) (PHB) que pertence ao grupo dos poli(hidroxialcanoatos). O PHB é um biopolímero que pode ser obtido por rotas biotecnológicas utilizando substrato renovável e é uma alternativa à substituição dos plásticos convencionais derivados do petróleo, pois apresenta propriedades mecânicas similares e com a adicional característica de serem completamente biodegradáveis em dióxido de carbono e água (BALAJI et al., 2013). Além disso, possuem características como termoplasticidade, processabilidade e biocompatibilidade com células e tecidos, o que sugere aplicações na indústria alimentar, farmacêutica e áreas médicas (SHARMA et al., 2007).

Outros polímeros que são de particular interesse na indústria de alimentos são a quitosana e o poli (óxido de etileno) (PEO). O polímero natural quitosana tem a importante propriedade de inibição do crescimento de bactérias, bolores e leveduras, além de apresentar características de atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. O PEO é um polímero solúvel em água e biocompatível com células e tecidos, aliado a quitosana beneficia as propriedades físicas das nanofibras e pode aumentar a qualidade, segurança e estabilidade de armazenamento de alimentos (DUTTA et al., 2009). Estes polímeros assim como o PHB podem ser utilizados para a produção de nanofibras com potencial aplicação no desenvolvimento de embalagens de alimentos.

As nanofibras produzidas por *electrospinning* apresentam vantagens em relação aos filmes poliméricos devido a elevada porosidade e a presença dos interstícios que

direcionam os compostos aos alimentos de forma gradual e controlada (MORAIS, 2008). Outra vantagem é em relação a técnica, em que é utilizada temperatura ambiente, evitando danos aos compostos incorporados (RAMAKRISHNA et al., 2005). Dessa forma, a incorporação de substâncias antimicrobianas naturais como os compostos fenólicos microalgas nas nanofibras confere a utilização como embalagens de alimentos. Nanofibras com propriedade antimicrobiana ajudam a embalagem interagir com o alimento, protegendo os produtos do ambiente externo e proporcionando maior qualidade e segurança alimentar para o consumidor.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanofibras poliméricas contendo compostos fenólicos obtidos da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com potencial propriedade antibacteriana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair compostos fenólicos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e avaliar a atividade antibacteriana sobre as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- Incorporar os compostos fenólicos nas nanofibras de PHB e blenda de quitosana/PEO;
- Avaliar a atividade antibacteriana das nanofibras poliméricas contendo os compostos fenólicos.

CAPÍTULO II

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PROBLEMAS CAUSADOS POR MICRO-ORGANISMOS NOS ALIMENTOS

A deterioração microbiana se deve ao fato dos alimentos terem diversos nutrientes e substratos metabolizáveis, reunindo condições ideais para o crescimento de micro-organismos. Normalmente, alguns micro-organismos que estão presentes nos alimentos não apresentam efeitos visíveis, sendo estes consumidos com pouca ou sem objeções e consequências. Entretanto, o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos nos alimentos pode levar a alterações na composição química, nas propriedades sensoriais e também na estrutura, podendo causar a degradação dos alimentos ou até mesmo doenças pela ingestão de alimentos contaminados (QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

As alterações que os micro-organismos causam nos alimentos não se limitam aos resultados da degradação, que também podem ser provocadas por produtos de síntese microbiana. Alguns micro-organismos alteram a cor dos alimentos devido à produção de pigmentos, outros podem formar substâncias mucilaginosas pela síntese de polissacarídeos, causando alterações na viscosidade do alimento ou ainda pode haver a produção de gases, o que acompanha alterações no pH (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

As perdas de alimentos constituem preocupação econômica notável para a indústria de alimentos, enquanto surtos de origem alimentar denotam grande ameaça para a saúde pública. A presença de micro-organismos que deterioram matérias-primas e produtos alimentares processados, devido à contaminação cruzada pode ser a principal razão para a perda de alimentos. Essa contaminação resulta em alterações das características nutricionais e sensoriais dos alimentos como a oxidação, a produção de sabores e odores indesejáveis, bem como alterações na textura e cor (SCHARFF, 2012).

A contaminação microbiana reduz o prazo de validade dos alimentos e aumenta o risco de doenças transmitidas. Doenças de origem alimentar são causadas principalmente pela ingestão de micro-organismos viáveis ou toxinas que estes produzem em quantidades suficientes para desenvolver a patologia. Essas doenças estão relacionadas ao consumo de alimentos que são manipulados, armazenados e acondicionados em más condições, permitindo, a exposição direta ao ambiente, proporcionando a contaminação e posterior veiculação desses patógenos aos consumidores (MÜRMAN et al. 2008).

Alguns micro-organismos deteriorantes como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* são os mais frequentes em

alimentos. Estes micro-organismos apresentam intensa atividade metabólica, degradando proteínas, gorduras, carboidratos e outros substratos, além de produzir pigmentos, causando alterações nas características químicas e sensoriais, representando o grupo de micro-organismos frequente em alimentos frescos, tanto de origem animal quanto vegetal. A presença em níveis elevados no término do processamento resulta na redução da vida útil dos produtos refrigerados, devido à produção do muco superficial, além de odores e sabores desagradáveis, sendo, portanto, seu estudo de grande importância para a indústria de alimentos (BAUZA et al., 2016).

3.2 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Uma alternativa aos métodos tradicionais de preservação dos alimentos como processamento térmico, secagem, congelamento, refrigeração, irradiação, embalagem em atmosfera modificada e sais de conservação são os compostos antimicrobianos, uma vez que, podem ser adicionados diretamente ou em embalagens de alimentos para impedir o crescimento de micro-organismos. Com a finalidade de fornecer garantia na segurança, extensão da vida útil e manutenção da qualidade dos alimentos, os antimicrobianos tem capacidade de inibir a ação microbiana e evitar doenças de origem alimentar (BASTARRACHEA; DHAWAN; SABLANI, 2011).

Um interesse na produção de compostos com atividades biológicas a partir de fontes naturais tem emergido, adicionado pelo aumento de estudos científicos que demonstram os efeitos benéficos destes compostos sobre a saúde (HERRERO et al., 2013). Tem surgido muitas pesquisas também para o desenvolvimento e extração de vários compostos que podem potencialmente ser utilizados como substâncias funcionais como os carotenoides, ficocianinas, polifenóis, ácidos graxos e compostos poli-insaturados (PLAZA et al., 2010).

Óleos essenciais são compostos naturais extraídos de plantas, muito utilizados como antimicrobianos contra patógenos de origem alimentar, uma vez que, esses óleos apresentam em sua composição terpenoides e compostos fenólicos voláteis. Os componentes ativos dos óleos essenciais têm capacidade de inibir micro-organismos através da ação na membrana citoplasmática, interrompendo a força motriz dos prótons, fluxo de elétrons, transporte ativo e inibindo a síntese de proteínas (SUNG et al., 2013).

Microalgas são uma fonte natural de compostos biologicamente ativos. As microalgas são conhecidas por produzir vários compostos eficazes que podem ser obtidos a

partir da biomassa ou liberados extracelularmente para o meio. A atividade antimicrobiana destes micro-organismos é devido à capacidade para sintetizar compostos, como os lipídios, polifenóis, proteínas e compostos poli-insaturados (BHAGAVATHY; SUMATHI; BELL, 2011).

O mecanismo de ação dos ácidos graxos afetam várias estruturas em micro-organismos, no entanto, as membranas celulares são as mais afetadas. Os danos das membranas conduzem a perda de substâncias internas das células, e a entrada de componentes prejudiciais reduzindo a absorção de nutrientes, em adição à inibição da capacidade respiratória. Os ácidos graxos celulares podem interferir no crescimento bacteriano devido ao comprimento da cadeia e o grau de insaturação. Os ácidos graxos com mais de 10 átomos de carbono induzem a lise de protoplastos bacterianos (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011).

3.3 MICROALGA *Spirulina*

A *Spirulina* (*Arthrospira*) (Figura 1) é uma microalga procariótica, que pertence a ordem Cyanophyceae e divisão Cyanophyta (Cyanobacteria). Apresenta arranjo diferenciado de tricomas cilíndricos multicelulares em espiral aberta em toda sua extensão. A forma helicoidal da tricomas é característica do gênero, mas o comprimento e tamanho da hélice variam com a espécie. Em 1981, *Food and Drug Administration* (FDA) emitiu certificado *Generally Recognized as Safe* e afirmou que a *Spirulina* pode ser legalmente comercializada como suplemento alimentar ou alimento sem risco para a saúde humana (COSTA; MORAIS, 2013).

Figura 1 - Microalga *Spirulina* sp. LEB 18



Fonte: Morais et al. (2014a)

A biomassa da *Spirulina* tem alto valor proteico e alta digestibilidade, contém também quantidades significativas de ácidos graxos essenciais poli-insaturados e compostos fenólicos (AMBROSI et al., 2008). Devido as propriedades, como o seu elevado valor

nutricional e a presença de compostos bioativos, este micro-organismo é uma das microalgas mais estudadas em todo o mundo. O teor de proteína de *Spirulina* varia de 50 a 70% (m m^{-1}) do sua massa seco, o teor de carboidratos de 10 a 20% (m m^{-1}) e o teor de lipídios de 5 a 10 % (m m^{-1}) (BORGES et al., 2013). Esta microalga apresenta em sua composição as vitaminas B1, B2, B12, E. Além disso, a *Spirulina* tem alto teor de pigmentos, minerais e oligoelementos (cerca de 6 a 9 % (m m^{-1}) da biomassa em massa seca), dos quais os mais importantes são o ferro, cálcio, magnésio, fósforo e potássio (COSTA; MORAIS, 2013). Alguns estudos demonstram o uso desta microalga para a produção de pigmentos, devido às suas propriedades antioxidantes (ANTELO; COSTA; KALIL, 2008; COLLA et al., 2007; SILVEIRA et al., 2007). β -caroteno representa aproximadamente 80% dos carotenoides presentes na *Spirulina* e outros componentes como tocoferóis, ficocianina, ficoeritrina também fazem parte da sua composição (PRIYADARSHANI; RATH, 2012).

As cianobactérias são conhecidas para a produção de metabólitos intracelulares e extracelulares com potenciais atividades biológicas como antibacteriano, antifúngico, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; RASTOGI; SINHA, 2009; SEMARY, 2012). As microalgas são fonte importante de antibióticos com atividade antibacteriana ampla e eficaz. A atividade destes micro-organismos é devido à capacidade para sintetizar compostos como ácidos graxos, compostos alifáticos halogenados, terpenoides, esteróis, compostos heterocíclicos contendo enxofre, carboidratos, acetogeninas e polifenóis (PRAKASH; JOHNSON; JEEVA, 2011).

A atividade antimicrobiana de extratos a partir de microalgas está relacionada à sua composição lipídica. A ação dessa atividade de microalgas também é notável por causa do potencial para produzir compostos como α - e β -ionona, β -ciclocitral, neofitadieno e fitol (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011). Além disso, a atividade antimicrobiana das microalgas em relação à patógenos humanos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, tem sido atribuída ao ácido γ -linoleico, ácido eicosapentaenoico, ácido hexadecatrienoico, ácido palmitoleico, ácido láurico, ácido láctico e o ácido araquidônico (SMITH; DESBOIS; DYRYNDA, 2010).

Os polissacarídeos microbianos e outros compostos biológicos têm ação antiviral e antimicrobiana. A cianobactéria *Spirulina* (*Arthrospira*) pode produzir polissacarídeos sulfatados que possui aplicações como agentes antivirais, tanto *in vivo* como *in vitro*. A capacidade antibacteriana da *Spirulina* foi correlacionada com a sua composição volátil, que resultou na identificação de 15 elementos, o que constitui 96 % de componentes voláteis

totais. Os principais produzidos por *Spirulina* consistem em heptadecano (40 %) e tetradecano (35 %) (PLAZA et al., 2009).

Desde 1996, o Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), executa um programa de pesquisa sobre o cultivo de *Spirulina*. Particularmente, a cepa de *Spirulina* sp. LEB 18 é estudada desde 2008, quando foi isolada. Desde então, vários estudos têm sido realizados com este micro-organismo como a utilização da biomassa como alimento, pigmentos com atividade biológica, biosurfactantes, produção de biocombustíveis e extração de biopolímero (MORAIS et al., 2015).

3.4 BIOPOLÍMERO E POLÍMEROS

3.4.1 Poli(hidroxitirato)

Os poli(hidroxicanoatos) (PHAs) são biopolímeros que podem ser produzidos e acumulados por diversos micro-organismos como mecanismo de armazenamento de energia (MA et al., 2014). As suas características de degradação térmica, temperatura de fusão e propriedades mecânicas são semelhantes aos do polipropileno e pode ser utilizado como alternativa aos materiais termoplásticos de origem petroquímica (BUGNICOURT et al., 2014). Quando degradados por micro-organismos, os PHAs formam dióxido de carbono e água, que podem ser reintegrados à natureza e completar o ciclo do carbono (BALAJI et al., 2013).

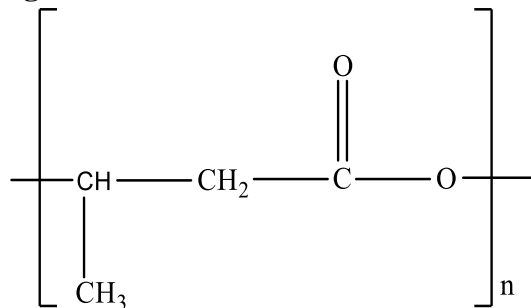
PHAs são biodegradáveis e não produzem quaisquer substâncias tóxicas durante sua degradação. No ambiente, as bactérias e os fungos secretam polimerase extracelular que degrada PHAs poliméricos em seus monômeros. A taxa de degradação de PHAs depende de muitos fatores. Alguns fatores, como temperatura, umidade, pH e fornecimento de nutrientes, estão relacionados com o meio ambiente, enquanto outros fatores, como a composição de aditivos, cristalinidade e área de superfície, são intrínsecos ao biopolímero (SHARMA; MUDHOO, 2011).

O poli(hidroxitirato) (PHB) (Figura 2) é o representante mais estudado do grupo dos PHAs, principalmente, porque este poliéster de base biológica e biodegradável pode ser produzido pela microalga *Spirulina*. Sendo que pode ser acumulado como armazenamento de energia/carbono ou reduzindo o material de reserva por micro-organismos sob condições de crescimento desfavoráveis como a limitação da fonte de carbono ou energia (GARCÍA et al., 2014; PUGLIA et al., 2014). Durante a síntese de PHB, duas moléculas de acetil-CoA redutase são unidas por reação de condensação, catalisada pela enzima 3-β-

cetotiolase para formar acetoacetil-CoA. Esta enzima compete com a acetil-CoA em outras vias metabólicas, como a formação do acetato e o citrato e a síntese de ácidos graxos (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

O produto é reduzido para 3-hidroxi-butiril-CoA, em uma reação catalisada por acetoacetil redutase dependente de NADPH. Elevadas concentrações de NADPH e NADH inibem a enzima citrato sintase, que é responsável pela acetil-CoA entrar no ciclo tricarboxílico, disponibilizando acetil-CoA para a 3-β-cetotiolase e assim, permitindo o PHB ser sintetizado através da polimerização de unidades de 3-hidroxi-butiril-CoA por PHA sintase (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Figura 2 - Estrutura do monômero do PHB



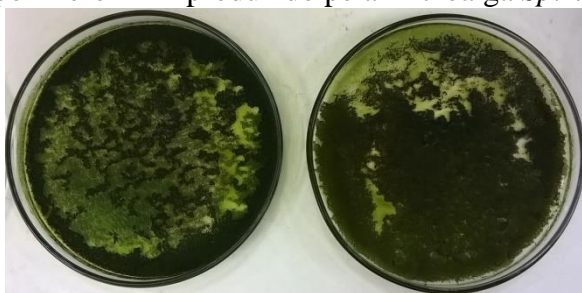
Fonte: Plackett e Siró (2011)

O PHB apresenta propriedades semelhantes as dos plásticos convencionais como resistência à água (insolúvel e impermeável), estabilidade sob circunstâncias de armazenamento normais e durante o seu uso. Além disso, apresenta boa estabilidade à radiação ultravioleta, porém, devido a sua alta cristalinidade, combinada com baixa taxa de nucleação durante a cinética de cristalização, apresenta baixa resistência à tração, o que o limita em certas aplicações (CORRÊA et al, 2008).

Devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade com células e tecidos, o PHB tem forte potencial para utilização no desenvolvimento de nanofibras nas áreas de alimentos e medicamentos. Arrieta et al. (2015) desenvolveram nanofibras com blenda de PHB e poli (ácido láctico) e realizaram a caracterização morfológica, estrutural, mecânica e térmica do material desenvolvido. Dessa forma, através das análises observou-se que a adição do PHB proporcionou nanofibras uniformes e o teste de desintegração sob condições de compostagem confirmou o carácter biodegradável do material. Então, as nanofibras deste estudo mostraram potencial para a utilização como materiais flexíveis sustentáveis para aplicações em embalagens de alimentos.

Desde 2007, a equipe do LEB estuda a obtenção de PHB (Figura 3) a partir de microalgas. Estes estudos investigaram diferentes gêneros e espécies de microalgas que produzem este biopolímero, bem como a caracterização físico-química (microscopia eletrônica de varredura, cromatografia gasosa, análise térmica, calorimetria diferencial de varredura, cor e opacidade), a otimização do processo de extração/purificação e as aplicações do biopolímero no desenvolvimento de nanofibras (MORAIS et al., 2014b). Além disso, foram realizados estudos com PHB no desenvolvimento de nanofibras (MARTINS, 2014; MORAIS et al., 2015), na síntese deste biopolímero através de cultivo com diferentes concentrações de nutrientes (COELHO, 2013), na avaliação do rendimento do biopolímero (MOREIRA, 2014) e na produção cíclica de PHB pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18, utilizando resíduo da extração do biopolímero (SILVA, 2016).

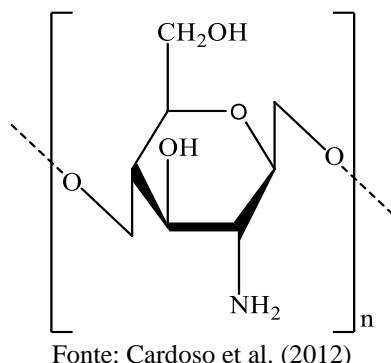
Figura 3 - Biopolímero PHB produzido pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18



Um importante estudo com o biopolímero foi desenvolvido por Morais et al. (2015) em que se realizou a produção de nanofibras de PHB microalgal com adição de biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Neste estudo, foi possível desenvolver nanofibras com 30 e 35 % de PHB e 5 % de biomassa microalgal, apresentando resultado desejável para a aplicação das nanofibras nas áreas médica e alimentar, porque os componentes ativos na microalga são preservados e estes podem ser úteis para o crescimento celular e o desenvolvimento de embalagens comestíveis.

3.4.2 Quitosana

A quitosana, β -(1-4)-D-glicosamina (Figura 4), é a forma parcialmente desacetilada da quitina, β -(1-4)-N-acetil-D-glicosamina, que é um polímero encontrado principalmente nos exoesqueletos de crustáceos, insetos e parede celular de fungos. Este material apresenta propriedades de biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, baixa toxicidade, hidrofiliabilidade e alta resistência mecânica (JAYAKUMAR et al., 2011; NGAH, TEONG, HANAFIAH, 2011).

Figura 4 - Estrutura do monômero da quitosana

Fonte: Cardoso et al. (2012)

A quitosana é facilmente solúvel em meio ácido e tem a capacidade de formar interações químicas com materiais hidrofóbicos e aniônicos. A presença de numerosas pontes de hidrogênio, intermoleculares e intramoleculares nas moléculas de quitosana contribuem para o caráter semicristalino do polímero. Além disso, faz com que ela não apresente nenhum ponto de fusão, sendo solúvel apenas em pH na faixa ácida. Por conter um par de elétrons livres no nitrogênio possui capacidade de formar complexos com polímeros e metais, dentre estes o cobre, o zinco e o magnésio (CARDOSO et al., 2012).

Devido à sua atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, a quitosana tem grande potencial para aplicações na agricultura, medicina, odontologia, farmacêutica, biomédica, alimentos, tratamento de águas e cosméticos (BUKZEN, 2013). Em biotecnologia, a quitosana pode ser aplicada como conservante em embalagem, matrizes cromatográficas para suporte de imobilização de enzimas, membranas para filtração e revestimentos com atividade antioxidante e antimicrobiana (CUNHA, 2011).

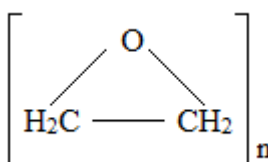
O mecanismo antimicrobiano da quitosana está relacionado com interações dos cátions do polímero com os ânions das membranas celulares dos micro-organismos, aumentando a permeabilidade da membrana e, eventualmente, resultando na ruptura e liberação do material intracelular. Wang et al. (2012) produziram nanofibras de quitosana com nanopartículas de óxido de zinco e observaram que a ação antimicrobiana do nanoestruturado foi devido a fatores como adesão das nanofibras em membranas celulares por meio de atração eletrostática levando a desnaturação de proteínas e alterações de permeabilidade.

Liu et al. (2015) produziram nanofibras usando uma mistura de PVA e quitosana com nanopartículas de prata para uso em membranas antibacterianas. O comportamento de libertação de íons de prata indicou que estas nanofibras têm atividade antibacteriana durante um período de 16 dias. Além disso, estes materiais compósitos têm eficácia contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3.4.3 Poli (óxido de etileno)

O poli (óxido de etileno) (PEO) (Figura 5) é solúvel em água e esta característica torna possível a utilização deste polímero sintético em uma variedade de estudos. A solubilidade aquosa é devido a presença do monômero na composição molecular do PEO (HAMMOUDA; HO; KLINE, 2004). Com baixa massa molecular (menor que 1000 g mol^{-1}), o PEO constitui um líquido viscoso e incolor, enquanto que em elevada massa este polímero apresenta-se sob a forma de um sólido branco com ponto de fusão proporcional a massa molecular com limite superior de $67 \text{ }^\circ\text{C}$ (BAILEY; KOLESKE, 1976).

Figura 5 - Estrutura do monômero do PEO



Fonte: Martins e Cardoso (2005)

Zhou, Wang e Wu (2012) obtiveram nanofibras de PEO com nanocristais de celulose (CNCs) para determinar o efeito do tempo de irradiação triacrilato de pentaeritritol (PETA) como fotoiniciador e incorporação de CNCs. Os resultados experimentais mostraram que a irradiação ultravioleta não teve efeito negativo sobre o diâmetro da nanofibra de PEO. Além disso, a irradiação não induziu efeito significativo no diâmetro das nanofibras de PEO com PETA. As nanofibras de PEO/PETA e incorporadas por CNCs tornaram-se mais uniformes e de menor diâmetro com o aumento do teor de CNCs sendo 10% em massa. As nanofibras exibiram melhoria nas propriedades mecânicas atribuídas ao entrelaçamento do PEO com os CNCs.

Nanofibras de quitosana e PEO foram produzidas por Pakravan, Heuzey e Aji (2011), os quais prepararam soluções de quitosana e PEO com concentração total de 4 % em diferentes proporções (0/100; 50/50; 80/20 e 90/10 quitosana/PEO) e adicionalmente, verificou-se que o teor mais elevado de quitosana (90/10) nas soluções resultaram em nanofibras com menores diâmetros. A produção de membranas de nanofibras uniformes através do processo de *electrospinning* e com elevado teor de quitosana tem potencial para aplicação como embalagens antibacterianas e membranas filtrantes.

Rieger e Schiffman (2014) incorporaram 0,5% e 5,0% de cinamaldeído (CA), um óleo essencial volátil, em nanofibras de quitosana/PEO. Os resultados demonstraram que a citotoxicidade depende do tempo, e a atividade antibacteriana intrínseca do quitosana

juntamente com a liberação rápida de CA permitiu altas taxas de inativação contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, as nanofibras de quitosana/PEO com CA oferecem potencial como *scaffolds* que podem aliviar infecções através da liberação de agente antimicrobiano natural de largo espectro.

Morais et al. (2010) produziram nanofibras de PEO com biomassa da microalga *Spirulina*, devido que esta oferece funções biológicas favoráveis para a engenharia de tecidos. Dessa forma, *scaffolds* altamente porosos foram produzidos por *electrospinning* contendo biomassa de *Spirulina*. Os resultados experimentais revelam que o sistema PEO/biomassa produziu nanofibras com diâmetros em torno de 110 nm para diferentes teores de biomassa de até 67% em massa das nanofibras e para concentrações de PEO na solução abaixo de 4% em massa.

3.5 NANOTECNOLOGIA EM ALIMENTOS

A nanotecnologia envolve a caracterização, fabricação e manipulação de estruturas, dispositivos ou materiais que tem pelo menos uma dimensão em escala que varia desde o tamanho de um átomo individual a moléculas de até 999 nm. Quando o tamanho da partícula é reduzido, o material resultante apresenta propriedades físicas e químicas que são significativamente diferentes das propriedades de materiais em macroescala constituídos pela mesma substância. Esta diferença resulta em aumento da reatividade da superfície, maior condutividade elétrica e melhores propriedades magnéticas (BRIDLE, 2014).

No que diz respeito às técnicas de fabricação, a nanotecnologia permite melhora na qualidade de produção e nas características dos materiais, devido ao rearranjo dos átomos. Assim, é possível fabricar materiais mais compactos, utilizando-se menos matéria e, conseqüentemente, diminuindo os custos de produção (BUSHAN, 2004). Dessa forma, a nanotecnologia recentemente tem sido explorada para várias aplicações, incluindo biotecnologia, medicamentos, catálise, eletrônica, alimentos, cosméticos e criação de novos têxteis e materiais.

A nanotecnologia emergiu como o avanço tecnológico para desenvolver e transformar o setor agroalimentar, com o potencial para aumentar a produção global de alimentos, garantir a qualidade e a segurança dos produtos (MOUSAVI; REZAEI, 2011). Dessa forma, cientistas e representantes da indústria identificaram os usos potenciais da nanotecnologia em praticamente todos os segmentos da indústria de alimentos, da agricultura

para o processamento de alimentos, como o encapsulamento de sabor, em embalagens de alimentos e suplementos nutricionais (DUNCAN, 2011).

Novos produtos alimentícios contendo nanoestruturas estão sendo desenvolvidos para diferentes finalidades, como proteger nutracêuticos contra a degradação durante a fabricação, distribuição e armazenamento, aumentar a estabilidade e a biodisponibilidade de nutrientes funcionais pouco solúveis. Além disso, para aumentar a vida útil dos alimentos protegendo-os de fatores externos, para aperfeiçoar e modificar as características sensoriais dos produtos criando novas sensações de consumo e para controlar o fornecimento funcional do nutriente (LECLERCQ; HARLANDER; REINECCIUS, 2009; RAO; MCCLEMENTS, 2012). Essas características são devido a novos materiais de embalagem de alimentos que melhoram as propriedades mecânicas, de barreira, térmicas e antimicrobianas, além dos nanossensores que detectam o estado dos alimentos durante o transporte e armazenamento (CHAUDHRY et al., 2008).

3.6 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Existem diferentes métodos para obtenção das nanofibras, como *electrospinning*, *drawing*, *template synthesis*, separação por fases e *self-assembly*. Cada método apresenta características específicas que devem ser analisadas para que seja escolhida a técnica que melhor atenda as necessidades do processo. A técnica do *electrospinning* produz películas compostas por redes ultrafinas de fibras poliméricas com diâmetros abaixo da medida micrométrica atingindo a escala dos nanômetros (999 nm). O diâmetro nanométrico proporciona as nanofibras área de superfície maior em relação ao volume, o tamanho dos interstícios e a elevada porosidade possibilitam aplicação em diversas áreas industriais como embalagens de alimentos e membranas de filtração (NICOSIA et al., 2015; TONCHEVA et al., 2014). As nanofibras também têm a capacidade mecânica (resistência à tração e rigidez) superior em comparação com macromateriais, além de alta flexibilidade e funcionalidade na superfície. O aumento da flexibilidade da fibra devido ao diâmetro permite que exista maior maleabilidade da nanofibra sem sofrer ruptura na sua estrutura (RAMAKRISHNA et al., 2010).

As nanofibras podem ser caracterizadas de acordo com a estrutura geométrica e química. As propriedades geométricas como diâmetro, distribuição do diâmetro, orientação e morfologia das nanofibras podem ser determinadas através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e microscopia de força atômica (UNNITHAN et al.,

2012). Outro parâmetro é a porosidade geométrica, em que o tamanho dos poros das membranas de nanofibras são importantes para aplicações em filtração e engenharia de tecidos. A medida do tamanho dos poros pode ser realizada por parâmetro de fluxo capilar (SINGH; WAHID, 2014).

A caracterização química como estrutura molecular pode ser determinada por técnicas de ressonância magnética nuclear e espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (HUANG et al., 2000). Quando dois tipos de polímeros são utilizados para a produção de nanofibras, a estrutura dos dois materiais e a interação intermolecular pode ser determinada. A estrutura supramolecular descreve a configuração das macromoléculas nas nanofibras, e pode ser caracterizada por birrefringência óptica, difração de raios-X e calorimetria diferencial de varredura (ZUSSMAN; YARIN; WEIHS, 2002).

As nanofibras podem ser produzidas a partir de diferentes materiais como polímeros, carbono, cerâmica e metal. Os estudos apresentam uma variedade de polímeros naturais como poli (hidroxibutirato), quitosana, quitina, celulose, colágeno, ácido hialurônico, gelatina e fibrina e polímeros sintéticos como álcool polivinílico, óxido de polietileno, poli (ácido láctico), poliamida, poli (ácido láctico-co-glicólico), poliácridonitrila e policaprolactona. Esses polímeros são os mais utilizados para a produção de nanofibras por *electrospinning*, em que a solução do polímero requer solvente relativamente volátil como etanol, água, clorofórmio, isopropanol, tetra-hidrofurano ou N, N-dimetilformamida (ANDRADY, 2008).

As nanofibras desenvolvidas a partir de polímeros naturais e sintéticos podem ser aplicadas em alimentos, além de ser adicionados compostos com atividades biológicas como antimicrobiana e antioxidante que ajudam a embalagem a interagir com o alimento de forma desejável, protegendo os produtos alimentares do ambiente externo e proporcionando maior segurança alimentar para o consumidor. Wen et al. (2016) produziram nanofibras com álcool polivinílico (PVA) e β -ciclodextrina (β -CD) adicionadas de óleo essencial de canela (CEO). Neste estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana das nanofibras em morangos e obteve-se como resultado a concentração mínima inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* de aproximadamente $0,9-1 \text{ mg mL}^{-1}$ e mínima concentração bactericida de aproximadamente $7-8 \text{ mg mL}^{-1}$. Além disso, o processo de *electrospinning* favoreceu a manutenção do CEO por mais tempo nas nanofibras e, por isso, resultando em atividade antimicrobiana melhorada em comparação com filme polimérico testado. Portanto, nanofibras de PVA/CEO/ β -CD podem efetivamente prolongar a vida útil dos morangos, indicando potencial aplicação em embalagens de alimentos.

Wang, Yue e Lee (2015) realizaram um estudo sobre a preservação da bioatividade de pleurocidina quando aplicada em alimentos, incorporando-a em nanofibras de *electrospinning*. O resultado *in vitro* demonstrou que a pleurocidina incorporada às nanofibras tem atividade de inibição contra agentes patogênicos nos alimentos. Além disso, este material produziu elevada inibição contra *Escherichia coli*, principalmente devido à proteção que as nanofibras poliméricas forneceram, evitando a influência negativa dos componentes ambientais externos.

Park e Kim (2015) obtiveram nanofibras de PVA contendo 2,6 % de cloreto de benzil trietilamônio (BTEAC) como composto antimicrobiano. As atividades antimicrobianas dos nanofibras foram testadas contra bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Escherichia coli*). O material inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

Liu et al. (2015) produziram nanofibras utilizando uma mistura de PVA e quitosana com nanopartículas de prata para uso em membranas antibacterianas. O comportamento de liberação de íons de prata indicou que estas nanofibras têm atividade antibacteriana ao longo de 16 dias, e que este material tem eficácia contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

No laboratório de Microbiologia e Bioquímica (MIBI) da FURG a produção de nanofibras por *electrospinning* iniciou-se com Morais (2008) que realizou o desenvolvimento deste material com o PHB microalgal. Desde então, vários outros estudos têm sido realizados como Martins (2014) que produziu nanofibras de PHB microalgal purificado. Rocha (2014) desenvolveu nanofibras de isolado proteico de bijupirá com PEO e Gonçalves (2015) produziu nanofibras de policaprolactona (PCL) com biopeptídeos microalgais para o desenvolvimento de embalagens ativas de alimentos.

Schmatz et al. (2016) e Uebel et al. (2016) também estudaram o desenvolvimento de nanofibras no MIBI com os polímeros PCL e blenda de PCL e poli(hidroxibutirato co-hidroxivalerato). Estes autores adicionaram compostos bioativos como quercetina, curcumina e biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 para produzir um biomaterial com atividade antioxidante e aplicação em engenharia de tecidos como *scaffolds*.

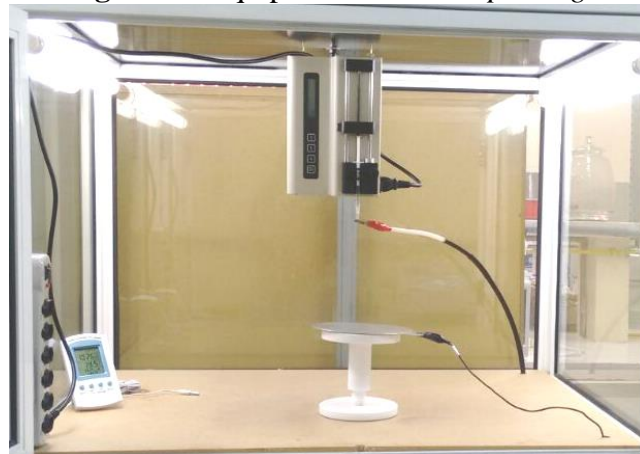
3.7 PROCESSO DE ELECTROSPINNING

O *electrospinning* (Figura 6) é o método mais versátil e prático, que pode ser usado para a fabricação de nanofibras devido à sua capacidade para controlar a composição,

estrutura e propriedades funcionais através de uma abordagem relativamente simples e de baixo custo (KRIEGEL et al., 2008; PEPONI et al., 2008; SONSECA et al. 2012; GARCÍA et al., 2014). A principal desvantagem das técnicas em relação ao *electrospinning* é a impossibilidade de aumentar a escala, o que dificulta as pesquisas que visam superar os limites laboratoriais e atingir a indústria (STEFFENS et al., 2013).

A técnica de *electrospinning* foi patenteada por Formhals (1934), neste estudo foi delineado um teste experimental para a produção de polímeros filamentosos utilizando força eletrostática. O *electrospinning* consiste na aplicação de alta tensão à solução de polímero, que resulta na formação de nanofibras por meio da repulsão de cargas eletrostáticas e alongamento da solução.

Figura 6 - Equipamento *electrospinning*



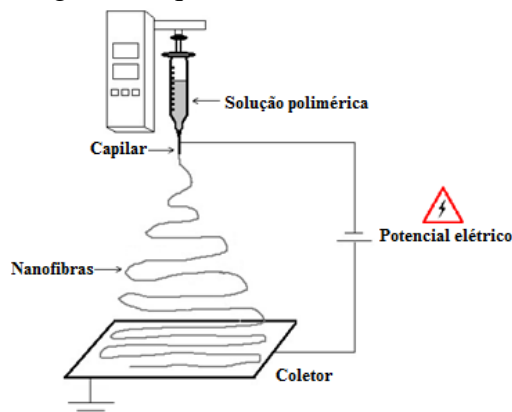
O equipamento *electrospinning* é composto por um injetor no qual é colocada a solução de polímero, dois eletrodos e suprimento de alta tensão (Figura 7). O processo utiliza forças eletrostáticas para transformar a gota pendente da solução polimérica em fibra, seguida por deposição sobre o coletor (FRENOT; CHRONAKIS, 2003). O polímero em fase líquida é expelido a partir do capilar em taxa constante por bomba de seringa a qual forma a gota na ponta. Quando o pequeno volume de líquido de polímero é exposto ao campo elétrico, a gota se estende em direção ao ponto potencial inferior mais próximo, formando uma estrutura conhecida como cone de Taylor (YARIN; KOOMBHONGSE; RENEKER, 2001).

Quando o campo elétrico atingir o valor crítico em que as forças elétricas ultrapassam a tensão superficial da gota na ponta do cone de Taylor, o jato de fluido de polímero líquido é ejetado (DOSHI; RENEKER, 1995). Então, o jato é alongado como hélice em expansão durante o processo entre a ponta do capilar e o coletor.

O *electrospinning*, portanto, produz fibras poliméricas com diâmetros na escala nanométrica. Uma variedade de formas e tamanhos de seção transversal da fibra pode ser

obtida a partir de diferentes soluções poliméricas e controle das condições de processo e ambiente (Tabela 1).

Figura 7 - Diagrama esquemático da técnica de *electrospinning*



Fonte: Ghorani e Tucker (2015)

Tabela 1 - Parâmetros do *electrospinning*.

Parâmetros	Propriedades
Solução	Viscosidade Solvente Condutividade Tensão superficial Massa molar do polímero Concentração do polímero
Variáveis do processo	Distância do capilar ao coletor Diâmetro do capilar Potencial elétrico Taxa de alimentação Composição do coletor
Ambiente	Umidade relativa Temperatura

3.7.1 Propriedades da solução polimérica

Um dos principais parâmetros que influenciam o diâmetro e morfologia da nanofibra é a natureza da solução polimérica (TEO; RAMAKRISHNA, 2006). O diâmetro e a capacidade para a formação de gotas ao longo das nanofibras individuais são ajustadas pela tensão superficial e a viscosidade da solução (SPASOVA et al., 2006). As propriedades da solução podem ser divididas em concentração e massa molar do polímero, tensão superficial, condutividade, viscosidade e solvente da solução.

A viscosidade da solução polimérica varia de acordo com a concentração do polímero e este parâmetro é considerado determinante em relação à forma e diâmetro das

nanofibras. O incremento da concentração de polímero pode proporcionar aumento no diâmetro das nanofibras (ZHANG et al., 2005).

A solução com alta massa molar causa aumento da resistência do polímero à dissolução pelo solvente e como consequência, aumenta a viscosidade. O aumento da viscosidade irá dificultar a ejeção da solução através do capilar, devido ao solvente que irá evaporar antes que o *electrospinning* inicie. Por outro lado, em baixa viscosidade é possível ocorrer a formação de gotas ao longo das nanofibras depositadas no coletor (YANG et al., 2010).

O solvente utilizado na preparação da solução tem como função inicial promover a dissolução do polímero. A interação intermolecular (atração ou repulsão) em um sistema polímero/solvente é dependente do tipo de solvente e, conseqüentemente, possui influência na produção das nanofibras. O solvente utilizado deverá ter boa volatilidade e manter a integridade da solução. A pressão de vapor do solvente tem influência na taxa de evaporação e no tempo de secagem das nanofibras. Através de análise termogravimétrica das nanofibras é possível observar se houve a eliminação completa do solvente durante o *electrospinning* (YAO et al., 2013).

O aumento da condutividade da solução contribui para produção de nanofibras uniformes, com menor quantidade de gotas em virtude do aumento do número de cargas carregadas pelo jato durante o *electrospinning*. No entanto, caso a solução polimérica não seja condutiva, não ocorrerá a eletrofiação (KOSKI; YIM; SHIVKUMAR, 2004).

Uma forma de aumentar a condutividade de soluções poliméricas é realizar a adição de sais, como cloreto de lítio, nitrato de sódio, cloreto de cálcio e cloreto de sódio, sendo o mais utilizado. Morais et al. (2010) estudaram a adição de 2,2 % de cloreto de sódio nas soluções de poli(hidroxibutirato) e poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), como resultado obtiveram a redução de 36,3 % no diâmetro das nanofibras. Outra forma estudada para diminuir o diâmetro médio das nanofibras é alterar o pH das soluções poliméricas. Conforme pesquisa de Lugo e Lim (2012), soluções de poli(óxido) de etileno ácidas (pH=1) resultaram na produção de nanofibras lisas (700 ± 105 nm), enquanto que com soluções neutras (pH=7) produziram esferas ($2,0 \pm 1,0$ μ m) ligadas em nanofibras ultrafinas (138 ± 32 nm).

A tensão superficial é a principal força opondo-se a tensão aplicada durante a técnica de *electrospinning*. A alta tensão irá proporcionar cargas à solução e juntamente com o campo elétrico externo proporcionará o início do processo, demonstrando que a tensão superficial foi superada. Durante o início do *electrospinning* ocorre a formação de gota de

solução na ponta do capilar, que é alongada e dá origem ao cone de Taylor. Taylor (1964), concluiu que a interface cônica entre o ar e o fluido é estável em um ângulo de $49,3^\circ$. Quando a tensão superficial é alta, o *electrospinning* é inibido, o volume da gota diminui e faz com que o cone de Taylor recue, devido a instabilidade dos jatos e também a geração de gotículas pulverizadas. Por outro lado, na maioria das vezes as soluções de baixa tensão superficial evitam a formação de gotas nas nanofibras. Geralmente, tensões acima de 6 kV são requeridas para formação de nanofibras, os efeitos da tensão utilizada sobre a solução polimérica durante o *electrospinning*.

A solubilidade de polímeros sintéticos aumenta à medida que a massa molar do polímero diminui. Assim, uma determinada concentração mínima de polímero é necessária para facilitar a formação de nanofibras durante o *electrospinning*. Enquanto, que a solução continue com viscosidade suficientemente baixa para permitir a formação de jato (SHENOY et al., 2005).

Em concentrações baixas de polímero, o processo de *electrospinning* torna-se insuficiente para formação de nanofibras através da solução. À medida que a concentração de polímero aumenta, obtém-se a mistura de gotas e nanofibras. Qualquer aumento adicional na concentração de polímero na solução há como resultado a formação de nanofibras contínuas. No entanto, a concentração de polímero não pode ultrapassar um limite superior, porque a elevada viscosidade da solução impede que o processo aconteça (SHENOY et al., 2005).

3.7.2 Condições do processo

A distância entre o capilar e o coletor tem influência no alongamento do jato de solução polimérica que afeta o diâmetro e a forma das nanofibras, assim como no tempo que as nanofibras precisam para que ocorra a evaporação do solvente antes de atingirem o coletor. As distâncias utilizadas para a produção de nanofibras, geralmente, variam entre 10 e 25 cm (KUMAR et al., 2012). Aumentar a distância entre o capilar e o coletor resulta em tempo maior para evaporação do solvente, o que tende a diminuir a formação de gotas e o diâmetro médio da nanofibra (LIN et al., 2008).

No entanto, com potencial elétrico fixo, o aumento na distância contribui para a diminuição da intensidade do campo eletrostático e afeta incisão do jato no coletor. Portanto, com o aumento progressivo da distância, o diâmetro médio das nanofibras atinge o valor mínimo antes de aumentar novamente com o aumento da distância (LIN et al., 2008). Além disso, o efeito de diminuir a distância tem comportamento similar como o aumento do

potencial elétrico sobre a morfologia e diâmetro da nanofibra (CHOWDHURY; STYLES, 2010).

Ying et al. (2006) relataram que, se a umidade do ambiente for baixa, aumentar a distância entre o capilar e o coletor pode resultar na redução do diâmetro da nanofibra, porque o solvente evapora mais sobre maior distância. Por outro lado, quando a umidade do ambiente for elevada o aumento da distância não aumenta a taxa de evaporação do solvente, mas reduz a intensidade do campo eletrostático.

O diâmetro interno do capilar reduz a ocorrência de obstrução, bem como a quantidade de gotas nas nanofibras. Esta redução pode ser devido à menor exposição da solução durante o *electrospinning*. Quando o tamanho da gota na ponta do orifício é reduzido, tal como no caso de pequenos diâmetros do capilar (0,45 mm), a superfície de tensão na gota aumenta e o diâmetro das nanofibras diminui. A utilização de dois capilares para produção de nanofibras, simultaneamente, pode ser empregada para preparar mistura de polímeros (TEO; RAMAKRISHNA, 2006).

A taxa de alimentação determina a quantidade de solução disponível para o *electrospinning*. O aumento da taxa de alimentação provoca o aumento no diâmetro das nanofibras ou no tamanho das gotas, necessitando que seja fornecida maior tensão. A taxa de alimentação também influencia na secagem das nanofibras durante o percurso até o coletor. Se for alta, pode não permitir tempo suficiente para a evaporação do solvente, resultando em nanofibras contendo resíduos de solvente (TEO; RAMAKRISHNA, 2006).

O principal parâmetro em qualquer processo de *electrospinning* é a aplicação de alto potencial elétrico na solução polimérica. A variação nesta tensão controla a intensidade do campo elétrico entre o capilar e o coletor. A carga é aplicada à solução e o campo elétrico externo só inicia o processo quando a força eletrostática na solução ultrapassa a tensão superficial da solução (MAZOOCHI; JABBARI, 2011).

Dependendo da taxa de alimentação da solução, potencial elétrico mais elevado pode ser necessário para a estabilização do cone de Taylor formado (ZONG et al., 2002). Geralmente, potencial maior que 6 kV tem a capacidade de distorcer a gota de solução na forma de cone de Taylor durante o início do jato no processo (TAYLOR, 1964). Além disso, o equilíbrio entre a tensão superficial e a força elétrica determina o início da formação do cone através da solução polimérica no capilar (ZONG et al., 2002).

Se o potencial elétrico aplicado for mais elevado, o jato irá acelerar devido a maior quantidade de carga e maior volume de solução será ejetada a partir do capilar. Isto pode resultar em cone de Taylor menor e menos estável (MAZOOCHI; JABBARI, 2011).

Porém, a medida que a viscosidade da solução aumenta, maior força é necessária para ultrapassar a tensão superficial e a força viscoelástica para atenuar o jato e formar nanofibras (DOSHI; RENEKER, 1993).

O tipo de material selecionado para o coletor afeta o grau da carga de superfície durante o processo de *electrospinning*. Para aumentar a densidade das nanofibras depositadas, sugere-se a utilização de coletor de material altamente condutor. Isto é importante, porque a deposição de nanofibras sobre o coletor é inversamente proporcional à acumulação de carga na superfície do coletor (CHOWDHURY; STYLES, 2010).

O coletor além de ser material condutivo, deve ser aterrado para criar diferença de potencial estável entre o capilar e o coletor. O coletor construído a partir de material não condutor resulta na redução da quantidade de fibras depositadas e também apresentam menor densidade de empacotamento. O coletor também pode ser estático ou rotatório sendo seu uso empregado conforme o objetivo da pesquisa, o coletor rotatório auxilia no processo de evaporação do solvente, na uniformidade e redução do diâmetro das fibras (WANG et al., 2005).

3.7.3 Condições do ambiente

Parâmetros ambientais, particularmente umidade e temperatura, influenciam a morfologia da nanofibra e a eficiência do processo de *electrospinning*. Existe uma relação direta entre a evaporação do solvente e a temperatura, bem como entre a condutividade do solvente e a temperatura. Ambos podem influenciar a capacidade do processo de formação das nanofibras através da solução polimérica (CHEN; YU, 2010). Além disso, a viscosidade do polímero e a tensão superficial da solução são influenciadas pela temperatura (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

A umidade relativa do ambiente tem efeito sobre a evaporação do solvente e formação de poros na superfície das nanofibras. Casper et al. (2004) estudaram o efeito da umidade durante o *electrospinning* de fibras de poliestireno, e obtiveram como resultado fibras lisas e sem poros na superfície em baixa umidade relativa (25 %). Por outro lado, acima de 30 % de umidade relativa, os poros começaram a aparecer na superfície das fibras. Tripatanasuwan, Zhong e Reneker (2007) relataram que o diâmetro das nanofibras de poli(óxido) de etileno diminuiu de 253 nm para 144 nm quando a umidade relativa aumentou de 4 % para 48 %. Devido à influência da umidade relativa sobre a produção das fibras, este parâmetro deve ser controlado e monitorado durante o *electrospinning*.

Vrieze et al. (2009) mostraram que o diâmetro médio das nanofibra é influenciado pela umidade. Neste estudo foi observado aumento no diâmetro as nanofibras de acetato de celulose com o aumento da umidade, enquanto que com polivinilpirrolidona, houve redução no diâmetro. Além disso, o aumento da umidade pode afetar a distribuição do tamanho dos poros sobre as nanofibras e o aumento da temperatura pode causar efeitos no diâmetro das nanofibras (CASPER et al., 2004). Demir et al. (2002) relataram diferenças na uniformidade do diâmetro das fibras com a temperatura. Neste estudo, o processo de *electrospinning* com solução de poliuretano em altas temperaturas ocasionou maior uniformidade do diâmetro, independentemente do campo eletrostático aplicado.

A temperatura da solução tem a função de aumentar o efeito da taxa de evaporação e reduzir a viscosidade da solução. Soluções de baixa viscosidade proporcionam nanofibras de pequeno diâmetro. O mesmo também ocorre quando aumenta a mobilidade das moléculas do polímero devido ao aumento da temperatura. Vrieze et al. (2009) verificaram que o aumento da temperatura possibilitou que a taxa de evaporação do solvente ocorresse de forma mais rápida. Em temperaturas mais altas também se obteve a redução da viscosidade das soluções poliméricas. A variação dos diâmetros médios das nanofibras em função da umidade ocorreu de forma diferente para nanofibras de celulose e poli(vinilpirrolidona), o que pode ser explicado através da influência sobre a taxa de evaporação do solvente que as interações químicas e moleculares provocam. O incremento da umidade provocou o aumento do diâmetro médio das nanofibras de celulose, enquanto que para nanofibras de poli(vinilpirrolidona) o diâmetro médio diminuiu.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação dos alimentos ainda é um desafio para pesquisa na área de nanotecnologia. Estudos a respeito do tema estão sendo realizados para controlar microorganismos e garantir a conservação dos alimentos através do emprego de compostos antimicrobianos de origem natural, que não causam toxicidade para humanos e meio ambiente. Além disso, novos produtos alimentícios utilizando nanofibras estão sendo desenvolvidos para proteger os alimentos durante a fabricação, distribuição, armazenamento e para aumentar a vida útil dos produtos. Nanofibras produzidas por *electrospinning* com biopolímero PHB e polímeros como quitosana e PEO têm potencial para aplicação em embalagens de alimentos, pois são alternativas aos plásticos de origem petroquímica por apresentarem biodegradabilidade. Além disso, quando aliadas aos compostos com atividade

antimicrobiana extraídos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 fornecem capacidade de proteger o alimento de fatores externos e inibir o crescimento microbiológico.

CAPÍTULO III

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido em 3 artigos:

Artigo 1: **“Atividade antibacteriana de compostos fenólicos extraídos da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18”**

Artigo 2: **“Poli(hidroxibutirato) e compostos fenólicos microalgais para produção de nanofibras com atividade antibacteriana”**

Artigo 3: **“Compostos fenólicos microalgais com ação antibacteriana adicionados em nanofibras de quitosana e PEO”**

Na primeira etapa deste trabalho (Artigo 1) foi realizado a extração dos compostos fenólicos da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando o método de Souza et al. (2011). A atividade antibacteriana dos compostos fenólicos foi testada qualitativamente e quantitativamente através dos métodos de difusão com discos e macrodiluição para definir a concentração inibitória mínima. Os dois métodos foram realizados com as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Após os testes microbiológicos, os compostos fenólicos foram quantificados através da cromatografia líquida de alta eficiência e por Folin, Ciocalteu (1927). Na segunda etapa (Artigo 2), a biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi utilizada para extração do biopolímero PHB pelos métodos com clorofórmio e outro com clorofórmio e hipoclorito de sódio. O PHB do primeiro método de extração (PHB1) e do segundo método (PHB2) foram solubilizados em clorofórmio e a solução polimérica foi testada no processo de *electrospinning* para produção de nanofibras. Dessa forma, o PHB que formou nanofibras sem gotas foi utilizado para definir as melhores condições do processo que produziram nanofibras com menor diâmetro. Após, os compostos fenólicos foram incorporados às nanofibras, as quais foram conduzidas às análises mecânicas, termogravimétricas, físico-químicas, morfológicas e microbiológicas. A terceira etapa (Artigo 3) é constituída do desenvolvimento de nanofibras com o polímero natural quitosana e o polímero sintético PEO também adicionadas dos compostos antibacterianos microalgais. As concentrações de cada polímero foram variadas para obtenção de nanofibras com menor diâmetro e após a definição das melhores condições do *electrospinning*, as nanofibras com e sem os compostos fenólicos foram caracterizadas através de análises de hidrofobicidade, termogravimétricas, físico-químicas, morfológicas e microbiológicas.

ARTIGO 1

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DA
BIOMASSA DA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18**

RESUMO

A *Spirulina* sp. LEB 18, reconhecida pelas suas propriedades nutricionais, possui compostos fenólicos, os quais podem apresentar propriedades biológicas como antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes. O objetivo do estudo foi extrair compostos fenólicos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e avaliar a atividade antibacteriana sobre as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi utilizada para extrair os compostos fenólicos e quantificá-los por cromatografia líquida de alta eficiência. Os compostos fenólicos foram testado quanto sua atividade antibacteriana com os micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, através dos métodos de difusão em discos e macrodiluição com contagem de colônias. Os compostos fenólicos contendo ácidos gálico e cafeico inibiram o crescimento bacteriano formando halos de $11 \pm \leq 0,1$ e $15,7 \pm 0,6$ mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25972, respectivamente. Além disso, a concentração inibitória mínima do extrato que inibiu 100 % do crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25972 foi 200 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Dessa forma, os compostos fenólicos extraídos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentaram atividade antibacteriana frente aos micro-organismos patogênicos testados, permitindo que seja utilizado na conservação dos alimentos, e garantindo assim, a segurança e qualidade dos produtos.

Palavras-chave: Extrato fenólico. Halo de inibição. Macrodiluição. Micro-organismos

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTED FROM MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18 BIOMASS

ABSTRACT

Spirulina sp. LEB 18, recognized for its nutritional properties, has a high amount phenolic compounds, which may have biological properties such as antibacterial, antifungal and antioxidants. The objective this study was to extract phenolic compounds from *Spirulina* sp. LEB 18 and to evaluate the antibacterial activity on the bacteria *Escherichia coli* ATCC 25972 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Spirulina* sp. LEB 18 biomass was used to extract the phenolic compounds and to quantify them by the high performance liquid chromatographic method. The phenolic compounds was tested for its antibacterial activity with the microorganisms *Escherichia coli* ATCC 25972 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, through disk diffusion and macrodilution with colony count methods. The phenolic compounds containing gallic and caffeic acid, which inhibited bacterial growth, formed zones of $11 \pm \leq 0,1$ and 15.7 ± 0.6 mm for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25972, respectively. In addition, minimal inhibitory concentration of phenolic extract that inhibited 100 % growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25972 bacteria was 200 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Moreover, the phenolic compounds extracted from microalga *Spirulina* sp. LEB 18 presented antibacterial activity against the pathogenic microorganisms tested, allowing to be used in food preservation and thus ensuring the safety and quality of the products.

Keywords: Macrodilution. Microorganisms. Phenolic extract. Zone inhibition.

1 INTRODUÇÃO

Compostos com ação antimicrobiana são importantes para aumentar a vida útil de diversos alimentos, que podem apresentar contaminação por bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, algumas dessas bactérias são indicadoras de más práticas de fabricação ou contaminação fecal, sendo gêneros bacterianos representativos e de interesse para a indústria de alimentos (SANTOS et al., 2016; TAVARES; SERAFINI, 2006).

Compostos com atividades biológicas estão naturalmente presentes em várias plantas e tecidos microbianos como antibióticos, compostos fenólicos, alcaloides, terpenos e proteínas (AHMADI et al., 2010; HARUTA et al., 2001, HOLMES; BOSTON; OLIVEIRA et al., 2008; PAYNE, 2008; SOUZA et al., 2010). Os compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes, antimutagênicas, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (XU et al., 2008). As estruturas destes compostos permitem sua difusão através da membrana dos micro-organismos e sua penetração na célula, em que podem promover a perda de constituintes celulares e interferir nas vias metabólicas. Além disso, pode ocorrer a inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas envolvidas no processo de produção de energia, síntese de componentes estruturais, além de poder destruir ou inativar o material genético (MARINO; BERSANI; COMI; 2001).

Os estudos com compostos bioativos extraídos de microalgas têm enfatizado e demonstrado a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, citotóxica e propriedades de inibição enzimática (HAJIMAHMOODI et al., 2010; SOUZA et al., 2011; MUTHULAKSHMI et al., 2012; RAPOUSO, MORAIS, A., MORAIS, R., 2014; RENJU, KURUP, SARITHA, 2014). A microalga *Spirulina* (*Arthrospira*) é utilizada como alimento devido sua composição química, que apresenta elevada quantidade proteica, aminoácidos essenciais, minerais, ácidos graxos poli-insaturados e vitaminas. Também é considerada fonte de pró-vitamina A (β -caroteno) além de ferro biodisponível, minerais, compostos fenólicos, ficocianina, ácido γ -linoléico e ácido linolênico (BELAY et al., 2002). Em função de sua composição a *Spirulina* apresenta propriedades antioxidantes e antimicrobianas, devido a presença de compostos fenólicos, favorecendo o seu uso como alimento funcional (ABEDIN; TAHA, 2008; SOUZA et al., 2011; TANTAWY, 2011).

Os compostos fenólicos existentes na *Spirulina* são ácidos orgânicos como os ácidos cafeico, clorogênico, salicílico, sináptico e trans-cinâmico, os quais agem individualmente ou sinergicamente como compostos antibacterianos e antioxidantes em

sistemas *in vivo* e *in vitro* (ESTRADA; BESCÓS; VILLAR DEL FRESNO, 2001; SOUZA et al., 2011). O objetivo do estudo foi extrair compostos fenólicos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e avaliar a atividade antibacteriana sobre as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2 METODOLOGIA

2.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18

A microalga utilizada neste estudo foi *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira localizada no extremo sul do Brasil, na cidade de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul (MORAIS et al., 2008). Esta microalga foi cultivada na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) localizada às margens da Lagoa Mangueira em três biorreatores tipo *raceway* de 10000 L cada (MORAIS et al., 2009).

Ao final do cultivo a biomassa microalgal foi colhida, utilizando filtro de 200 μm , concentrada em prensa hidráulica e extrusada. Após a extrusão, a biomassa foi seca a 50 °C durante 4 h em secador de bandejas, moída em moinho de bolas por 2 h e peneirada em peneira aço inox de 37 μm (Granutest, Brasil). Posteriormente, a biomassa foi armazenada sob refrigeração (MORAIS et al., 2009).

2.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A extração dos compostos fenólicos foi realizada com 2 g de biomassa da *Spirulina* sp. LEB 18 seca, em que se adicionou 10 mL de metanol e, posteriormente, colocou-se a solução em agitador orbital (New Brunswick, I44, Alemanha) a 200 rpm, 25 °C por 60 min. Após, a solução repousou por 15 min, novamente foi adicionado 10 mL de metanol e submetida a agitação. Em seguida, foi realizada a filtração e clarificação da solução a partir de 5 mL de hidróxido de bário 0,1 mol L⁻¹ e 5 mL sulfato de zinco 5 % (m v⁻¹). Esta solução foi centrifugada (Hitachi, CT 6EL, China) a 3220 xg por 10 min. O sobrenadante contendo os compostos fenólicos foi retirado com pipeta de Pasteur (SOUZA et al., 2011). O extrato fenólico utilizado para os testes microbiológicos foi colocado em rotaevaporador (Quimis 344B2, Brasil) a 60 °C para remoção do metanol e após, foi ressuspenso em água destilada esterilizada.

A determinação quantitativa dos compostos fenólicos totais no extrato foi realizada de acordo com o método descrito por Folin, Ciocalteau (1927). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini 1240, Japão) a 760 nm e o teor de fenóis totais foi determinado a partir da curva analítica construída com solução padrão de ácido gálico contendo 10 mg mL⁻¹, da qual foram preparadas diluições variando entre 20 e 140 µg mL⁻¹. Os resultados foram expressos como µg de equivalente de ácido gálico (GAE) g⁻¹ de *Spirulina* sp. LEB 18.

2.3 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os padrões cromatográficos para a determinação de compostos fenólicos presentes na amostra foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO) com pureza ≥98%. O metanol e a acetonitrila grau cromatográfico foram adquiridos da Panreac Química SLU (Barcelona, Espanha) e Merck (Darmstadt, Alemanha), respectivamente e o ácido acético de grau analítico foi adquirido da Dinâmica Contemporânea LTDA (Diadema, Brasil). Foi utilizado sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) para purificar a água utilizada no preparo das fases móveis e membrana filtrante com poros de 0,45 µm da Millipore (SOUZA, 2012).

Os padrões de compostos fenólicos foram dissolvidos em metanol para obter soluções estoque de 0,3 mg mL⁻¹. Para separação, identificação e quantificação cromatográfica dos compostos fenólicos do extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) composto por bomba LC-20AT, degaseificador DGU-20A₅, controlador CBM-20A, detector RF-20A, forno de coluna CTO-20A, injetor automático SIL-20A HT com loop de 100 µL, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e software LC Solution- Shimadzu. Os compostos fenólicos da *Spirulina* sp. LEB 18 foram separados empregando coluna de fase reversa Shim-pack CLC-ODS (M) C18 Shimadzu nas dimensões de 5 µm x 4,6 mm x 250 mm. A eluição foi realizada com fase móvel em gradiente de solução aquosa de ácido acético (99:1, v v⁻¹), metanol e acetonitrila (Tabela 1), com vazão de 1,0 mL min⁻¹, perfazendo tempo total de corrida de 23 min. O volume injetado da amostra e dos padrões foi de 20 µL (adaptado de SOUZA, 2012).

Para identificar os compostos na mistura foi utilizada a comparação dos tempos de retenção e dos espectros dos picos separados com os padrões (DUTRA et al., 2010). Cada padrão estudado foi analisado individualmente, para obtenção dos seus tempos de retenção e das suas curvas determinados por CLAE. As curvas analíticas foram construídas através da

injeção de três soluções padrão para os níveis de concentração entre 5 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido gálico, de 3 a 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido cafeico, preparadas a partir de soluções estoque de 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo as diluições realizadas em metanol.

Tabela 1 - Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de compostos fenólicos em *Spirulina* sp. LEB 18.

Intervalo de tempo (min)	Solução aquosa de ácido acético (99:1) (%)	Acetonitrila (%)	Metanol (%)
1-10	65	3,5	31,5
10-12	57	4,3	38,7
12-18	41	5,9	53,1
18-23	65	3,5	31,5

2.4 MÉTODO DE DIFUSÃO COM DISCOS

A determinação qualitativa da atividade antibacteriana dos compostos fenólicos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi realizada com o teste de disco difusão conforme norma M7 - A6 estabelecida por *National Committee for Clinical Laboratories Standards* frente aos micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (NCCLS, 2003). O inóculo bacteriano foi preparado em ágar Mueller Hinton para *Escherichia coli* ATCC 25972 e ágar padrão para contagem para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Deste inóculo, foi retirada uma colônia isolada e preparada a suspensão bacteriana em solução salina (0,85% m v^{-1}) de modo a obter turbidez óptica comparável à solução padrão McFarland de 0,5 medida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini 1240, Japão) em comprimento de onda de 600 nm (equivalente a $\lambda = 0,1$). Isso resultou em suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC mL^{-1} de bactérias.

A suspensão bacteriana foi inoculada em placas de petri contendo o ágar correspondente de cada micro-organismo. Nas placas foram adicionados discos de papel filtro qualitativo (40 x 40 cm, 80 g) com 7 mm de diâmetro contendo diferentes quantidades (20, 60, 100, 160, 200, 240, 280, 320 e 380 μL) do extrato fenólico, sendo que todos os testes foram realizados em triplicata. As amostras foram armazenadas durante 24 h em incubadora bacteriológica (AmericanLab 101/100, Brasil) a 35 ± 1 °C. Após este período, a inibição do crescimento foi determinada pelo diâmetro (em milímetros) do halo de inibição formado em torno das amostras. O percentual de inibição foi calculado em relação ao halo de inibição do controle (cloranfenicol 30 μg) o qual foi considerado 100% de inibição do crescimento.

2.5 MÉTODO DA MACRODILUIÇÃO COM CONTAGEM DE COLÔNIAS

A determinação quantitativa da atividade antibacteriana dos compostos fenólicos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi realizada com o teste da macrodiluição conforme norma M7 - A6 estabelecida por *National Committee for Clinical Laboratories Standards* frente aos micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (NCCLS, 2003). O inóculo bacteriano foi preparado em ágar Mueller Hinton para *Escherichia coli* ATCC 25972 e ágar padrão para contagem para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Deste inóculo, foi retirada uma colônia isolada e preparada a suspensão bacteriana em solução salina (0,85% m v⁻¹) de modo a obter uma turbidez óptica comparável à solução padrão McFarland de 0,5 medida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini 1240, Japão) em comprimento de onda de 600 nm (equivalente a $\lambda = 0,1$). Isso resultou em suspensão contendo aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹ de bactérias.

Tubos de ensaio com diferentes concentrações (200, 100, 50, 10, 5 e 3 µg mL⁻¹ para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10, 5 e 3 µg mL⁻¹ para *Escherichia coli* ATCC 25972) do extrato fenólico foram preparados com 2 mL de caldo nutriente. Nos tubos de ensaio também foi adicionado 1 mL da suspensão bacteriana, sendo que em um foi o controle positivo (sem o extrato fenólico) e outro o controle negativo (sem a suspensão bacteriana). As amostras foram armazenadas durante 24 h em incubadora bacteriológica (AmericanLab 101/100, Brasil) a 35±1 °C. Após este período, foi realizado o plaqueamento em profundidade com diluições seriadas (10⁰, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³), utilizando 1 mL de amostra, a qual foi adicionada em placa de petri com ágar correspondente para cada bactéria e após, armazenadas novamente durante 24 h em incubadora bacteriológica (AmericanLab 101/100, Brasil) a 35±1 °C. Os testes foram conduzidos em duplicata.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

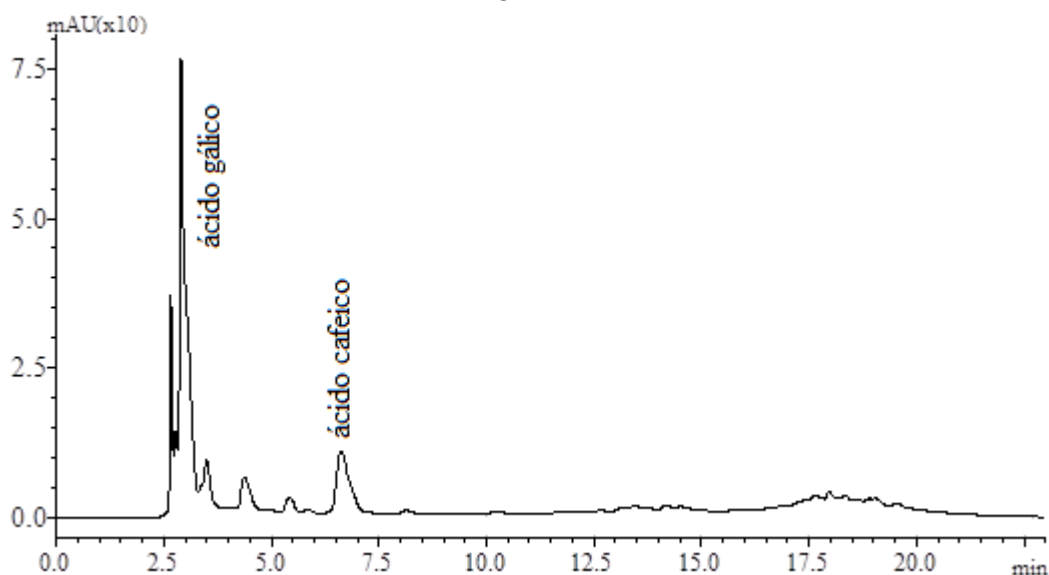
A análise estatística foi realizada utilizando nível de confiança de 95 % para os dados relacionados ao halo de inibição. Os resultados foram expressos pela média e avaliados por análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NO EXTRATO DE *Spirulina* sp. LEB 18

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou teor de compostos fenólicos totais no extrato de $1,04 \text{ mg g}^{-1}$, valores equivalentes foram citados por Souza (2012) de $1,1 \text{ mg g}^{-1}$ *Spirulina platensis* e por Ribeiro et al. (2016) de $1,2 \text{ mg g}^{-1}$ de *Spirulina* sp. LEB 18. Segundo Colla, Furlong e Costa (2007) e Parisi et al. (2010) os compostos fenólicos presentes na *Spirulina platensis* são os ácidos gálico, cafeico, salicílico, *trans*-cinâmico, clorogênico e sináptico. O perfil do extrato fenólico da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 deste estudo ilustrado no cromatograma da Figura 1 mostra a separação dos ácidos gálico e cafeico por comparação dos tempos de retenção (Figura 2). Também é possível observar que o cromatograma apresenta como primeiro pico o solvente metanol bem como outros picos de menor intensidade caracterizando interferentes. Estas diferenças podem estar associadas às diferenças de espécie da microalga, cultivo e a metodologia analítica empregada para extração.

Figura 1 - Cromatograma dos compostos fenólicos da *Spirulina* sp. LEB 18 identificados por CLAE



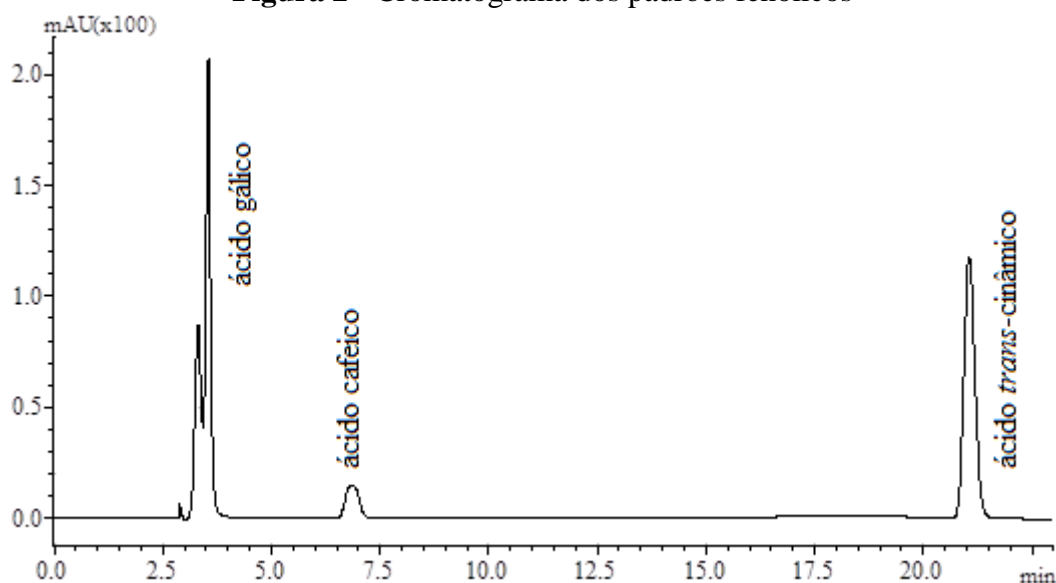
A partir do cromatograma da Figura 2 é possível definir os tempos de retenção dos ácidos fenólicos em 3,5 e 6,3 min para os ácidos gálico e cafeico, respectivamente. Além disso, através da cromatografia foram realizadas curvas analíticas dos padrões para quantificar cada ácido fenólico presente no extrato. As Equações 1 e 2 das curvas para ácidos gálico e

cafeico, respectivamente, apresentaram valores de correlação de 0,9991 e 0,9992, respectivamente, que possibilitaram quantificação confiável das amostras.

$$y = 45113 x - 4323,8 \quad (1)$$

$$y = 39028 x - 27596 \quad (2)$$

Figura 2 - Cromatograma dos padrões fenólicos



A quantificação dos compostos presentes no extrato identificado por CLAE foi $13,3 \pm 0,02$ e $5,2 \pm 0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácidos gálico e cafeico, respectivamente, correspondendo a 71,8 e 28,2 % de cada componente em relação a concentração total. O somatório do conteúdo dos ácidos fenólicos identificados no extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 resultam em $18,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ do conteúdo fenólico total, quantificados através do método espectrofotométrico ($42 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dessa forma, esta diferença pode corresponder a presença de interferentes que levam a superestimação do conteúdo fenólico total do extrato, além disso, esta diferença pode ocorrer durante a determinação do conteúdo total de fenóis (método espectrofotométrico), em que são quantificadas todas as substâncias que possuem ao menos um anel fenólico, enquanto que no método por cromatografia líquida são quantificados apenas os compostos possíveis de ser separados e quantificados dentro dos limites de detecção do método adotado.

Autores têm publicado resultados sobre o conteúdo de compostos fenólicos totais na *Spirulina platensis* (BIERHALS et al., 2009; COLLA; FURLONG; COSTA, 2007; PARISI et al., 2010; SOUZA et al., 2011), porém há poucas informações sobre o conteúdo de fenóis específicos em microalgas. Souza (2012) identificou por CLAE os compostos fenólicos como ácidos gálico, cafeico, salicílico e *trans*-cinâmico da microalga *Spirulina platensis*. Klejdus et al. (2009) separaram e identificaram fenóis de microalgas por espectrometria de

massa, entre elas a *Spirulina platensis* apresentou em seu perfil cromatográfico $0,169 \mu\text{g g}^{-1}$ de ácido cafeico, $0,072 \mu\text{g g}^{-1}$ de ácido clorogênico, $0,254 \mu\text{g g}^{-1}$ de ácido vanílico e $2,23 \mu\text{g g}^{-1}$ de ácido p-hidroxibenzoico. O presente estudo quantificou em $166,8 \pm 0,21$ e $65,44 \pm 2,95 \mu\text{g g}^{-1}$ de ácidos gálico e cafeico, respectivamente, sendo valores muito superiores aos encontrados pelos autores.

3.2 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Diferentes quantidades de extrato fenólico foram adicionadas nos discos a fim de encontrar a concentração do composto que forneça a inibição de 50% do micro-organismo exposto. Os halos de inibição aumentaram a medida que aumentou a quantidade de extrato fenólico adicionada nos discos, isso foi observável até a concentração atingir o limite de inibição e assim, os resultados dos halos não tiveram mais diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Dessa forma, os maiores halos de inibição dos compostos fenólicos da *Spirulina* sp. LEB 18 apresentaram capacidade de 11 ± 0 e $15,7 \pm 0,6$ mm (Figura 3) para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25972, respectivamente, correspondente ao percentual de inibição de 68,7 e 72,7 %. Segundo Khateeb et al. (2012) a quantidade de 150 μL de extrato fenólico com concentração de $6,65 \text{ mg g}^{-1}$ obtido da planta *Cichorium pumilum* Jacq. foi capaz de formar halos entre 0,6 a 10 mm para *S. aureus* e *E. coli*. Pereira et al. (2007) utilizaram 50 μL de extrato contendo compostos fenólicos das folhas da noz (*Juglans regia* L.), o qual não inibiu o crescimento da *E. coli* e formou halo de 4 a 5 mm para *S. aureus*. Gurnani et al. (2016) utilizaram 100 μL de extrato das sementes de *Capsicum frutescens* L. contendo fenóis na concentração de $7,95 \pm 0,35 \text{ mg g}^{-1}$ para formar halos de $8 \pm 1,32$ mm para *E. coli*.

Segundo Mothana e Lindequist (2005), halos de inibição de 8 a 13 mm são considerados extratos com poder de ação moderadamente ativos, halos de inibição maiores que 14 mm são extratos muito ativos. Com base nesse critério, os compostos fenólicos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, apresentaram moderada à elevada atividade antibacteriana frente ambas bactérias.

Parisi et al. (2010) também avaliaram a atividade antibacteriana através dos micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* com os compostos fenólicos extraído da microalga *Spirulina platensis*. Os autores obtiveram halo de inibição para o *S. aureus* de $19 \pm 1,41$ mm e para as outras bactérias testadas não se obteve inibição. O presente trabalho

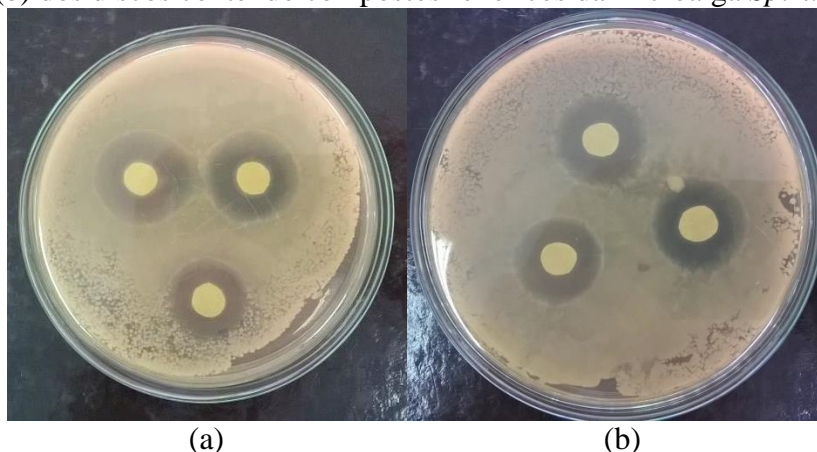
apresentou inibição do crescimento para os dois micro-organismos testados (*Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), porém em relação a Parisi et al. (2010) o resultado foi menor para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, o que pode ser justificado pela diferença de espécie da microalga *Spirulina* e pelos compostos fenólicos obtidos por Parisi et al. (2010) apresentar concentração de $4,41 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$ e o presente trabalho apenas $1,04 \text{ mg g}^{-1}$.

Tabela 2 - Resultados dos halos de inibição dos compostos fenólicos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

Quantidade (µL)	Halo de inibição (mm)	Inibição (%)	Halo de inibição (mm)	Inibição (%)
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25972	
20	$7,0 \pm \leq 0,1^c$	43,7	$8,0 \pm \leq 0,1^a$	37,0
60	$8,0 \pm \leq 0,1^{cd}$	50,0	$8,0 \pm 1,0^a$	37,0
100	$9,3 \pm 0,6^{bd}$	58,1	$8,5 \pm 1,3^a$	39,3
160	$11,0 \pm \leq 0,1^a$	68,7	$10,8 \pm 0,3^{af}$	50,0
200	$9,7 \pm 0,6^{ab}$	60,6	$12,0 \pm 1,0^{bc}$	55,5
240	$10,0 \pm \leq 0,1^{ab}$	62,5	$15,7 \pm 0,6^d$	72,7
280	$10,7 \pm 0,6^{ab}$	66,9	$13,7 \pm 0,3^{bcd}$	63,4
320	$10,7 \pm 0,6^{ab}$	66,9	$12,0 \pm 1,0^{bc}$	55,5
380	$11,0 \pm 1,0^a$	68,7	$14,7 \pm 2,3^{cd}$	68,1
Cloranfenicol (30µg/disco)	$16,0 \pm \leq 0,1$	100,0	$21,6 \pm 0,9$	100,0

Letras minúsculas iguais indicam que os resultados não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as quantidades.

Figura 3 - Halos de inibição *Escherichia coli* ATCC 25972 (a) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (b) dos discos contendo compostos fenólicos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18



Kaushik e Chauhan (2008) relataram a atividade antibacteriana com diversos micro-organismos e diferentes extratos da biomassa *Spirulina platensis*. Os autores observaram halos de inibição de $15,21 \pm 0,1$ e $12,42 \pm 0,47$ mm com o extrato metanólico para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Arbos, Stevani, Castanha (2013) avaliaram a atividade antibacteriana dos compostos fenólicos extraídos em frutos de manga frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli* e obtiveram valores dos halos de inibição entre $14,9 \pm 0,2$ e $15,5 \pm 0,02$ mm, respectivamente. Ouerghemmi et al. (2016) também extraíram compostos fenólicos das folhas e flores da planta *Ruta chalepensis*, os quais obtiveram halos de inibição de $12,3 \pm 1,5$ e $15,7 \pm 0,9$ mm para os micro-organismos *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Os autores encontraram resultados semelhantes ao presente trabalho para ambas bactérias.

Segundo Gurnani et al. (2016), o extrato contendo fenóis obtidos das sementes de pimentões vermelhos apresentaram halo de inibição de $10 \pm 0,52$ mm para o micro-organismo *E. coli*. Moubayed et al. (2016) obtiveram extratos fenólicos de alga *Sargassum latifolium*, o qual foi testado com os micro-organismos *E. coli* e *S. aureus* e apresentaram halos de inibição de maiores que 7 e 10 mm, respectivamente. Os autores encontraram valores de halos de inibição inferiores em relação aos halos determinados no presente trabalho.

Os compostos fenólicos agiram inibindo 100% do crescimento do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que para inibição de crescimento de 100% da *Escherichia coli* ATCC 25972 foi possível com $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 3). Nas concentrações abaixo da concentração de inibição, observou-se crescimento bacteriano em que se pode realizar a contagem das colônias em determinadas diluições, porém em concentração muito baixas ($10, 5$ e $3 \mu\text{g mL}^{-1}$) não foi possível a contagem devido ao elevado crescimento bacteriano.

Os compostos fenólicos e as concentrações estudadas demonstraram que a bactéria gram-negativa (*Escherichia coli*) é mais resistente em relação a gram-positiva (*Staphylococcus aureus*). Isto pode ter ocorrido devido à composição diferenciada da membrana das bactérias gram-negativas em relação a gram-positivas. A parede celular de gram-negativas possui um componente adicional, a membrana externa, que corresponde a segunda bicamada lipídica, que adere firmemente à camada de peptidoglicano, conferindo maior rigidez. A face externa da membrana é composta de lipopolissacarídeos, o que a torna mais lipofílica em relação a substâncias exógenas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011).

Parisi et al. (2010) também avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos fenólicos da *Spirulina platensis* e observaram que não ocorreu a inibição da *E. coli* mas sim do *S. aureus* na concentração de $47,46 \mu\text{g mL}^{-1}$. Silva et al. (2012) estudaram a

atividade antibacteriana de extratos da planta *Mimosa caesalpinifolia*, e obtiveram CIM de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico das folhas para *S. aureus* e *E. coli*. Comparativamente, o presente trabalho apresentou inibição para ambas as bactérias com concentrações inferiores do resultado encontrado por Parisi et al. (2010).

Tabela 3 - Resultados do teste da macrodiluição com contagem de colônias.

Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Diluições			
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				
Controle negativo	-	-	-	-
Controle positivo	ICT	ICT	ICT	ICT
200	-	-	-	-
100	ICT	ICT	192±17	--
50	ICT	ICT	ICT	ICT
10	ICT	ICT	ICT	ICT
5	ICT	ICT	ICT	ICT
3	ICT	ICT	ICT	ICT
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25972				
Controle negativo	-	-	-	-
Controle positivo	ICT	ICT	ICT	ICT
500	-	-	-	-
400	ICT	97±13	--	--
300	ICT	91±16	--	--
200	ICT	ICT	59±4	--
100	ICT	ICT	115±54	--
50	ICT	ICT	ICT	122±25
10	ICT	ICT	ICT	ICT
5	ICT	ICT	ICT	ICT
3	ICT	ICT	ICT	ICT

-: não apresentou crescimento de colônias; --: não foi realizada a contagem; ICT: incontável

Kaushik e Chauhan (2008) relataram o potencial antimicrobiano de extratos metanólicos da biomassa da microalga *Spirulina platensis* frente a micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, e *K. pneumoniae*. As concentrações inibitórias mínimas do extrato metanólico para o *S. aureus* e *E. coli* foram 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Eldeen et al. (2011) testaram a atividade antibacteriana *in vitro* de sete extratos da planta *Phyllanthus* sp. e obtiveram a CIM para o extrato metanólico da espécie *P. pulcher* de 185 ± 7,3 e 623 ± 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os micro-organismos *S. aureus* e *E. coli*. Pode-se observar que nesses estudos a concentração para inibir *E. coli* é maior que para o *S. aureus*, confirmando os resultados que obteve-se neste presente trabalho.

Autores têm publicado resultados sobre a atividade antifúngica de compostos fenólicos da *Spirulina platensis* (COLLA; FURLONG; COSTA, 2007; BIERHALS et al., 2009; SOUZA et al., 2011), porém há poucas informações sobre a atividade antibacteriana dos fenóis nessa microalga (PARISI et al., 2010). Os compostos fenólicos obtidos da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentaram elevada atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25972, indicando o potencial que a microalga apresenta para proteger alimentos contra micro-organismos patogênicos.

O uso de substâncias naturais como os compostos fenólicos de origem biológica está sendo um fator de interesse na área de embalagens ativas de alimentos para o controle microbiológico. A aplicação de compostos com propriedade antibacteriana é importante para aumentar a vida útil de alimentos como carnes, aves, peixes, frutas e legumes. Esses alimentos são geralmente contaminados por micro-organismos como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (BAUZA et al., 2016).

4 CONCLUSÃO

Os compostos fenólicos como os ácidos gálico e cafeico presentes na biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foram identificados através da cromatografia apresentando concentrações de $166,78 \pm 0,21$ e $65,44 \pm 2,95 \mu\text{g g}^{-1}$. Além disso, o teste de difusão com disco exibiu halos de inibição de $11,0 \pm \leq 0,1$ e $15,7 \pm 0,6$ mm considerados moderadamente ativos e muito ativos, respectivamente. O teste da macrodiluição determinou que foi necessária a concentração de 200 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos compostos fenólicos para inibir 100% dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25972, respectivamente. A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 é potencial fonte de compostos fenólicos capazes de promover a inibição de bactérias patogênicas, podendo atuar como um conservante natural em substituição aos conservantes químicos de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDIN, R. M. A.; TAHA, H. M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae, evaluation of medium components by Plackett-Burmann Design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology e Biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008.

AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODERRESI, M.; ABIRI, R.; MIKAELI, A. Chemical composition, *in vitro* antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil

and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* of Iran. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1137-1144, 2010.

ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 161-165, 2013.

BAUZA, S. C. B.; LÓPEZ, E. M.; PALOU, E.; MALO, A. L. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control**, v. 62, p. 44–51, 2016.

BELAY, A. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27-48, 2002.

BIERHALS, V. S.; MACHADO, V. G.; ECHEVENGU, W. O.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 42-48, 2009.

COLLA, L. M.; FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RIBANI, M. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Química Nova**, v.33, p.119-123, 2010.

ELDEEN, I. M. S.; SEOW, E. M.; ABDULLAH, R.; SULAIMAN, S. F. *In vitro* antibacterial, antioxidant, total phenolic contents and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of extracts of seven *Phyllanthus* sp. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 1, p. 75–79, 2011.

ESTRADA, J. E.; BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 497-500, 2001.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, 1927.

GURNANI, N.; GUPTA, M.; MEHTA, D.; MEHTA, B. K. Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 4, p. 462–470, 2016.

HAJIMAHMOODI, M., FARAMARZI, M. A., MOHAMMADI, N., SOLTANI, N., OVEISI, M. R., NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p.43–50, 2010.

HARUTA, M.; MAJOR, I. T.; CHRISTOPHER, M. E.; PATTON, J. J.; CONSTABEL, C. P. A Kunits trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.):

cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 3, p. 347-359, 2001.

HOLMES, R. A.; BOSTON, R. S.; PAYNE, G. A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 4, p. 559-572, 2008.

KAUSHIK, P.; CHAUHAN, A. *In vitro* antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 348-52, 2008.

KHATEEB, W.; HUSSEIN, E.; QOUTA, L.; ALU'DATT, M.; AL-SHARA, B.; ABU-ZAITON, A. *In vitro* propagation and characterization of phenolic content along with antioxidant and antimicrobial activities of *Cichorium pumilum* Jacq. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 103-110, 2012.

KLEJDUS, B.; KOPECKY, J.; BENESOVA, L.; VACEKA, J. Solid-phase/supercritical fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 5, p. 763-771, 2009.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 67, n. 3, p. 187-195, 2001.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 60-64, 2009.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 144-150, 2008.

MOTHANA, R. A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 1, p. 177-181, 2005.

MOUBAYED, N. M. S.; HOURI, H. J.; KHULAIIFI, M. M.; FARRAJ, D. A. Antimicrobial, antioxidant properties and chemical composition of seaweeds collected from Saudi Arabia (Red Sea and Arabian Gulf). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 162-169, 2016.

MUTHULAKSHMI, M.; SARANYA, A.; SUDHA, M.; SELVAKUMAR, G. Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from *Spirulina* isolated from fresh water body against various human pathogens. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 3, p. 7-11, 2012.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; FERREIRA, C. F. R.; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut

(*Juglans regia* L.) green husks. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2326–2331, 2008.

OUERGHEMMI, I.; REBEY, I. B.; RAHALI, F. Z.; BOURGOU, S.; PISTELLI, L.; KSOURI, R.; MARZOUK, B.; TOUNSI, M. S. Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. **Journal of Food and Drug Analysis**, p. 1-10, 2016.

PARISI, A. S.; YOUNES, S.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 297-301, 2010.

PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; FERREIRA, I. C. F. R.; FERRERES, F.; BENTO, A.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2287–2295, 2007.

RENJU, G. L.; KURUP, G. M.; SARITHA, K. C. H. Effect of lycopene from *Chlorella marina* on high cholesterol-induced oxidative damage and inflammation in rats. **Inflammopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 45–54, 2014.

RIBEIRO, C. A.; BRETANHA, C. C.; GIACOBBO, G.; SOUZA, M. M.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos extraídos de fontes naturais aplicados como conservadores em massas de pizza. **Revista de Ciência e Inovação IF Farroupilha**, v. 1, n. 1, p. 129-138, 2016.

SANTOS, A. O.; FREIRE, J. A. S.; CARVALHO, T. D.; BARBOSA, T. C.; PRATES, R. P.; SILVA, J. C. R. L.; FARIAS, P. K. S. Atividade antibacteriana e antioxidante de óleos essenciais cítricos com potencialidade para inclusão como aditivos em alimentos. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 3, p. 15-21, 2016.

SILVA, M. J. D.; ENDO, L. H.; DIAS, A. L. T.; SILVA, G. A.; SANTOS, M. H.; SILVA, M. A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 267-274, 2012.

SOUZA, M. M. **Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da produção de aflatoxina por extratos fenólicos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis***. 176 f. Tese (doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella pyrenoidosa*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 680-685, 2010.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; FURLONG, E. B. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, 2011.

TANTAWY, S. T. A. Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 9, n. 1, p. 663- 666, 2011.

TAVARES, T. M.; SERAFINI, A. B. Carnes de hambúrgueres prontas para consumo: aspectos legais e riscos bacterianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 1, p. 1-21, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

XU, G.; YE, X.; LIU, D.; MA, Y.; CHEN, J. Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuyou) during maturity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 5, p. 382-389, 2008.

ARTIGO 2

**POLI(HIDROXIBUTIRATO) E COMPOSTOS FENÓLICOS MICROALGAIS PARA
PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

RESUMO

O poli(hidroxi-butilato) é um biopolímero sintetizado pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18, que pode ser aplicado na produção de nanofibras pelo processo de *electrospinning*. Na biomassa microalgal também são encontrados compostos fenólicos com diversas atividades biológicas como antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes. O objetivo do estudo foi produzir nanofibras de PHB contendo compostos fenólicos microalgais, avaliar e caracterizar as nanofibras quanto a atividade antibacteriana. Foram preparadas soluções poliméricas contendo PHB, cloreto de sódio e compostos fenólicos e submetidas ao *electrospinning*. As nanofibras poliméricas foram caracterizadas quanto a sua morfologia, propriedades térmicas e mecânicas, molhabilidade, composição, verificação de espécies químicas e atividade antibacteriana. As nanofibras de PHB contendo compostos fenólicos apresentaram diâmetro médio de 810 ± 85 nm, hidrofobicidade e porosidade de $60,2 \pm 1,8$ %. As propriedades térmicas confirmaram a incorporação dos compostos e possibilitaram a utilização das nanofibras como embalagens de alimentos por apresentarem temperatura de máxima degradação de $287,0$ °C e o alongamento de $71,5 \pm 2,5$ % aumentou com a adição dos compostos fenólicos. As nanofibras de PHB contendo compostos fenólicos apresentaram atividade frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com halo de inibição de $7,5 \pm 0,4$ mm. Portanto, as nanofibras poliméricas produzidas de biopolímero e compostos fenólicos de origem microalgal, apresentaram potencial aplicação como material para embalagens antimicrobianas, uma vez que o PHB possui propriedade de biodegradabilidade combinada com a atividade biológica dos compostos fenólicos, protegem e preservam a qualidade dos alimentos.

Palavras-chave: Atividade biológica. Biopolímero. *Electrospinning*. *Spirulina*.

POLYHYDROXIBUTIRATE AND PHENOLIC COMPOUNDS OF MICROALGAL FOR NANOFIBERS PRODUCTION WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY

ABSTRACT

Polyhydroxybutyrate is a biopolymer synthesized by *Spirulina* sp. LEB 18, which can be applied in the production of nanofibers by electrospinning process. In the microalgal biomass are also found phenolic compounds with diverse biological activities as antibacterial, antifungal and antioxidants. The objective this study was to produce PHB nanofibers containing microalgal phenolic compounds, to evaluate and characterize nanofibers for antibacterial activity. Polymer solutions containing PHB, sodium chloride and phenolic compounds were prepared and submitted to electrospinning. Polymeric nanofibers were characterized for their morphology, thermal and mechanical properties, wettability, composition, chemical species verification and antibacterial activity. Nanofibers PHB containing phenolics had an average diameter of 810 ± 85 nm, hydrophobicity and porosity of $60.2 \pm 1.8\%$. The thermal properties confirmed the incorporation of the compounds and enabled the use of nanofibers as food packaging because they presented a maximum degradation temperature of 287.0 °C and the elongation of $71.5 \pm 2.5\%$ increased with the addition of the phenolic compounds. PHB nanofibers containing phenolic compounds showed activity against the microorganism *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with inhibition zone of 7.5 ± 0.4 mm. Therefore, polymeric nanofibers produced from biopolymer and phenolic compounds of microalgal origin, presented a potential application as material for

antimicrobial packages, since PHB has biodegradability property combined with the biological activity of phenolic compounds, protect and preserve food quality.

Keywords: Biological activity. Biopolymer. Electrospinning. *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos autotróficos que utilizam energia luminosa e nutrientes inorgânicos como dióxido de carbono, nitrogênio e fósforo para sintetizar compostos biologicamente ativos como lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos e compostos fenólicos. Estes compostos apresentam funções biológicas como antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatório e antiviral (BHAGAVATHY; SUMATHI; BELL, 2011; PALAVRA et al., 2011; MARKOU; NERANTZIS, 2013;). As microalgas também produzem um importante biopolímero como o poli(hidroxibutirato), pertencente aos poli(hidroxialcanoatos) (PHAs), com características de degradação térmica, temperatura de fusão e propriedades mecânicas semelhantes ao polipropileno e podendo atuar como alternativa aos plásticos de origem petroquímica (BUGNICOURT et al., 2014).

O poli(hidroxibutirato) (PHB) é o representante mais estudado do grupo PHAs. Devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade com células e tecidos, o PHB tem potencial para aplicação no desenvolvimento de nanofibras nos campos da alimentação e medicina. As nanofibras poliméricas apresentam propriedades importantes para aplicação em alimentos devido ao seu diâmetro nanométrico que melhora as propriedades mecânicas como elasticidade e resistência, apresentam alta porosidade e elevada área superficial em relação ao volume (BEACHLEY; WEN, 2009). Além disso, a incorporação de compostos antimicrobianos em nanofibras protege-os de perder sua ação antecipadamente e, apresenta potencial aplicação na indústria de alimentos na forma de embalagens. Dessa forma, nanofibras adicionadas de compostos com atividades biológicas contribuem para a embalagem interagir com o alimento de forma desejável, protegendo os produtos do ambiente externo e proporcionando maior segurança alimentar para o consumidor.

As nanofibras a partir do biopolímero PHB extraído de microalgas são apresentadas em poucos estudos (MARTINS, 2014; MORAIS et al., 2015a). O presente estudo apresenta o diferencial de aliar a biotecnologia à nanotecnologia, desenvolvendo nanofibras de PHB contendo compostos fenólicos ambos de origem microalgal. Desta forma, este estudo torna possível o desenvolvimento de um produto inovador com potencial aplicação em embalagens alimentícias, contribuindo para preservar a qualidade e estender a

vida útil dos produtos, não prejudicando o meio ambiente como as atuais embalagens de origem petroquímica. Portanto, as nanofibras poliméricas produzidas com a adição dos compostos fenólicos, permitem a aplicação como embalagens de alimentos, visto que estes compostos conferem atividade antibacteriana ao material além de aumentar a qualidade e segurança dos alimentos. O objetivo do estudo foi produzir nanofibras de PHB contendo compostos fenólicos microalgais, avaliar e caracterizar as nanofibras quanto a atividade antibacteriana.

2 METODOLOGIA

2.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18

A microalga utilizada neste estudo foi *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira localizada no extremo sul do Brasil, na cidade de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul (MORAIS et al., 2008). Esta microalga foi cultivada na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) localizada às margens da Lagoa Mangueira em três biorreatores tipo *raceway* de 10000 L cada (MORAIS et al., 2009).

Ao final do cultivo a biomassa microalgal foi colhida, utilizando filtro de 200 μm , concentrada em prensa hidráulica e extrusada. Após a extrusão, a biomassa foi seca a 50 °C durante 4 h em secador de bandejas, moída em moinho de bolas por 2 h e peneirada em peneira aço inox de 37 μm (Granutest, Brasil). Posteriormente, a biomassa foi armazenada sob refrigeração (MORAIS et al., 2009).

2.2 EXTRAÇÃO DO PHB COM CLOROFÓRMIO

Cerca de 4 g de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 seca foram submetidas a refluxo em 400 mL de clorofórmio durante 4 h a aproximadamente 60 °C. A proporção de biomassa ao volume de clorofórmio foi 1:100. Depois de 4 h, o clorofórmio foi submetido a refluxo arrefecido até temperatura ambiente e filtrou-se com papel filtro número 1 Whatman para remover a biomassa. Em seguida, a solução foi concentrada para 10 mL utilizando evaporador rotativo. O PHB foi então precipitado por adição de 100 mL de metanol na solução concentrada, agitando-se vigorosamente. Após, a solução foi centrifugada durante 5 min a 2688 xg, sendo o precipitado recuperado e seco a temperatura ambiente (tratamento PHB1) (segundo metodologia de MORAIS et al., 2015a).

2.3 EXTRAÇÃO DO PHB COM HIPOCLORITO DE SÓDIO 4 % UTILIZANDO PRÉ-TRATAMENTO COM CLOROFÓRMIO

Cerca de 4 g de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 seca foram submetidas a refluxo em 400 mL de clorofórmio durante 4 h a aproximadamente 60 °C. A proporção de biomassa ao volume de clorofórmio foi 1: 100. Depois de 4 h, o clorofórmio foi submetido a refluxo arrefecido até temperatura ambiente e filtrou-se com papel filtro número 1 Whatman para remover a biomassa. Em seguida, a solução foi concentrada para 10 mL utilizando evaporador rotativo. O PHB foi então precipitado por adição de 100 mL de metanol na solução concentrada, agitando-se vigorosamente. Após, a solução foi centrifugada durante 5 min a 2688 xg, sendo o precipitado recuperado e seco em temperatura ambiente.

Após, para cada 1 g de biomassa seca, foi adicionado 100 mL de água destilada por 10 min e 25 mL de hipoclorito de sódio 10-12 % de cloro ativo ($m v^{-1}$) e mantido sob agitação por 10 min. A suspensão resultante foi levada à centrifugação (9450 xg por 20 min a temperatura ambiente). A seguir descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 100 mL de água destilada. Centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se este processo adicionando 50 mL de acetona. O precipitado final (PHB) foi seco em estufa a 35 °C por 48 h (tratamento PHB2) (segundo metodologia de MORAIS et al., 2015a).

2.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A extração dos compostos fenólicos foi realizada com 2 g de biomassa da *Spirulina* sp. LEB 18 seca, em que se adicionou 10 mL de metanol e, posteriormente, colocou-se a solução em agitador orbital (New Brunswick, I44, Alemanha) a 200 rpm, 25 °C por 60 min. Após, a solução repousou por 15 min e novamente foi adicionado 10 mL de metanol e ressubmetida a agitação. Em seguida, foi realizada a filtração e clarificação da solução a partir de 5 mL de hidróxido de bário $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 5 mL sulfato de zinco 5 % ($m v^{-1}$). Esta solução foi centrifugada (Hitachi, CT 6EL, China) a 3220 xg por 10 min. O sobrenadante contendo os compostos fenólicos foi retirado com pipeta de Pasteur (SOUZA et al., 2011). O extrato fenólico utilizado na solução polimérica foi colocado em rotaevaporador (Quimis 344B2, Brasil) a 60 °C para remoção do metanol e após foi ressuspenso em clorofórmio.

2.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

As soluções poliméricas foram preparadas com 35% (m v⁻¹) de PHB1 e 30% (m v⁻¹) de PHB2 em clorofórmio segundo Morais et al., 2015a. Na solução que formou nanofibras uniformes foi adicionado 1,4% (m v⁻¹) e 2,4% (m v⁻¹) de cloreto de sódio (NaCl). Os compostos fenólicos extraídos da biomassa após evaporação do metanol em rotaevaporador foram ressuspensos em 25 mL de clorofórmio, resultando em uma solução com concentração de 1% (m v⁻¹). A solução polimérica contendo compostos fenólicos foi com a concentração de PHB e de NaCl que formou nanofibras uniformes e com menor diâmetro, os quais foram solubilizados com 1 mL da solução de clorofórmio contendo 1% (m v⁻¹) dos compostos fenólicos. Todas as soluções foram submetidas em agitador magnético (Fisatom, Brasil) por 16 h.

2.6 DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS

O equipamento de *electrospinning* consiste de bomba de deslocamento positivo (Modelo KDS 100, KD Scientific, Estados Unidos) e fonte de alimentação de corrente contínua de alta tensão (Modelo ET 5000 CC, Electric Test Sert, Brasil). As soluções poliméricas de PHB1 e PHB2 foram injetadas através dos capilares com diâmetro de 0,45; 0,55; 0,70 e 0,80 mm. O potencial elétrico estudado para solução de PHB1 foi 15, 20 e 24, kV e para solução de PHB2 foi 15, 20 e 25 kV. A taxa de alimentação estudada para solução de PHB1 foi 150, 350, 650 e 1150 $\mu\text{L h}^{-1}$ e para solução de PHB2 120, 320, 520 e 1020 $\mu\text{L h}^{-1}$. A distância do capilar ao coletor foi fixada de acordo com Morais et al. (2015a) em 150 mm. Todos os testes foram conduzidos à 20 °C e umidade relativa de 60±1 %.

2.7 QUANTIFICAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

A concentração de biopolímero foi determinada por cromatografia gasosa (CG), em que foi submetido a hidrólise e metanólise em 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de ácido sulfúrico a 100 °C por 3,5 h (BRANDL et al., 1988). Os grupos metil éster formados foram analisados em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, Japão) equipado com coluna capilar de sílica Restek Rtx-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm) e detector de ionização de chama (FID). As condições de operação foram 250 °C para injetor e detector. Os parâmetros utilizados para separar os metil ésteres foi 60 °C por 2 min, taxa de incremento de 25 °C min⁻¹ até atingir 180 °C 8 min⁻¹. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão poli

(ácido 3-hidroxibutírico-co-3-hidroxivalérico) 88 mol % hidroxibutirato e 12 mol % hidroxivalerato (Sigma Aldrich) (BRANDL et al., 1988; ZHANG et al., 2015).

2.8 FORMA E DIÂMETRO DAS NANOFIBRAS

As imagens e trinta medidas de diâmetros das nanofibras com e sem os compostos fenólicos foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JSM-6610 LV, Japão). Antes das análises, as amostras foram fixadas em suporte metálico e recobertas com ouro, utilizando o metalizador *diode sputtering* (Denton Vacuum CAR001-0038, Estados Unidos) (ASTM E986-04, 2010). Para a obtenção de detalhes composicionais das amostras, foi utilizado o detector de elétrons retro-espalhado (EDS) e para melhorar o nível de emissão de elétrons também foi realizado metalização com ouro.

2.9 VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES

As viscosidades das soluções poliméricas foram determinadas através de reômetro (Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer, Estados Unidos), a partir de amostras de 0,5 mL de cada solução.

2.10 POROSIDADE

A porosidade das nanofibras foi calculada a partir da Equação 1 (XU et al., 2007), sendo que ρ e ρ_0 (g cm^{-3}) são as densidades das nanofibras e do filme do polímero, respectivamente, determinadas em função de suas dimensões e massas.

$$\text{Porosidade(\%)} = \left(1 - \frac{\rho}{\rho_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

As amostras de filme foram obtidas pela técnica de *casting*, utilizando solução do polímero distribuída longitudinalmente em placas de petri, seguido por evaporação do solvente (SONG et al., 2015).

2.11 TRANSIÇÕES ENDOTÉRMICAS E EXOTÉRMICAS DAS NANOFIBRAS

Para determinação da temperatura de fusão das nanofibras, compostos fenólicos e biopolímero foi utilizado calorímetro diferencial de varredura (DSC) (Shimadzu DSC-60, Japão). Cerca de 4 mg de amostra foram colocadas em cápsula de alumínio com tampa, sob

atmosfera de nitrogênio e fluxo de 50 mL min⁻¹. As análises foram conduzidas em temperatura ambiente até alcançarem 400 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. A temperatura de fusão foi determinada a partir do pico máximo de fusão apresentado na curva de DSC de acordo com ASTM D7426-08, (2013) e o índice de cristalinidade (X_c) foi determinado de acordo com a Equação 2.

$$X_c(\%) = \left(\frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \right) \times 100 \quad (2)$$

Sendo que ΔH_m^0 representa o valor de entalpia de fusão para o PHB 100% cristalino (146,6 J g⁻¹) e ΔH_m indica a entalpia de fusão calculada em termogramas de DSC (WONG; BAJI; LENG, 2008).

2.12 ESTABILIDADE TÉRMICA DAS NANOFIBRAS E CONTEÚDO DE SOLVENTE RESIDUAL

A medida da estabilidade térmica das nanofibras, dos compostos fenólicos, do biopolímero e o conteúdo de solvente residual em todas as amostras foram realizadas através de análise termogravimétrica (TGA) (Shimadzu DTG-60, Japão) de acordo com a metodologia ASTM D3850-12 (2013). As análises foram conduzidas a temperatura ambiente até alcançar 500 °C, em atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo de 30 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento constante de 10 °C min⁻¹, utilizando 2 a 6 mg de amostra.

2.13 DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO E ALONGAMENTO NO PONTO DE RUPTURA

A resistência à tração e a alongamento no ponto de ruptura das nanofibras foram determinadas em texturômetro (Stable Micro Systems modelo TA.XT plus, Inglaterra). As nanofibras analisadas foram produzidas com 1 mL de solução depositadas em coletor rotatório, o que atribui maior uniformidade na espessura do material e assim, maior confiabilidade nos resultados da análise. As amostras foram preparadas com dimensões de 20 x 70 mm e a espessura medida em micrômetro (Starrett 444MXRL-75, Brasil). O ensaio foi realizado com velocidade 2 mm s⁻¹ e distância inicial entre as garras 50 mm.

A resistência à tração e o alongamento na ruptura foram calculados de acordo com as Equações 3 e 4.

$$Tr = \frac{Fm}{A} \quad (3)$$

Em que Tr é a tensão de ruptura ou resistência à tração (MPa), Fm é a força máxima no momento da ruptura das nanofibras (N) e A é área da seção transversal (m²).

$$Al = 100 \frac{dr}{di} \quad (4)$$

Em que Al é o alongamento (%), d_i é a distância inicial de separação (mm) e d_r é a diferença entre a distância no momento da ruptura e a distância inicial (mm).

2.14 ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A FTIR foi realizada para verificar as mudanças na caracterização estrutural das amostras de nanofibras, dos compostos fenólicos e do biopolímero. O equipamento utilizado foi Thermo Scientific - Nicolet 6700 (Shimadzu, Japão), e os espectros das amostras foram analisados em números de onda do infravermelho de 0 a 4000 cm⁻¹.

2.15 ÂNGULO DE CONTATO

A análise do ângulo de contato foi realizada com as amostras de nanofibras com e sem os compostos fenólicos. Para isso, foi utilizado microscópio digital Blue (x60) em que uma gota de água foi inserida sobre a superfície das nanofibras e, em seguida, a imagem foi obtida. A partir do software SurfTens 3.0, cinco medições de cada imagem foram realizadas utilizando cinco pontos de medição dispostos ao redor da gota. O desvio padrão máximo nas medições do ângulo de contato da água deve ser ± 3% (FOMBUENA et al., 2013).

2.16 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A análise de difração de raios-X (DRX) foi realizada nas amostras de nanofibras com e sem os compostos fenólicos e do biopolímero, utilizando difratômetro de raios-X D8 Advance (Bruker, Estados Unidos), equipado com tubo de cobre. A radiação foi produzida com comprimento de onda de 0,154 nm, a 40 kV e 40 mA. Os difratogramas foram obtidos à temperatura ambiente (25 °C) sob ângulo de 2θ entre 10° e 90° em passos de 0,05° s⁻¹. Os difratogramas foram analisados utilizando o software Origin Pro 8.0.

2.17 TESTE ANTIMICROBIANO

A determinação qualitativa da atividade antibacteriana das nanofibras com e sem os compostos fenólicos, do biopolímero em filme e dos compostos fenólicos em clorofórmio, foi realizada com o teste de disco difusão conforme norma M7 - A6 estabelecida por *National Committee for Clinical Laboratories Standards* frente aos micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (NCCLS, 2003). O inóculo bacteriano foi preparado em ágar Mueller Hinton para *Escherichia coli* ATCC 25972 e ágar padrão para contagem para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Deste inóculo, foi retirada uma colônia isolada e preparada a suspensão bacteriana em solução salina (0,85 % m v⁻¹) de modo a obter turbidez óptica comparável à solução padrão McFarland de 0,5 medida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini 1240, Japão) em comprimento de onda de 600 nm (equivalente a $\lambda = 0,1$). Isso resultou em suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹ de bactérias.

A suspensão bacteriana foi inoculada em placas de petri contendo o ágar correspondente de cada micro-organismo. Nas placas foram adicionados discos produzidos com as nanofibras com e sem os compostos fenólicos, com filme de 35% de PHB e discos de papel filtro contendo compostos fenólicos após a evaporação do clorofórmio, sendo que todos os testes foram realizados em triplicata. As amostras foram armazenadas durante 24 h em incubadora bacteriológica (AmericanLab 101/100, Brasil) a 35 ± 1 °C. Após este período, a análise foi interpretada através do diâmetro do halo de inibição das amostras.

2.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando nível de confiança de 95 % para os dados relacionados ao diâmetro das nanofibras. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão avaliados por análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO PROCESSO E DA SOLUÇÃO POLIMÉRICA NO DIÂMETRO DAS NANOFIBRAS

Através dos testes preliminares com a solução de PHB1 verificou-se que conforme aumentava-se o diâmetro do capilar, a desuniformidade das fibras também

aumentava, além disso utilizando o capilar 0,80 mm houve a obstrução do capilar, impedindo o desenvolvimento do processo. Segundo Mo et al. (2004) a medida que o diâmetro aumenta, pode ocorrer a obstrução do capilar, devido aos efeitos de tensão superficial, em que o aumento do raio da gota na ponta do capilar diminui a tensão superficial. Uma vez que a intensidade do campo eletrostático é constante, a aceleração inicial e a velocidade média do jato aumentam com o decréscimo da tensão superficial da solução. Isso diminui o tempo de evaporação do solvente, e como resultado obteve-se a formação de nanofibras com maior diâmetro e distribuição de tamanho não uniforme. No entanto, se o diâmetro do capilar for pequeno ($<0,45$ mm), a gota de polímero pode não alongar, pois isto depende da tensão superficial da solução (ZHAO et al., 2004).

As taxas de alimentação de 650 e $1150 \mu\text{L h}^{-1}$ aplicadas à solução de PHB1 produziram fibras com diâmetro na escala micrométrica maior em relação as fibras produzidas com as taxas de 150 e $350 \mu\text{L h}^{-1}$. Então, devido a obtenção de fibras com diâmetro micrométrico foi adicionado $1,4\%$ (m v^{-1}) de NaCl na solução polimérica de 35% de PHB1, devido ao caráter condutivo que este sal proporciona à solução polimérica promovendo maior alongamento das nanofibras durante o processo de *electrospinning* e conseqüentemente menor diâmetro das nanofibras (Tabela 1).

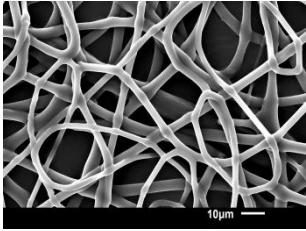
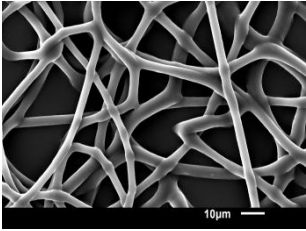
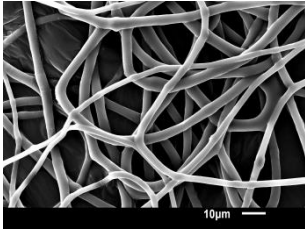
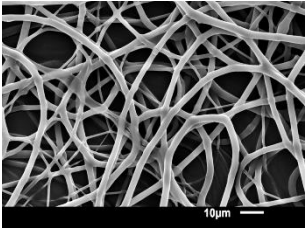
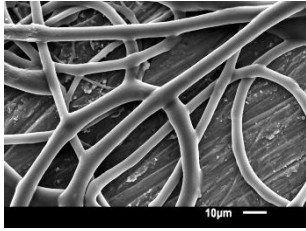
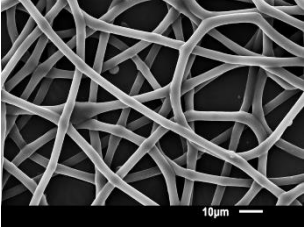
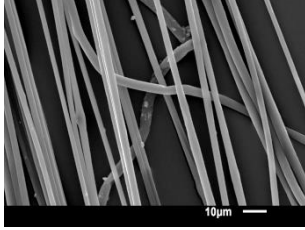
Observa-se nos resultados obtidos na Tabela 1 que utilizando o mesmo diâmetro de capilar (experimentos 1, 2, 3, 4 e 5), porém elevando o potencial elétrico de 15 a $24,5$ kV, obteve-se nanofibras com maiores diâmetros. Alguns autores (RAMAKRISHNA et al., 2005; CZAJA et al., 2007; DALEY; PETERS, LARSEN, 2008) sugerem que a aplicação de potenciais elétricos mais altos no processo de *electrospinning*, facilita a formação de nanofibras com maiores diâmetros e oferece maior probabilidade de formação de gotas.

A taxa de alimentação da solução polimérica é parâmetro importante do processo. Geralmente, recomendam-se taxas menores para que a solução polimérica tenha tempo suficiente para a evaporação do solvente. Se a taxa de alimentação for muito elevada irá ocorrer a formação de nanofibras com maiores diâmetros, devido ao curto tempo de evaporação do solvente antes das nanofibras alcançarem o coletor, além de não promover o alongamento necessário da solução (RENEKER; YARIN, 2008).

Nos estudos preliminares realizados com solução de PHB2 e as condições de *electrospinning* descritas na metodologia obteve-se apenas a formação de nanofibras com gotas. Isso pode estar relacionado com a concentração da solução polimérica de 30% (m v^{-1}) que afeta o alongamento do jato durante o processo. Quando a concentração da solução polimérica é baixa, o campo elétrico aplicado e a tensão superficial fazem com que as cadeias

de polímero se quebrem em fragmentos antes de atingirem o coletor (HAIDER et al., 2013). Estes fragmentos provocam a formação de gotas ou nanofibras com gotas. Além disso, o método de extração do PHB que envolve o reagente hipoclorito de sódio danifica as cadeias poliméricas, quebrando-as em monômeros, o que impossibilita a aplicação desse biopolímero no *electrospinning*.

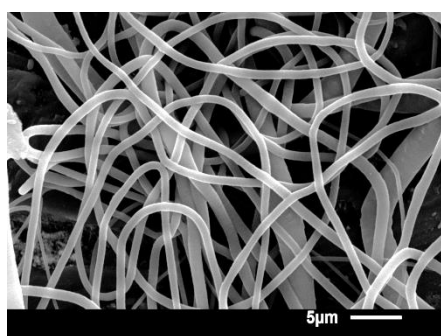
Tabela 1 – Condições do processo de *electrospinning* potencial elétrico (PE, kV), taxa de alimentação (TA, $\mu\text{L h}^{-1}$), diâmetro do capilar (Dc, mm) e diâmetros médios (Dm, nm) obtidos para fibras de 35% de PHB1 e 1,4% de NaCl.

Experimento	1	2	3
PE	24,3	24,3	20
TA	150	350	350
Dc	0,45	0,45	0,45
Dm	2444 ± 382^a	2380 ± 466^a	2328 ± 285^a
Nanofibras			
Experimento	4	5	
PE	15	20	
TA	150	150	
Dc	0,45	0,45	
Dm	1184 ± 251^b	3169 ± 501^c	
Nanofibras			
Experimento	6	7	
PE	24,3	15	
TA	350	350	
Dc	0,70	0,55	
Dm	3188 ± 264^c	2631 ± 430^{ac}	
Nanofibras			

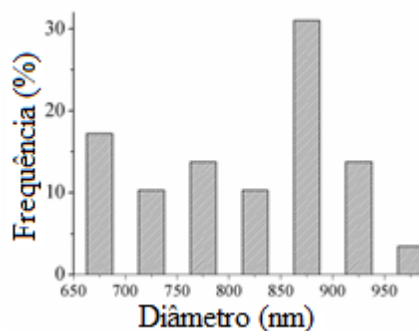
Letras minúsculas iguais indicam que os resultados não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diâmetros médios

A partir dos resultados dos diâmetros e análise estatística obtidos da Tabela 1, foram determinadas as melhores condições do processo como 15 kV de potencial elétrico, 150 $\mu\text{L h}^{-1}$ de taxa de alimentação e 0,45 mm de diâmetro do capilar (experimento 4) para produção de fibras uniformes e contínuas, porém ainda com diâmetro micrométrico. Então, com o intuito de obter diâmetro na escala nanométrica aumentou-se a concentração de NaCl para 2,4 % (m v^{-1}) na solução de PHB1 a qual foi testada nas mesmas condições do experimento 4. Dessa forma, as nanofibras produzidas nestas condições apresentaram diâmetro médio de 814 ± 91 nm (Figura 1), que possibilitou a adição de 1% de compostos fenólicos na solução polimérica contendo 2,4% de NaCl e 35% de PHB1 e produziu nanofibras com diâmetro médio de 810 ± 85 nm.

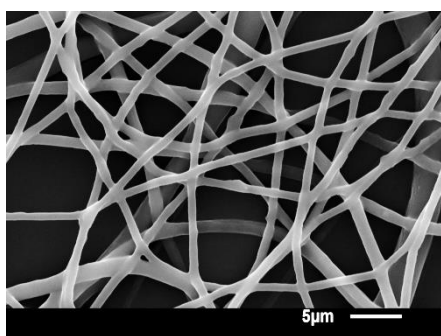
Figura 1 - Nanofibras desenvolvidas a partir de 35 % de PHB1, 2,4 % NaCl (a) e 35 % de PHB1, 2,4 % NaCl e 1% compostos fenólicos (b)



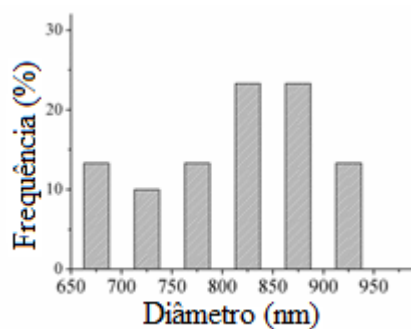
(a)



Diâmetro médio = 814 ± 91 nm



(b)



Diâmetro médio = 810 ± 85 nm

Morais et al. (2015a) também produziram nanofibras com o biopolímero microalgal nas mesmas condições de diâmetro do capilar, taxa de alimentação e distância do capilar ao coletor, porém com potencial elétrico de 24,3 kV e obtiveram como o resultado do diâmetro médio de 1490 ± 147 nm com a solução de 35 %. Martins (2014) obteve nanofibras de PHB microalgal com diâmetro de 1460 ± 257 nm na concentração de 20 %, capilar de 0,55 mm, potencial elétrico de 24,1 kV e taxa de alimentação de 300 $\mu\text{L h}^{-1}$.

Bhattacharjee et al. (2016) produziram nanofibras de PHB comercial através do processo de *electrospinning* e apresentaram diâmetro entre 1400 e 1700 nm. Ramier et al. (2014) também obtiveram nanofibras de PHB comercial com diâmetro de 950 ± 160 nm. Esses autores encontraram valores superiores de diâmetro das nanofibras comparado ao presente estudo.

A viscosidade da solução é um dos parâmetros da solução que influencia na determinação do diâmetro e uniformidade das nanofibras. Altas viscosidades provocam interrupção do processo de *electrospinning*, dificultando a ejeção dos jatos de solução polimérica e baixas viscosidades resultam na formação de gotas ou nanofibras com gotas. Então, é necessário um valor de viscosidade adequado ou considerado ideal para formação e nanofibras uniformes (VENUGOPAL et al., 2008; MA et al., 2005). Geralmente, a viscosidade da solução pode ser ajustada através da concentração de polímero na solução e é influenciada pela massa molecular do polímero (VASITA; KATTI, 2006; SILVA et al., 2004).

As soluções de 35% PHB e 35% PHB com 1% de compostos fenólicos apresentaram viscosidade de 2,50 e 2,40 Pa.s, respectivamente. Morais et al. (2015b) obteve viscosidade de 1,10 Pa.s para solução de 22% de PHB extraído da biomassa de *Spirulina platensis*. O presente estudo encontrou viscosidade maior em relação a Morais et al (2015b) devido a maior concentração de polímero que influencia diretamente no aumento da viscosidade. Além disso, isso resulta em ligações da cadeia polimérica dentro da solução, o que torna o jato contínuo durante o *electrospinning* (RAMAKRISHNA et al., 2005).

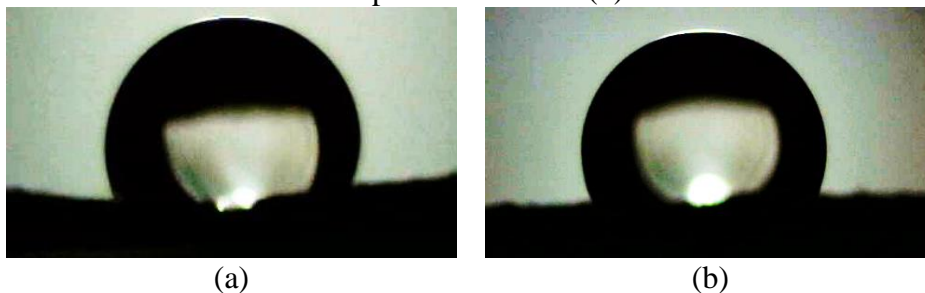
Sombatmankhong et al. (2006) obtiveram viscosidades de 0,43 a 2,30 Pa s, para amostras de PHB comerciais com concentrações entre 10 e 16% ($m v^{-1}$). Neste estudo, os polímeros extraídos tiveram valores de viscosidade superiores a 2,30 Pa.s quando comparados com os polímeros citados na literatura que pode estar relacionado com a massa molecular do PHB que também influencia na viscosidade da solução. Dessa forma, o PHB extraído da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 pode apresentar faixa de massas moleculares diferentes em relação ao comercial, devido a sua composição ou método de extração e purificação, influenciando diretamente no aumento da viscosidade da solução polimérica.

3.2 MOLHABILIDADE E POROSIDADE DAS NANOFIBRAS

A molhabilidade avaliada pelo ângulo de contato da gota de água com a superfície do material indica a qualidade, a rugosidade e a hidrofobicidade/hidrofiliidade da superfície

(RYAN; PODUSKA, 2008; XIU et al., 2008). As nanofibras de 35% PHB e 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos apresentaram ângulos superiores a 90° , sendo $100,7 \pm 1,5^\circ$ e $98,3 \pm 1,4^\circ$, caracterizando um material hidrofóbico (Figura 2).

Figura 2 - Ângulo de contato das nanofibras de 35% PHB (a) e 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos (b)



A análise demonstrou que as nanofibras apresentam caráter hidrofóbico, o que era esperado, uma vez que o biopolímero PHB é um poliéster insolúvel em água. As nanofibras de PHB com compostos fenólicos apresentaram ângulo de contato menor em relação as nanofibras somente com PHB. Isso porque os compostos fenólicos são solúveis em água, oferecendo caráter menos hidrofóbico para o material.

Ramier et al. (2014) realizaram a análise do ângulo de contato nas nanofibras de PHB comercial e obtiveram ângulo $103 \pm 3^\circ$. Arrieta et al. (2015b) mediram o ângulo de contato das nanofibras de PHB também comercial e tiveram como resultado o ângulo de $118,5 \pm 0,9^\circ$. Bhattacharjee et al. (2016) produziram nanofibras de PHB e observaram ângulo de contato superior a 90° . Hosseini et al. (2015) avaliaram o ângulo de contato das nanofibras de PHB e observaram ângulo de $113,1^\circ$. Esses autores apresentaram resultados que confirmam o caráter hidrofóbico das nanofibras de PHB.

Os valores dos ângulos de contato das nanofibras são semelhantes ao ângulo do polietileno de baixa densidade que é atualmente muito utilizado na fabricação de filmes para embalagens de alimentos e é caracterizado por ângulo de contato da água em torno de 100° (FOMBUENA et al., 2013). Dessa forma, as nanofibras produzidas por *electrospinning* podem ser consideradas atraentes para embalagens de alimentos, em que é necessária molhabilidade reduzida para proteger os produtos alimentícios da umidade durante o transporte, manuseamento e armazenamento (ARRIETA et al., 2014).

A análise de porosidade das nanofibras de 35% PHB e 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos resultou em valores de $84,1 \pm 2\%$ e $60,2 \pm 1,8\%$, respectivamente. Através dessa análise, observa-se que a adição dos compostos fenólicos reduziu a porosidade em relação às nanofibras somente com o biopolímero. A menor porosidade favorece a

aplicação como embalagens de alimentos cárneos, pois a permeabilidade de gases como CO₂ e O₂ é um fator que compromete a vida útil destes alimentos. Os gases em alimentos cárneos são responsáveis pela oxidação de lipídios e pela proliferação de bactérias aeróbias, resultando em perdas de qualidade devido a alterações no sabor, cor, textura, valor nutritivo e na redução da vida útil da carne (BRODY et al., 2008).

No entanto, para alimentos como frutas e verduras é necessária alta porosidade como encontrado nas nanofibras de PHB, porque a baixa porosidade pode causar a formação de condições anaeróbias, podendo ao invés de manter a qualidade do produto, induzir a formação de acetaldeído e etanol, causando danos aos tecidos e ocasionando sabor e odor indesejáveis ao alimento (STEFFENS, 2006).

Ramier et al. (2014) analisaram a porosidade de nanofibras de PHB com nanopartículas de hidroapatita e obtiveram 61% de resultado. Zhijiang et al. (2016) determinaram que as nanofibras de PHB comercial possuem porosidade de $86 \pm 2,7\%$. Li, Zhang e Chen (2008) obtiveram nanofibras com blenda de PHB/P3HB4HB e alcançaram porosidade de 83,8%. O presente estudo apresentou porosidade semelhante em comparação com os autores, constatando que com a adição de outro composto também diminuiu a porosidade das nanofibras em relação às nanofibras contendo o polímero.

3.3 PROPRIEDADES TÉRMICAS E MECÂNICAS

O termograma da amostra do biopolímero PHB apresenta dois deslocamentos na linha de base, sendo um de segunda ordem endotérmico em 259,8 °C e outro de segunda ordem exotérmico em 357,7 °C (Tabela 2). O termograma dos compostos fenólicos apresenta pico na curva, representando um de primeira ordem endotérmico em 126,5 °C e outro primeira ordem exotérmico em 321,0 °C. Dessa forma, os termogramas indicam que quando o biopolímero foi submetido ao processo de *electrospinning* formando as nanofibras, os deslocamentos de segunda ordem passaram a caracterizar-se de primeira ordem, o que explica o aumento na entalpia das amostras.

Os termogramas das amostras de nanofibras 35% PHB e 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos apresentam picos de primeira ordem endotérmicos em 243,2 e 241,9 °C, respectivamente, o que indica o ponto de fusão dos materiais. Além disso, observam-se picos exotérmicos em 370,6 e 383,2 °C, o que pode indicar a cristalização, polimerização, oxidação ou degradação oxidativa das nanofibras.

Tabela 2 - Resultados das propriedades térmicas e mecânicas das nanofibras.

Amostras	T_f (°C)	H (J g⁻¹)	X_c (%)	T_{id} (°C)	T_{fd} (°C)	T_{md} (°C)
PHB granular	259,8	- 38,8	26,5	222,7	273,4	249,3
CF	126,5	- 174,5	-	119,9	170,3	140,6
Nanofibras						
PHB	243,2	- 40,3	27,5	221,3	276,3	254,2
PHB/CF	241,9	- 127,8	87,2	231,8	302,6	287,0

CF: compostos fenólicos; T_f: temperatura de fusão; H: entalpia; X_c: cristalinidade; T_{id}: temperatura inicial de degradação; T_{fd}: temperatura final de degradação; T_m: temperatura de máxima degradação; Tr : resistência à tração; Al: alongamento;
-: amostra não analisada.

A diferença de entalpia nas amostras de nanofibras pode ser devido a adição dos compostos fenólicos, os quais apresentam entalpia maior em relação ao biopolímero, o que indica a incorporação destes compostos nas nanofibras. Além disso, as nanofibras poliméricas apresentaram temperatura de fusão menor e entalpia mais elevada em relação ao biopolímero PHB. Isso pode ter ocorrido devido o processo de *electrospinning* que modifica as cadeias macromoleculares na direção longitudinal da nanofibra alterando as propriedades térmicas do material (AOU; HSU, 2006; PEPONI; GARCÍA, KENNY, 2015).

O índice de cristalinidade das nanofibras de 35% PHB manteve-se constante em relação ao biopolímero sólido, no entanto, as nanofibras de 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos aumentou a cristalinidade em relação ao biopolímero, indicando sua incorporação às nanofibras.

A estabilidade térmica das nanofibras verificada pela análise de TGA exibiram valores de temperatura de máxima degradação que variaram de 254,2 °C a 287 °C, enquanto que a degradação do PHB ocorreu em 249,3 °C. Esta mudança de temperatura pode ser atribuída à maior área superficial específica das estruturas das nanofibras, o que levou ao aquecimento uniforme dentro destes materiais. Ramier et al. (2014) encontraram temperatura de máxima degradação de 252 °C para nanofibras de PHB comercial e Arrieta et al. (2015c) exibiram valor de 257,6 °C para nanofibras de PHB comercial. O valor apresentando no presente estudo está próximo aos valores encontrados pelos autores para o PHB comercial.

Pode-se afirmar que as nanofibras foram termicamente estáveis entre 250 e 290 °C, o que é favorável para aplicação em alimentos, uma vez que este material é destinado a ser utilizado a temperatura consideravelmente mais baixa como no processo de embalagem, armazenamento e transporte (ARRIETA et al., 2015b). Além disso, Ferreira (2012) estudou as propriedades térmicas de filmes para embalagens de alimentos compostos de polietileno linear

de baixa densidade e polietileno de baixa densidade contendo sorbato de potássio como agente antimicrobiano. O autor verificou que a temperatura de fusão foi 124 °C, entalpia de 124 J g⁻¹ e cristalinidade de 43 %, favorecendo a aplicação das nanofibras de PHB contendo os compostos fenólicos como embalagens de alimentos.

A curva termogravimétrica gerada quando os compostos fenólicos foram incorporados às nanofibras de PHB apresentaram comportamento de perda de massa praticamente idêntico à curva das nanofibras produzidas apenas com PHB, o que evidencia que a adição dos compostos não altera a estabilidade térmica das nanofibras.

A diferença das temperaturas iniciais, finais e de máxima degradação nas nanofibras, pode estar relacionado com a adição dos compostos fenólicos, o que confirma novamente a incorporação dos mesmos nas nanofibras, uma vez que se os compostos estivessem livres nas amostras, causariam o surgimento de outras regiões de declínio na curva na faixa de aproximadamente 120 °C a 170 °C.

Através da análise de TGA pode-se verificar que as nanofibras não apresentaram traços do solvente utilizado na solução polimérica, uma vez que, o clorofórmio possui ponto de evaporação na temperatura de 61,2 °C. Assim, verificou-se em todas as curvas que não houve nenhuma alteração visível nesta faixa de temperatura. Em virtude destes resultados, pode-se concluir que houve a eliminação completa do solvente durante a formação das nanofibras no *electrospinning*.

As propriedades mecânicas das nanofibras como a resistência a tração foi 2,3±0,2 e 2,9±0,5 MPa para as nanofibras de 35% PHB e 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos. O alongamento de nanofibras de 35% PHB e 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos foi 60,6±7,1 e 71,5±2,5%, respectivamente.

A adição dos compostos fenólicos melhoraram as propriedades mecânicas das nanofibras, isso pode ser atribuído às interações positivas entre o biopolímero e os compostos, que estão distribuídos dentro das nanofibras, que resultou em transferência de carga eficiente. Além disso, o aumento nas propriedades mecânicas das nanofibras de PHB com os compostos fenólicos pode estar relacionado com o menor diâmetro, que também fornece maior capacidade para absorver energia antes de romper (CHEN; LIU, 2008; ABDELWAHAB et al., 2012).

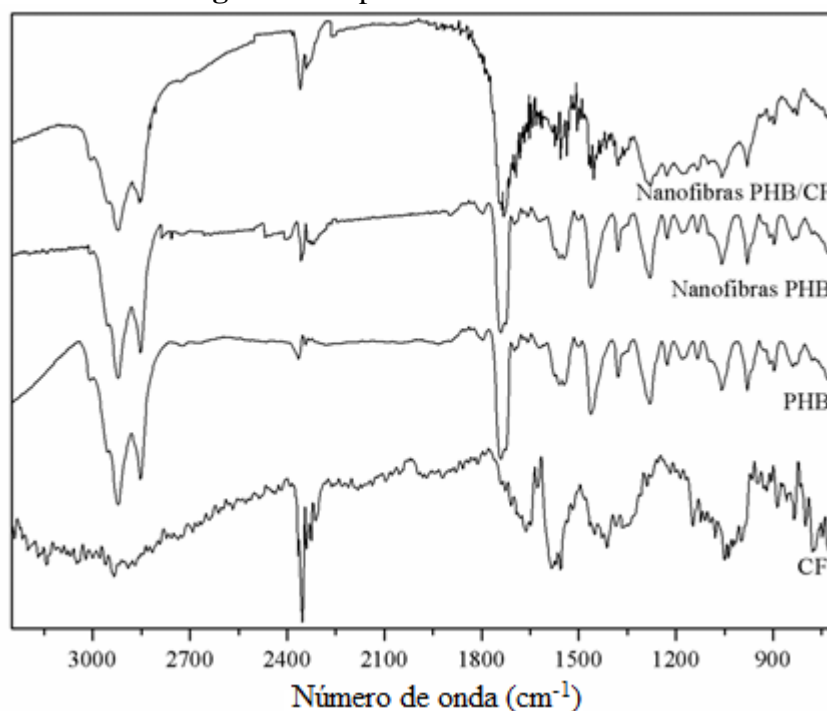
Ferreira (2012) obteve alongamento de 15% e resistência à tração de 2,8 MPa para filmes de embalagens de alimentos compostos de polietileno linear de baixa densidade, polietileno de baixa densidade contendo sorbato de potássio como agente antimicrobiano. O

presente estudo exibiu maior alongamento e resistência semelhante, o que confirma a potencial aplicabilidade das nanofibras em alimentos.

3.4 ANÁLISE QUÍMICA E ESTRUTURAL DAS NANOFIBRAS

Para verificação das espécies químicas e confirmação da incorporação dos compostos fenólicos (CF), foi utilizado espectro de FTIR na região de $3500-700\text{ cm}^{-1}$. Os dois fragmentos encontrados próximos a 3000 cm^{-1} correspondem as ligações carbono-hidrogênio (C-H), sendo a banda característica do biopolímero PHB, uma vez que, a mesma encontra-se ausente no espectro dos compostos fenólicos (Figura 3). Além disso, a intensidade desses picos nas nanofibras de 35% PHB/1% CF foi reduzida, o que pode ser relacionado com a interação dos compostos fenólicos com o biopolímero.

Figura 3 - Espectro FTIR das amostras



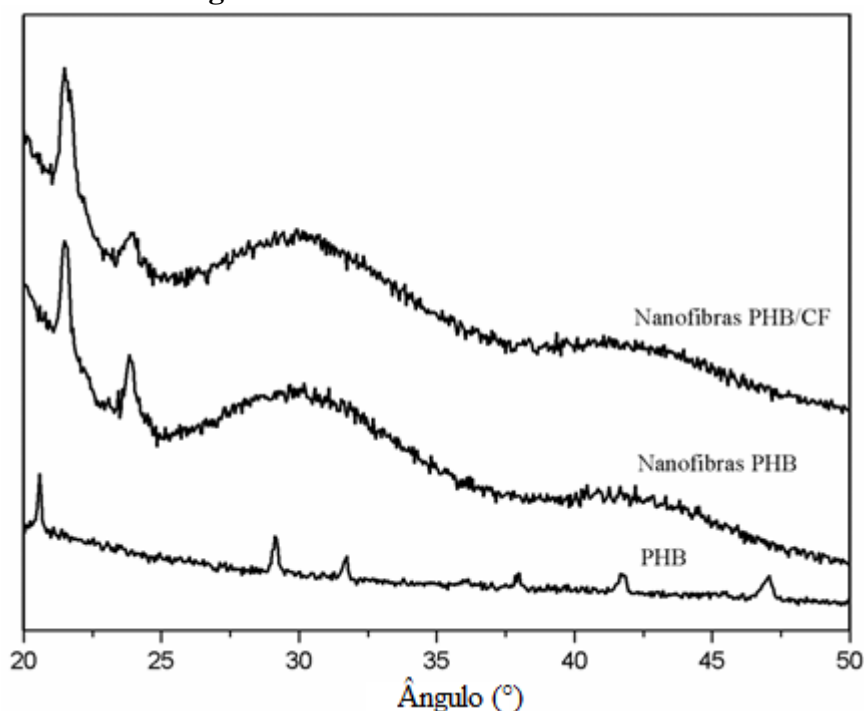
O pico detectado próximo de 2350 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H dos compostos fenólicos e também a deformação simétrica da ligação O-C-O (oxigênio-carbono). Observa-se que este pico tem maior intensidade no espectro CF, intensidades equivalentes no espectro PHB e nanofibras de 35% PHB, porém com intensidade intermediária no espectro nanofibras 35% PHB/1% CF, o que confirma a incorporação dos compostos fenólicos nas nanofibras. Outro pico característico do PHB é observado na banda 1739 cm^{-1} que corresponde a vibração de alongamento da ligação carbonila (C=O) que está associado com o estado cristalino do PHB (AURAS; HARTE; SELKE, 2004; FURUKAWA et al., 2005;

SINDHU et al., 2011; ZHANG; THOMAS, 2011). Este pico se mantém nas nanofibras, porém com menor intensidade nas nanofibras com os compostos fenólicos, devido a interação destes materiais.

Os fragmentos encontrados em 1382 cm^{-1} emerge a deformação simétrica do grupo metil (CH_3) (FURUKAWA et al., 2005), o que mostra menor intensidade com interação do PHB e CF, a banda em 1278 cm^{-1} atribuído ao alongamento de carbono-oxigênio ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}$) da fase cristalina do PHB (SINDHU et al., 2011), entre 1200 e 1000 cm^{-1} equivalem aos grupos metil (CH_3), metileno (CH_2) e alongamentos dos grupos $\text{C}-\text{O}$ e $\text{C}=\text{O}$. Além disso, os picos atribuídos ao acoplamento de estrutura $\text{C}-\text{C}$ com a vibração de alongamento do grupo metil e as bandas de vibração cristalina $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ são verificadas em 978 cm^{-1} e 895 cm^{-1} , respectivamente (BAYAR; SEVERCAN, 2005).

A análise de difração de raios-X foi utilizada para estudar a mudança da estrutura cristalina nas nanofibras como consequência do processo de *electrospinning* e adição dos compostos fenólicos (Figura 4).

Figura 4 - Resultado DRX das amostras



O PHB apresentou diversos picos cristalinos de reflexão com baixa intensidade em $2\theta = 21,0^\circ; 29,1^\circ; 31,8^\circ; 37,9^\circ; 41,7^\circ$ e $47,1^\circ$. As amostras de nanofibras de PHB e nanofibras de PHB/CF apresentaram picos cristalinos de reflexão com maior intensidade em $21,5^\circ$ e $23,9^\circ$ em relação ao biopolímero. As nanofibras apresentaram halos amorfos de baixa intensidade em $2\theta = 30,2^\circ$ e $42,5^\circ$. Essa diferença na intensidade, localização dos picos e

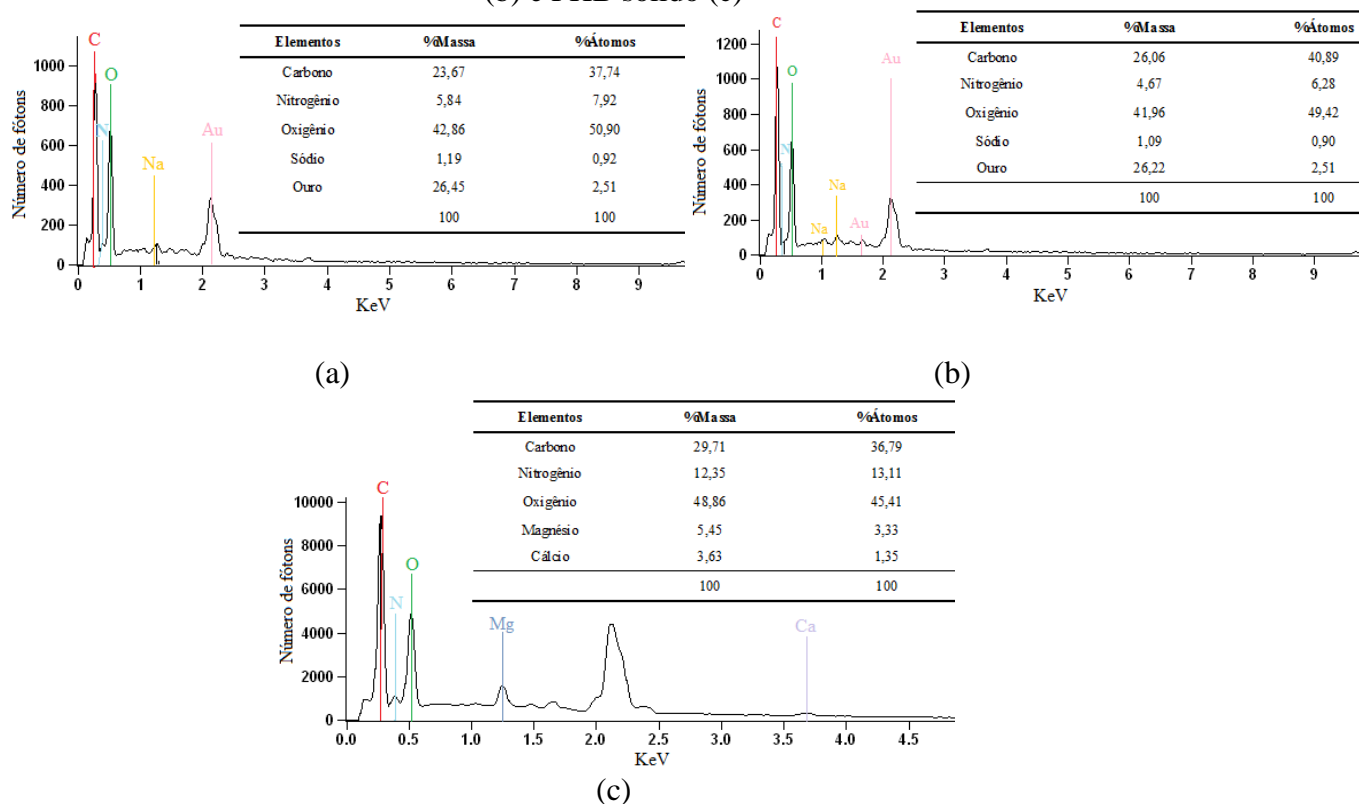
halos amorfos pode ser devido ao rearranjo das moléculas durante o processo de *electrospinning*, que pode ter provocado aumento na mobilidade da cadeia polimérica, distorcendo a estrutura cristalinidade do material, devido a aplicação do potencial elétrico.

Na literatura foram encontrados registros de picos típicos do PHB comercial em $2\theta = 19,8^\circ$; $22,2^\circ$ e $25,0^\circ$, sendo valores aproximados dos três primeiros picos deste estudo (ABDELWAHAB et al, 2012; ARRIETA et al, 2015a). Outros picos ao longo da amostra podem estar relacionados com substâncias desconhecidas ou impurezas, uma vez que o biopolímero extraído da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 não foi purificado.

3.5 COMPOSIÇÃO DAS NANOFIBRAS E QUANTIFICAÇÃO DO PHB

A Figura 5 apresenta a composição das amostras detectada por detector de elétrons retro-espalhado (EDS), em que se observa moléculas de ouro nas nanofibras, pois ao fazer à análise as mesmas foram recobertas com ouro para poder visualizá-las no MEV. Nas nanofibras também foi detectada a presença do sódio, devido a adição de cloreto de sódio na solução polimérica. Não foi possível caracterizar nenhuma molécula referente aos compostos fenólicos, pois o equipamento só detecta substâncias que estejam na concentração próximo ou acima de 3%.

Figura 5 - EDS das nanofibras de PHB contendo compostos fenólicos (a), nanofibras de PHB (b) e PHB sólido (c)



Na amostra do PHB foi observado carbono, nitrogênio e oxigênio os quais também estavam presentes nas amostras de nanofibras. Verificou-se a presença de moléculas de magnésio e cálcio, as quais podem ser resíduos decorrentes da extração do PHB, o que confirma as impurezas detectadas na análise da cromatografia.

A pureza do PHB foi analisada com os cromatogramas obtidos para quantificação do PHB, em que foi possível observar a ocorrência do monômero (3HB), visto que este apresentou tempo de retenção equivalente ao padrão. Dessa forma, o índice de pureza foi calculado com a equação da curva padrão do monômero (3HB) e a área do pico da amostra, apresentando valor de 3%. Não foi empregado nenhum método de purificação no biopolímero extraído da microalga, o que pode ter ocasionado no baixo índice de pureza, bem como as impurezas presentes podem ter conferido interferência na cristalinidade do PHB.

3.6 PROPRIEDADE ANTIBACTERIANA

As nanofibras de 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos apresentaram halo de inibição para o micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Apêndice 1), confirmando que os compostos fenólicos foram incorporados nas nanofibras e que não perderam sua atividade após o processo de *electrospinning*. A bactéria *Escherichia coli* ATCC 25972 mostrou maior resistência às nanofibras contendo os compostos fenólicos. Isto pode ter ocorrido devido à composição diferenciada da membrana das bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*) em relação a gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). A parede celular de gram-negativas possui um componente adicional, a membrana externa, que corresponde a segunda bicamada lipídica, que adere firmemente à camada de peptidoglicano, conferindo maior rigidez. A face externa da membrana é composta de lipopolissacarídeos, o que a torna mais lipofílica em relação a substâncias exógenas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011). Dessa forma, bactéria *Escherichia coli* ATCC 25972 exige maior concentração de compostos fenólicos nas nanofibras para permitir a inibição da mesma.

Fernandes et al. (2014) avaliaram a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* da substância clorexidina incorporada em nanofibras de blenda de PHB e poli (óxido de etileno). As nanofibras com o composto apresentaram maior halo de inibição em relação as nanofibras controle, além disso, foi verificada maior inibição do crescimento da bactéria *S. aureus*. Bhattacharjee et al. (2016) também estudaram a atividade do composto doxiciclina presente nas nanofibras de PHB e observaram maior halo de inibição frente ao micro-organismo *S. aureus* em relação a *E. coli*. Ambos autores justificaram a maior inibição do

crescimento bacteriano do *S. aureus* devido que a CIM para esta bactéria é menor em relação a *E. coli*.

Os compostos fenólicos ressuspensos em clorofórmio apresentaram halo de inibição também para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Este resultado confere que o solvente não interferiu na atividade dos compostos fenólicos, apresentando a mesma atividade quando incorporados às nanofibras. No entanto, para o micro-organismo *Escherichia coli* ATCC 25972 os compostos fenólicos não apresentaram atividade, o que pode estar relacionado também com a CIM. As bactérias apresentaram resistência em relação às nanofibras somente produzidas com o PHB, sendo o mesmo pode ser observado com o filme de PHB (Apêndice 2), confirmando que o biopolímero não apresentou atividade biológica frente estas bactérias.

Os alimentos produzidos sob boas práticas de fabricação apresentam baixo crescimento bacteriano, assim, a inibição observada das nanofibras neste estudo pode ser muito importante para aplicação nesta área. Além disso, é importante a utilização das nanofibras com o antibacteriano como revestimentos ou embalagens de alimentos, pois quando os compostos fenólicos entram em contato direto com as superfícies dos produtos pode ocorrer perda de sua atividade (HOANG et al., 2010; GIALAMAS et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

Os compostos fenólicos extraídos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foram incorporados nas nanofibras conferindo propriedades funcionais ao material. Dessa forma, foi possível produzir nanofibras de PHB contendo compostos fenólicos com diâmetro médio de 810 ± 85 nm. A partir da análise do ângulo de contato verificou-se que as nanofibras de PHB com os compostos fenólicos tem caráter hidrofóbico com porosidade de $60,2 \pm 1,8\%$. As propriedades térmicas confirmaram a incorporação dos compostos fenólicos nas nanofibras apresentando temperatura de máxima degradação de $287,0$ °C para nanofibras de PHB com os compostos fenólicos, além disso, as propriedades mecânicas como resistência à tração e alongamento aumentaram com a adição dos mesmos às nanofibras. O espectro FTIR apresentou bandas características do PHB e dos compostos fenólicos nas nanofibras, confirmando novamente a incorporação do extrato. A análise da atividade biológica determinou que as nanofibras de PHB contendo os compostos fenólicos apresentam propriedade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com halo de inibição de $7,5 \pm 0,4$ mm. As nanofibras poliméricas produzidas com a adição dos compostos fenólicos,

permite a aplicação na área de embalagens de alimentos, porque o extrato além de aumentar as propriedades térmicas e mecânicas das nanofibras, proporcionou atividade antibacteriana garantindo a qualidade e segurança dos alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHAB, M. A.; FLYNN, A.; CHIOU, B. S.; IMAM, S.; ORTS, W.; CHIELLINI, E. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA–PHB blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 9, p. 1822–1828, 2012.

AOU, K.; HSU, S. L. Trichroic vibrational analysis on the α -form of poly(lactic acid) crystals using highly oriented fibers and spherulites. **Macromolecules**, v. 39, n. 9, p. 3337–3344, 2006.

ARRIETA, M. P.; FORTUNATI, E.; DOMINICI, F.; LÓPEZ, J.; KENNY, J. M.; Bionanocomposite films based on plasticized PLA–PHB/cellulose nanocrystal blends, **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 265–275, 2015a.

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.

ARRIETA, M. P.; LÓPEZ, J.; LÓPEZ, D.; KENNY, J. M.; PEPONI, L. Development of flexible materials based on plasticized electrospun PLA-PHB blends: structural, thermal, mechanical and disintegration properties. **European Polymer Journal**, v. 73, p. 433–446, 2015b.

ARRIETA, M. P.; LÓPEZ, J.; LÓPEZ, D.; KENNY, J. N.; PEPONI, L. Biodegradable electrospun bionanocomposite fibers based on plasticized PLA–PHB blends reinforced with cellulose nanocrystals. **Industrial Crops and Products**, 2015c.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Standard practice for scanning electron microscope beam size characterization**. ASTM E986 – 04, West Conshohocken, PA, USA, 2010.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Standard test method for rapid thermal degradation of solid electrical insulating materials by thermogravimetric method (TGA)**. ASTM D3850 – 12, West Conshohocken, 2013.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Standard test method for assignment of the DSC procedure for determining Tg of a polymer or an elastomeric compound**. ASTM D7426 – 08, West Conshohocken, 2013.

AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 9, p. 835–864, 2004.

BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly- β -hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, n. 3, 2013.

BAYAR, S.; SEVERCAN, F. FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). **Journal of Molecular Structure**, v. 744–747, p. 529–534, 2005.

BEACHLEY, V.; WEN, X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 3, 2009.

BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; BELL, I. J. S. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, 2011.

BHATTACHARJEE, A.; KUMAR, K.; ARORA, A.; KATTI, D. S. Fabrication and characterization of pluronic modified poly(hydroxybutyrate) fibers for potential wound dressing applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 63, p. 266–273, 2016.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) from potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–82, 1988.

BRODY, A. L.; BUGUSU, B.; HAN, J. H.; SAND, C. K.; MCHUGH, T. H. Innovative food packaging solutions. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 8, p. 107–116, 2008.

BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LAZZERI, A.; ALVAREZ, V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. **Polymer Letters**, v. 8, n. 11, p. 791–808, 2014.

CHEN, G.; LIU, H. Electrospun cellulose nanofiber reinforced soybean protein isolate composite film. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, p. 641–646, 2008.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.

DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 3, p. 255–264, 2008.

FERNANDES, J. G.; CORREIA, D. M.; BOTELHO, G.; PADRÃO, J.; DOURADO, F.; RIBEIRO, C.; MÉNDEZ, S. L.; SENCADAS, V. PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. **Polymer Testing**, v. 34, p. 64–71, 2014.

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

FOMBUENA, V.; BALART, J.; BORONAT, T.; NÁCHER, L. S.; SANOGUERA, D. G. Improving mechanical performance of thermoplastic adhesion joints by atmospheric plasma. **Materials and Design**, v. 47, p. 49–56, 2013.

FURUKAWA, T.; SATO, H.; MURAKAMI, R.; ZHANG, J.; DUAN, Y. X.; NODA, I.; OCHIAI, S.; OZAKI, Y. Structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly(l-lactic acid) blends studied by FTIR microspectroscopy and differential scanning calorimetry. **Macromolecules**, v. 38, n. 15, p. 6445–6454, 2005.

GIALAMAS, H.; ZINOVIADOU, K. G.; BILIADERIS, C. G.; KOUTSOUMANIS, K. P. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Research International**, v. 43, n. 10, p. 2402–2408, 2010.

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

HOANG, L. C.; GRÉGOIRE, L.; CHAINE, A.; WACHÉ, Y. Importance and efficiency of in depth antimicrobial activity for the control of listeria development with nisin incorporated sodium caseinate films. **Food Control**, v. 21, p. 1227–1233, 2010.

HOSSEINI, S.; AZARI, P.; FARAHMAND, E.; GAN, S. N.; ROTHAN, H. A.; YUSOF, R.; KOOLE, L. H.; DJORDJEVIC, I.; IBRAHIM, F. Polymethacrylate coated electrospun PHB fibers: An exquisite outlook for fabrication of paper-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 69, p. 257–264, 2015.

LI, X. T.; ZHANG, Y.; CHEN, G. Q. Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials. **Biomaterials**, v. 29, n. 27, p. 3720–3728, 2008.

MA, Z.; KOTAKI, M.; INAI, R.; RAMAKRISHNA, S. Potential of nanofiber matrix as tissue engineering scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 1-2, p. 101–109, 2005.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–1542, 2013.

MARTINS, R. G. **Síntese, extração e caracterização de biopolímeros de origem microalgal para desenvolvimento de nanofibras**. 148 f. Tese (doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MO, X. M.; XU, C. Y.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1883-1890, 2004.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60-64, 2009.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Spirulina* LEB 18 for developing nanofibers. **Polímeros**, v. 25, n. 2, 2015a.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Biofunctionalized nanofibers using *Arthrospira* (*Spirulina*) biomass and biopolymer. **BioMed Research International**, v. 15, 2015b.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS).

Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

PALAVRA, A. M. F.; COELHO, J. P.; BARROSO, J. G.; RAUTER, A. P.; FARELEIRA, J. M. N. A.; MAINAR, A.; URIETA, J. S.; NOBRE, B. P.; GOUVEIA, L.; MENDES, R. L.; CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from microalgae and volatile oils from aromatic plants. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 60, p. 21–27, 2011.

PEPONI, L.; GARCÍA, A. M.; KENNY, J. M. Electrospinning of PLA. In: **Poly (lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties, Additives and Applications**. Londres: The Royal Society of Chemistry, 2015. Cap. 6.

RAMAKRISHNA, S.; FUJUHARA, K.; TEO, W. E.; LIM, T. C.; MA, Z. **An introduction to electrospinning and nanofibers**. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2005.

RAMIER, J.; BOUDERLIQUE, T.; STOILOVA, O.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I.; LANGLOIS, V.; RENARD, E.; ALBANESE, P.; GRANDE, D. Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 38, p. 161–169, 2014.

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

RYAN, B. J.; PODUSKA, K. M. Roughness effects on contact angle measurements. **American Journal of Physics**, v. 76, n. 11, p. 1074-1077, 2008.

SILVA, G. A.; CZEISLER, C.; NIECE, K. L.; BENIASH, E.; HARRINGTON, D. A.; KESSLER, J. A.; STUPP, S.I. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. **Science**, v. 303, n. 5662, p. 1352–1355, 2004.

SINDHU, R.; AMMU, B.; BINOD, P.; DEEPTHI, S. K.; RAMACHANDRAN, K. B.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 783-794, 2011.

SOMBATMANKHONG, K.; SUWANTONG, O.; WALEETORNCHEEPSAWAT, S.; SUPAPHOL, P. Electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blends. **Journal of Polymer Science. Part B, Polymer Physics**, v. 44, n. 19, p. 2923-2933, 2006.

SONG, K.; WU, Q.; ZHANG, Z.; REN, S.; LEI, DOOLEY, T. K. M.; LIU, D.; JANES, M. E. Fabricating electrospun nanofibers with antimicrobial capability: A facile route to recycle biomass tar. **Fuel**, v. 150, p. 123–130, 2015.

- SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; FURLONG, E. B. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, 2011.
- STEFFENS, C. A. **Respiração e permeabilidade de filmes poliméricos**. 88f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- VASITA, R.; KATTI, D. S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. **Journal of International of Nanomedicine**, v. 1, n. 1, p. 15–30, 2006.
- VENUGOPAL, J.; LOW, S.; CHOON, A. T.; RAMAKRISHNA, S. Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 84, n. 1, p. 34–48, 2008.
- WONG, S. C.; BAJI, A.; LENG, S. Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly (ϵ -caprolactone). **Polymer**, v. 49, n. 21, p. 4713-4722, 2008.
- XIU, Y.; ZHU, L.; HESS, D. W.; WONG, C. P. Relationship between work of adhesion and contact angle hysteresis on superhydrophobic surfaces. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 30, p. 11403-11407, 2008.
- XU, X.; CHEN, X.; LIU, A.; HONG, Z.; JING, X. Electrospun poly(l-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(l-lactide) nanocomposite fibers. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3187–3196, 2007.
- ZHANG, M.; THOMAS, N. L. Blending polylactic acid with polyhydroxybutyrate: The effect on thermal, mechanical, and biodegradation properties. **Advances in Polymer Technology**, v. 30, n. 2, p. 67-79, 2011.
- ZHANG, Y. Z.; LIU, G. M.; WENG, W. Q.; DING, J. Y.; LIU, S. J. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82–8, 2015.
- ZHAO, S.; WU, X.; WANG, L.; HUANG, Y. Electrospinning of ethylecyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, n. 1, 2004.
- ZHIJIANG, C.; YI, X.; HAIZHENG, Y.; JIA, J.; LIU, Y. Poly(hydroxybutyrate)/cellulose acetate blend nanofiber scaffolds: Preparation, characterization and cytocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 757–767, 2016.

ARTIGO 3

**COMPOSTOS FENÓLICOS MICROALGAIS COM AÇÃO ANTIBACTERIANA
ADICIONADOS EM NANOFIBRAS DE QUITOSANA E PEO**

RESUMO

A quitosana é um polímero natural que apresenta biodegradabilidade e atividade biológica como antibacteriana e antifúngica. A adição de compostos fenólicos microalgais tornam as nanofibras com potencial aplicação na área de alimentos devido a atividade antibacteriana destes compostos. O polímero sintético poli (óxido de etileno) (PEO) apresenta característica de baixo custo e fácil maleabilidade para produzir nanofibras por *electrospinning*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanofibras de quitosana e PEO e incorporar compostos fenólicos microalgais com potencial aplicação como embalagens antibacterianas. As nanofibras poliméricas de quitosana, PEO e compostos fenólicos foram caracterizados quanto a morfologia, propriedades térmicas, hidrofobicidade, verificação de estrutura, espécies químicas e atividade antibacteriana. As nanofibras de quitosana/PEO contendo compostos fenólicos apresentaram diâmetro médio de 214 ± 37 nm. A temperatura de máxima degradação e ângulo de contato para as nanofibras com os compostos fenólicos foram 323 °C e $26,9 \pm 3,1$ °, respectivamente, que caracteriza nanofibras hidrofílicas. O espectro infravermelho confirmou a incorporação dos compostos fenólicos nas nanofibras e a difração de raios-X caracterizou as nanofibras como estrutura amorfa. As nanofibras contendo os compostos fenólicos apresentaram atividade biológica frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25972 com halos de inibição de $6,4 \pm 1,1$ e $5,5 \pm 0,4$ mm, respectivamente. Portanto, as nanofibras poliméricas produzidas por *electrospinning* apresentam potenciais características para a aplicação como embalagens de alimentos. Além disso, a adição de compostos fenólicos extraídos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 direciona a aplicabilidade para embalagens com atividade antibacteriana, o que irá prolongar a vida útil e proteger os alimentos.

Palavras-chave: *Electrospinning*. Micro-organismos. Polímero natural. *Spirulina*.

PHENOLICS COMPOUNDS MICROALGAL WITH ANTIBACTERIAL ACTION ADDED IN CHITOSAN NANOFIBERS

ABSTRACT

Chitosan is a natural polymer that presents biodegradability and biological activity as antibacterial and antifungal. The addition of microalgal phenolic compounds makes nanofibers with potential application in the food area due to the antibacterial activity of these compounds. Synthetic polymer poly (ethylene oxide) (PEO) features low cost and easy malleability to produce nanofibers by electrospinning. The aim of this study was to develop chitosan and PEO nanofiber and incorporate phenolic compounds microalgal with potential use as antibacterial packaging. Polymeric nanofibers chitosan, PEO and phenolics compounds were characterized for their morphology, thermal and mechanical properties, hydrophobicity, composition, chemical species verification and antibacterial activity. The chitosan/PEO nanofibers containing phenolic compounds had a mean diameter of 214 ± 37 nm. The maximum degradation temperatures and contact angle for the nanofibers with the phenolic compounds were 323 °C and 26.9 ± 3.1 °, respectively. The infrared spectrum confirmed the phenolic compounds incorporation in the nanofibres and the X-ray diffraction characterized the nanofibers as amorphous structure. The nanofibers containing the phenolic compounds presented biological activity against the microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25972 with inhibition zones of 6.4 ± 1.1 and 5.5 ± 0.4 mm, respectively. Therefore, polymeric nanofibers produced by electrospinning have potential characteristics for application as food packaging. Furthermore, the addition of phenolic

compounds extracted from *Spirulina* sp. LEB 18 directs the applicability for packaging with antibacterial activity, which will extend shelf life and protect food.

Keywords: Electrospinning. Microorganismos. Natural polymer. *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento microbiano acelera mudanças no aroma, cor e textura dos alimentos, resultando em redução da vida útil e aumento do risco de doenças transmitidas por produtos contaminados. Uma alternativa para reduzir ou inibir o crescimento bacteriano nos alimentos é o uso de embalagens ativas que, além da barreira inerte ao ambiente externo, podem fornecer propriedades que melhoram a preservação de alimentos (BAUZA et al., 2016). Uma tecnologia promissora de embalagens ativas consiste na incorporação de aditivos nos sistemas de embalagem (KERRY et al., 2006). Esta abordagem tenta combinar os novos conhecimentos em nanotecnologia em alimentos com a biotecnologia, a fim de prolongar a vida útil e promover a segurança alimentar aos consumidores.

As embalagens ativas incluem a utilização de polímeros e compostos antimicrobianos naturais, com a finalidade de desenvolver estruturas que não prejudiquem o meio ambiente e reduzam a utilização humana de conservantes sintéticos. Dessa forma, a quitosana é um polímero natural sendo um aminopolissacarídeo obtido a partir da reação de desacetilação da quitina (VELDE; KIEKENS, 2004). Este polímero apresenta propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade, quelação com metais e atividade antimicrobiana (RINAUDO, 2006; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). As propriedades antibacterianas e antifúngicas encontradas na quitosana também são vantajosas durante o armazenamento e preservação de alimentos (LI et al., 1992; HUDSON; SAMUEL; JENKINS, 2001; KHOR; LIM, 2003).

As tecnologias desenvolvidas na preservação de alimentos têm sido direcionadas na aplicação de substâncias antimicrobianas naturais para reduzir a proliferação de microorganismos. Diferentes compostos naturais, como os compostos fenólicos de origem microalgal, podem ser incorporados nas embalagens para intensificar a propriedade antibacteriana da quitosana. Os compostos fenólicos presentes nas microalgas são os ácidos fenólicos, que podem apresentar várias atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antibacteriana e antifúngica (SOUZA et al., 2011).

As nanofibras poliméricas apresentam propriedades importantes para aplicação em alimentos devido ao seu diâmetro nanométrico que otimiza as propriedades mecânicas como elasticidade, resistência, alta porosidade e elevada área superficial em relação ao

volume (BEACHLEY; WEN, 2009). Além disso, as nanofibras aplicadas para embalagens apresentam o diferencial de direcionar além de proteger os compostos antimicrobianos aos alimentos de forma gradual e controlada, devido a elevada porosidade e a presença dos interstícios. Dessa forma, nanofibras adicionadas de compostos com atividades biológicas proporcionam que a embalagem interaja com o alimento inibindo o crescimento microbiológico, protegendo os produtos do ambiente externo e proporcionando maior segurança alimentar para o consumidor. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanofibras de quitosana e PEO e incorporar compostos fenólicos microalgais com potencial aplicação como embalagens antibacterianas.

2 METODOLOGIA

2.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18

A microalga utilizada neste estudo foi *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira localizada no extremo sul do Brasil, na cidade de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul (MORAIS et al., 2008). Esta microalga foi cultivada na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) localizada às margens da Lagoa Mangueira em três biorreatores tipo *raceway* de 10000 L cada (MORAIS et al., 2009).

Ao final do cultivo a biomassa microalgal foi colhida, utilizando filtro de 200 μm , concentrada em prensa hidráulica e extrusada. Após a extrusão, a biomassa foi seca a 50 °C durante 4 h em secador de bandejas, moída em moinho de bolas por 2 h e peneirada em peneira aço inox de 37 μm (Granutest, Brasil). Posteriormente, a biomassa foi armazenada sob refrigeração (MORAIS et al., 2009).

2.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A extração dos compostos fenólicos foi realizada com 2 g de biomassa da *Spirulina* sp. LEB 18 seca, em que se adicionou 10 mL de metanol e, posteriormente, colocou-se a solução em agitador orbital (New Brunswick, I44, Alemanha) a 200 rpm, 25 °C por 60 min. Após, a solução repousou por 15 min e novamente foi adicionado 10 mL de metanol e resubmetida a agitação. Em seguida, foi realizada a filtração e clarificação da solução a partir de 5 mL de hidróxido de bário 0,1 mol L⁻¹ e 5 mL sulfato de zinco 5 % (m v⁻¹). Esta solução foi centrifugada (Hitachi, CT 6EL, China) a 3220 xg por 10 min. O

sobrenadante contendo os compostos fenólicos foi retirado com pipeta de Pasteur (SOUZA et al., 2011). O extrato utilizado na solução polimérica foi colocado em rotaevaporador (Quimis 344B2, Brasil) a 60 °C para remoção do metanol e após foi ressuspensão em ácido acético.

2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

As soluções poliméricas foram preparadas nas concentrações de 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 % (m v^{-1}) de quitosana ($60\text{-}120,000 \text{ g mol}^{-1}$) nos solventes ácido acético P.A., solução ácido acético de 3 e 4 % (v v^{-1}) e água mili-Q. Soluções de quitosana nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7% (m v^{-1}) e blendas de 2 e 3 % (m v^{-1}) de quitosana com 2% (m v^{-1}) de poli (óxido de etileno) (PEO) ($900,000 \text{ g mol}^{-1}$) (Sigma-Aldrich®, USA) foram preparadas com ácido acético 90% (v v^{-1}). Na solução que formou nanofibras uniformes, foram incorporados os compostos fenólicos, os quais foram extraídos da biomassa e após evaporação do metanol em rotaevaporador foram ressuspensos em 25 mL de ácido acético 90% (v v^{-1}), resultando em uma solução com concentração de 1% (m v^{-1}). A solução polimérica contendo compostos fenólicos foi com a concentração de polímeros que formou nanofibras uniformes e com menor diâmetro, os quais foram solubilizados com 1 mL da solução de ácido acético 90% (v v^{-1}) contendo 1% (m v^{-1}) dos compostos fenólicos. Todas as soluções foram submetidas em agitador magnético (Fisatom, Brasil) por 16 h.

2.4 DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS

O equipamento de *electrospinning* consiste de bomba de deslocamento positivo (Modelo KDS 100, KD Scientific, Estados Unidos) e fonte de alimentação de corrente contínua de alta tensão (Modelo ET 5000 CC, Electric Test Sert, Brasil). As soluções poliméricas foram injetadas através dos capilares com diâmetro de 0,45; 0,55; 0,70 e 0,80 mm. Os potenciais elétricos testados foram 15, 20 e 25 kV, as distâncias do capilar ao coletor foram 100 e 140 mm e as taxas de alimentação foram 500 e 1000 $\mu\text{L h}^{-1}$. Todos os testes foram conduzidos à 20 °C e umidade relativa de 60 ± 1 %.

2.5 FORMA E DIÂMETRO DAS NANOFIBRAS

As imagens e trinta medidas de diâmetros das nanofibras com e sem os compostos fenólicos foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JSM-6610 LV, Japão). Antes das análises, as amostras foram fixadas em suporte metálico e recobertas com

ouro, utilizando o metalizador *diode sputtering* (Denton Vacuum CAR001-0038, Estados Unidos) (ASTM E986-04, 2010).

2.6 VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES

As viscosidades das soluções poliméricas foram determinadas através de reômetro (Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer, Estados Unidos), a partir de amostras de 0,5 mL de cada solução.

2.7 POROSIDADE

A porosidade das nanofibras foi calculada a partir da Equação 1 (XU et al., 2007), sendo que ρ e ρ_0 (g cm^{-3}) são as densidades das nanofibras e do filme do polímero, respectivamente, determinadas em função de suas dimensões e massas.

$$\text{Porosidade(\%)} = \left(1 - \frac{\rho}{\rho_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

As amostras de filme foram obtidas pela técnica de *casting*, utilizando solução do polímero distribuída longitudinalmente em placas de petri, seguido por evaporação do solvente (SONG et al., 2015).

2.8 TRANSIÇÕES ENDOTÉRMICAS E EXOTÉRMICAS DAS NANOFIBRAS

Para determinação da temperatura de fusão das nanofibras, compostos fenólicos e os polímeros, foi utilizado calorímetro diferencial de varredura (DSC) (Shimadzu DSC-60, Japão). Cerca de 4 mg de amostra foram colocadas em cápsula de alumínio com tampa, sob atmosfera de nitrogênio e fluxo de 50 mL min^{-1} . As análises foram conduzidas em temperatura ambiente até alcançarem $400 \text{ }^\circ\text{C}$, com razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. A temperatura de fusão foi determinada a partir do pico máximo de fusão apresentado na curva de DSC de acordo com ASTM D7426-08, (2013) e o índice de cristalinidade (X_c) foi determinado de acordo com a Equação 2.

$$X_c(\%) = \left(\frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0}\right) \times 100 \quad (2)$$

Sendo que ΔH_m^0 representa o valor de entalpia de fusão para o PEO 100% cristalino (188 J g^{-1}) e ΔH_m indica a entalpia de fusão calculada em termogramas de DSC (MYA; PRAMODA; HE, 2006).

2.9 ESTABILIDADE TÉRMICA DAS NANOFIBRAS E CONTEÚDO DE SOLVENTE RESIDUAL

A medida da estabilidade térmica das nanofibras, dos compostos fenólicos, dos polímeros e o conteúdo de solvente residual em todas as amostras foram realizadas através de análise termogravimétrica (TGA) (Shimadzu DTG-60, Japão) de acordo com a metodologia ASTM D3850-12 (2013). As análises foram conduzidas a temperatura ambiente até alcançar $500 \text{ }^\circ\text{C}$, em atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo de 30 mL min^{-1} e taxa de aquecimento constante de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, utilizando 2 a 6 mg de amostra.

2.10 ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A FTIR foi realizada para verificar as mudanças na caracterização estrutural das amostras de nanofibras, dos compostos fenólicos e dos polímeros. O equipamento utilizado foi Thermo Scientific - Nicolet 6700 (Shimadzu, Japão), e os espectros das amostras foram analisados em números de onda do infravermelho de 0 a 4000 cm^{-1} .

2.11 ÂNGULO DE CONTATO

A análise do ângulo de contato foi realizada com as amostras de nanofibras com e sem os compostos fenólicos. Para isso, foi utilizado o microscópio digital Blue (x60) em que uma gota de água foi inserida sobre a superfície das nanofibras e, em seguida, a imagem foi obtida. A partir do software SurfTens 3.0, cinco medições de cada imagem foram realizadas utilizando cinco pontos de medição dispostos ao redor da gota. O desvio padrão máximo nas medições do ângulo de contato da água deve ser $\pm 3\%$ (FOMBUENA et al., 2013).

2.12 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A análise de difração de raios-X (DRX) foi realizada nas amostras de nanofibras com e sem os compostos fenólicos e dos polímeros, utilizando difratômetro de raios-X D8 Advance (Bruker, Estados Unidos), equipado com tubo de cobre. A radiação foi produzida

com comprimento de onda de 0,154 nm, a 40 kV e 40 mA. Os difratogramas foram obtidos à temperatura ambiente (25 °C) sob ângulo de 2θ variando entre 10° e 90° em passos de 0,05° s⁻¹. Os difratogramas foram analisados utilizando o software Origin Pro 8.0.

2.13 TESTE ANTIMICROBIANO

A determinação qualitativa da atividade antibacteriana das nanofibras com e sem os compostos fenólicos, dos polímeros em filme e dos compostos fenólicos em ácido acético 90%, foi realizada com o teste de disco difusão conforme norma M7 - A6 estabelecida por *National Committee for Clinical Laboratories Standards* frente aos micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (NCCLS, 2003). O inóculo bacteriano foi preparado em ágar Mueller Hinton para *Escherichia coli* ATCC 25972 e ágar padrão para contagem para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Deste inóculo, foi retirada uma colônia isolada e preparada a suspensão bacteriana em solução salina (0,85% m v⁻¹) de modo a obter turbidez óptica comparável à solução padrão McFarland de 0,5 medida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini 1240, Japão) em comprimento de onda de 600 nm (equivalente a $\lambda = 0,1$). Isso resultou em suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹ de bactérias.

A suspensão bacteriana foi inoculada em placas de petri contendo o ágar correspondente de cada micro-organismo. Nas placas foram adicionados discos produzidos com as nanofibras com e sem os compostos fenólicos, com filmes de 3% de quitosana, 2% PEO e 3% quitosana/2% PEO, além de discos de papel filtro contendo compostos fenólicos após a evaporação do ácido acético 90%, sendo que todos os testes foram realizados em triplicata. As amostras foram armazenadas durante 24 h em incubadora bacteriológica (AmericanLab 101/100, Brasil) a 35 ± 1 °C. Após este período, a análise foi interpretada através do diâmetro do halo de inibição das amostras.

2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando nível de confiança de 95 % para os dados relacionados ao diâmetro das nanofibras. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão avaliados por análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO PROCESSO E DA SOLUÇÃO POLIMÉRICA NA FORMAÇÃO DAS NANOFIBRAS

Estudos preliminares foram realizados com solução polimérica nas concentrações de quitosana de 4 e 5% (m v^{-1}) com todos os solventes e houve a formação de gotas em todos os parâmetros do *electrospinning*, as soluções 6 e 7% (m v^{-1}) com os solventes ácido acético P.A. e solução ácido acético de 3 e 4% ficaram muito viscosas impossibilitando a utilização no *electrospinning* e com as soluções 8, 9 e 10% (m v^{-1}) houve a insolubilidade do polímero com todos os solventes testados.

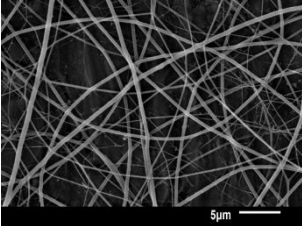
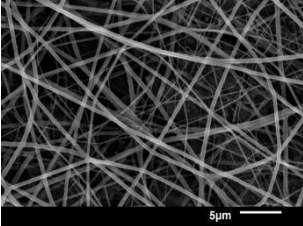
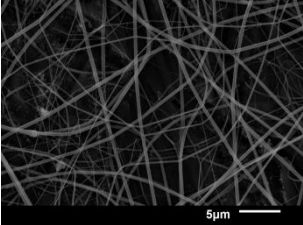
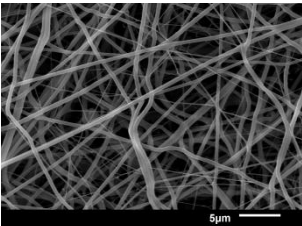
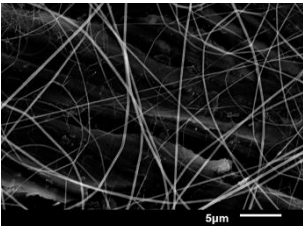
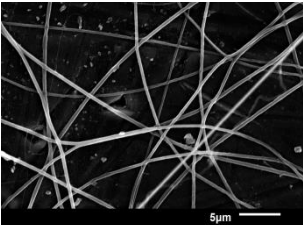
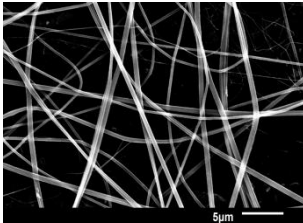
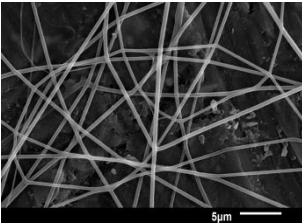
Geng, Kwon e Jang (2005) e Vrieze et al. (2007) relataram que a solução aquosa de ácido acético 90% para quitosana pura em concentrações de 1 a 5% (m v^{-1}), formaram nanofibras pelo processo de *electrospinning*. Dessa forma, foram realizados testes com solução polimérica de quitosana nas concentrações de 1 a 7% (m v^{-1}) em ácido acético 90% (v v^{-1}) e as condições do processo foram fixadas de acordo com Vrieze et al. (2007) como potencial elétrico de 20 kV, distância do capilar ao coletor de 100 mm e taxa de alimentação de $300 \mu\text{L h}^{-1}$.

No entanto, também não foi possível a produção de nanofibras, mas sim a formação de gotas com as soluções de 1 a 5% e entupimento do capilar com as soluções de 6 e 7%, devido a elevada viscosidade que estas soluções apresentaram. A formação de gotas pode estar relacionada com a utilização da quitosana pura no *electrospinning* que é considerado extremamente difícil devido a sua elevada massa molecular, à baixa estabilidade e solubilidade, propriedades mecânicas menores e alta viscosidade (SHALUMON et al., 2010). Além disso, a formação de ligações fortes de hidrogênio na rede tridimensional da quitosana impede o movimento de cadeias poliméricas expostas ao campo elétrico levando a quebra do jato durante o processo (GENG; KWON; JANG, 2005; NEAMNARK; RUJIRAVANITI; SUPAPHOL, 2006).

No entanto, uma alternativa para utilização da quitosana na produção das nanofibras foi a formação de blendas com polímeros sintéticos de elevada massa molecular como o poli (óxido de etileno) (PEO). A adição do PEO proporciona o desenvolvimento de diâmetros de nanofibras reduzidos, além de ser polímero biodegradável e biocompatível de baixo custo (MORAIS et al., 2010).

O estudo seguinte então, foi realizado com soluções de quitosana e PEO formando blendas sob condições fixas do processo em 20 kV de potencial elétrico, 300 $\mu\text{L h}^{-1}$ de taxa de alimentação e 100 mm de distância do capilar ao coletor. As concentrações dos polímeros e o diâmetro do capilar variaram de acordo com a Tabela 1, na qual observa-se que houve a formação de nanofibras sem gotas com diâmetros variados.

Tabela 1 - Resultados do diâmetro do capilar (D_c , mm); concentração de quitosana/PEO (% m v^{-1}); diâmetro médio (D_m , nm) e fotos das nanofibras obtidas.

Experimento	1	2	3
Dc	0,45	0,55	0,70
Concentração	2/2	2/2	2/2
Dm	393 ± 31^{abc}	430 ± 36^{bcd}	383 ± 30^{abc}
Nanofibras			
Experimento	4	5	6
Dc	0,80	0,45	0,55
Concentração	2/2	3/2	3/2
Dm	476 ± 45^d	262 ± 32^e	360 ± 57^a
Nanofibras			
Experimento	7	8	
Dc	0,70	0,80	
Concentração	3/2	3/2	
Dm	377 ± 112^{ab}	434 ± 71^{cd}	
Nanofibras			

Letras minúsculas iguais indicam que os resultados não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diâmetros médios.

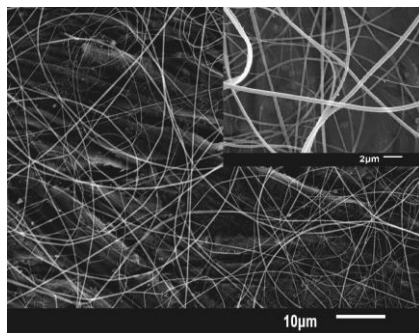
De acordo com os resultados dos diâmetros médios da nanofibras pode-se verificar que estatisticamente, o experimento 5 apresentou nanofibras com menor diâmetro médio (262 ± 32 nm) produzidas com blenda de 3% de quitosana e 2% de PEO e diâmetro do

capilar de 0,45 mm. Observa-se na Tabela 1 que a adição de maior quantidade de quitosana produziu nanofibras de menores diâmetros, sendo um resultado favorável ao presente estudo, pois favorece a propriedade antibacteriana deste polímero para aplicação em alimentos, além de nanofibras com maior área de contato.

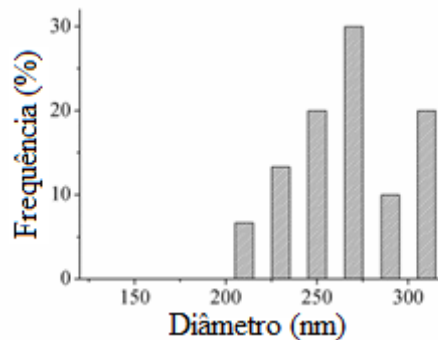
Após a determinação das melhores condições para formação das nanofibras com menores diâmetros, foi realizada a adição de 1% dos compostos fenólicos na solução polimérica de 3% quitosana/2% PEO (Figura 1) e observou-se que estatisticamente os mesmos influenciaram na redução do diâmetro médio das nanofibras.

Toskas et al. (2013) produziram nanofibras da blenda de quitosana/PEO/sílica, as quais apresentaram diâmetro médio de 239 ± 13 nm. Zhang et al. (2009) também estudaram nanofibras de quitosana/PEO e obtiveram diâmetro médio de 341,74 nm. Subramanian et al. (2005) determinaram diâmetro médio de 300 nm para nanofibras de quitosana/PEO.

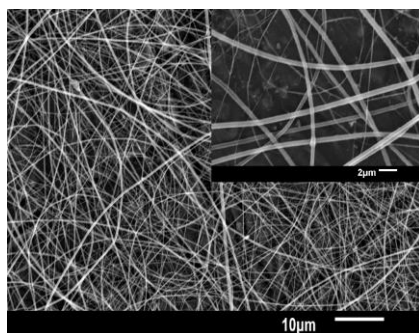
Figura 1 - Nanofibras desenvolvidas a partir de 3% quitosana/2 % PEO (a) e 3% quitosana/2% PEO e 1% compostos fenólicos (b)



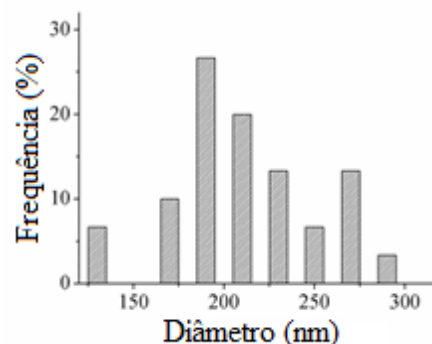
(a)



Diâmetro médio = 262 ± 32^a nm



(b)



Diâmetro médio = 214 ± 37^b nm

Letras minúsculas iguais indicam que os resultados não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diâmetros médios.

A viscosidade das soluções poliméricas é um fator importante para a formação das nanofibras e está relacionada, principalmente, com as propriedades físico-químicas dos polímeros, dos solventes e com as interações do tipo polímero-solvente (LI; WANG; XIA,

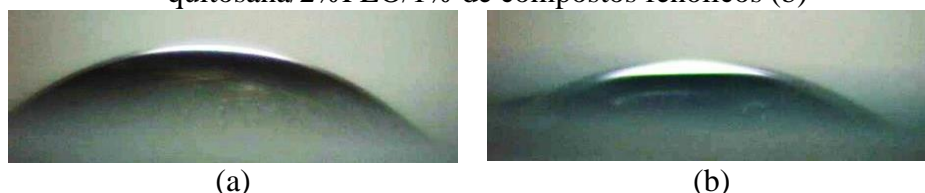
2004). A concentração e massa molecular do polímero influencia na viscosidade da solução, em que para se obter nanofibras uniformes e sem gotas é necessário que se tenha um grau de emaranhamento de cadeias na solução polimérica, a qual corresponde ao valor mínimo de concentração (WANG et al., 2009).

As soluções poliméricas de 2% quitosana/2% PEO, 3% quitosana/2% PEO e 3% quitosana/2% PEO/1% de compostos fenólicos exibiram viscosidade 1,7 Pa.s, 2,6 Pa.s e 3,4 Pa.s, respectivamente. O aumento da concentração do polímero quitosana nas soluções da blenda de quitosana e PEO levou o incremento da viscosidade, o que eleva ao emaranhamento das cadeias entre as estruturas poliméricas. Isto supera a tensão superficial na ponta do capilar e resultam em nanofibras uniformes e com menores diâmetros (HAIDER et al., 2013). Pakravan, Heuzey, Ajjji (2011) produziram nanofibras com blenda de quitosana/PEO resultando na concentração total de polímero de 4% em massa em ácido acético 50 %, essa solução exibiu viscosidade entre 2,5 e 3,0 Pa.s.

3.2 MOLHABILIDADE E POROSIDADE DAS NANOFIBRAS DE QUITOSANA/PEO

As nanofibras de 3% quitosana/2% PEO e 3% quitosana/2% PEO/1% de compostos fenólicos apresentam caráter hidrofílico por exibirem ângulos de contato inferiores a 90° , sendo $41,3 \pm 2,9^\circ$ e $26,9 \pm 3,1^\circ$, respectivamente (Figura 2). A hidrofiliçidade das nanofibras pode estar relacionada com o polímero PEO, uma vez que o mesmo é altamente solúvel em água a temperatura ambiente. Além disso, o decréscimo do ângulo de contato nas nanofibras de 3% quitosana/2% PEO em relação às nanofibras de 3% quitosana/2% PEO/1% de compostos fenólicos, pode ser devido a adição destes bioativos que também são solúveis em água.

Figura 2 – Molhabilidade das nanofibras de 3% quitosana/2% PEO (a) e 3% quitosana/2%PEO/1% de compostos fenólicos (b)



Dorraki et al. (2015) determinaram a capacidade de molhabilidade de nanofibras de quitosana/PEO medindo o ângulo de contato das gotas de água em diferentes tempos de exposição do tratamento com plasma. Com o aumento do tempo do tratamento (0 a 6 min) os

ângulos de contato diminuem aproximadamente de 69° para 28° . Os autores encontraram ângulos que caracterizam a amostra hidrofílica, assim como definido no presente estudo.

As nanofibras desenvolvidas no presente trabalho apresentam potencial na utilização em alimentos como a imobilização de enzimas, como descrito por Dorraki et al. (2015), necessitando de nanofibras hidrofílicas para que estas promovam a ligação com as enzimas e preservem a eficiência da função catalítica. Além disso, pode se realizar a imobilização dos compostos antimicrobianos com nanofibras hidrofílicas para que o mesmo não se degrade ou perca sua ação antecipadamente.

A análise de porosidade das nanofibras poliméricas resultou em valores de $97 \pm 1,8\%$ e $90 \pm 1\%$ para 3% quitosana/2% PEO e 3% quitosana/2% PEO/ 1% de compostos fenólicos, respectivamente. Através dessa análise, observa-se que as nanofibras apresentaram elevada permeabilidade, sugerindo sua aplicação em embalagens de alimentos para frutas e vegetais que são alimentos interessantes de serem colhidos ainda em processo de amadurecimento para não iniciarem a degradação durante o transporte (MANTILLA et al., 2010). Assim, as nanofibras permitiriam uma respiração, e conseqüentemente amadurecimento controlado. Além disso, a alta porosidade para as nanofibras indica que a difusão dos compostos antimicrobianos pode ser de forma gradual e equilibrada, garantindo a ação dos compostos continuamente.

3.3 PROPRIEDADES TÉRMICAS

O termograma da amostra de polímero quitosana apresentou deslocamento na curva de segunda ordem endotérmico a $84,8^\circ\text{C}$, correspondente ao processo de desidratação, e um pico exotérmico na curva em 306°C podendo estar relacionado com a cristalização do material (Tabela 2). Este pico é atribuído ao início de decomposição da quitosana, incluindo a desidratação dos anéis dos sacarídeos, a despolimerização e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero (KWEON; UM; PARK, 2001). Kriegel et al. (2009a) encontraram temperatura de fusão de $82,23 \pm 3,50^\circ\text{C}$ para a quitosana comercial.

O polímero PEO apresentou pico na curva em $72,3^\circ\text{C}$ de primeira ordem endotérmico indicando que houve a fusão, decomposição ou reações de redução nas amostras as quais ocorrem com absorção de calor. Zhang et al. (2009) verificaram temperatura de fusão entre 60 e 75°C para o polímero PEO. O termograma dos compostos fenólicos apresentou um pico na curva de primeira ordem endotérmico em $126,5^\circ\text{C}$ e outro pico de primeira ordem exotérmico em $321,0^\circ\text{C}$.

Os termogramas das amostras de nanofibras apresentaram dois deslocamentos de segunda ordem endotérmicos e exotérmicos. Estes deslocamentos geralmente indicam a temperatura de transição vítrea do material, no caso de materiais amorfos ou semicristalinos. Esta temperatura sugere que as macromoléculas adquirem maior grau de liberdade, passando do estado vítreo para o estado elastomérico com maior grau de mobilidade nas cadeias poliméricas, porém, sem mudanças estruturais. As curvas das nanofibras de 3% quitosana/2% PEO e 3% quitosana/2% PEO/ 1% CF exibiram a temperatura de fusão no primeiro pico de 62,3 e 60,2 °C, respectivamente, característico do polímero PEO e o segundo deslocamento em 314,3 e 296,4 °C, respectivamente, representando o polímero quitosana. Kriegel et al. (2009a) e (2009b) também observaram que a temperatura de fusão das nanofibras de quitosana/PEO diminuiu em relação aos polímeros, além disso, Kriegel et al. (2009b) obtiveram 60,65 °C para as nanofibras. Nista, Bettini e Mei (2015) verificaram deslocamento na curva de DSC em aproximadamente 290 °C para nanofibras de quitosana/PEO.

Tabela 2 - Resultados das propriedades térmicas das amostras poliméricas.

Amostras	T _f (°C)	H (J g ⁻¹)	X _c (%)	T _{id} (°C)	T _{fd} (°C)	T _{md} (°C)
Quitosana granular	84,8	- 136,4	-	284,9	320,4	301,0
PEO granular	72,3	- 111,0	59,0	371,8	406,9	384,8
CF	126,5	- 174,5	-	119,9	170,3	140,6
Nanofibras						
Quitosana/PEO	62,3	- 32,7	17,4	264,5	351,6	297,5
Quitosana/PEO/CF	60,2	- 43,6	23,2	310,4	370,4	323,0

CF: compostos fenólicos; T_f: temperatura de fusão; E: entalpia; X_c: cristalinidade; T_{id}: temperatura inicial de degradação; T_{fd}: temperatura final de degradação; T_m: temperatura de máxima degradação; -: amostras não analisadas.

O decréscimo da temperatura de fusão e entalpia nas nanofibras em relação aos polímeros e compostos fenólicos pode ser devido às interações das cadeias do PEO e quitosana. Além disso, segundo Peponi, García e Kenny (2015) e Aou e Hsu (2006) o processo de *electrospinning* ainda pode modificar as cadeias macromoleculares na direção longitudinal da nanofibra alterando as propriedades térmicas do material.

Assim como a temperatura de fusão e entalpia, a cristalinidade das nanofibras diminuiu em relação ao polímero PEO. Isto pode ser associado com a orientação eletricamente forçada das cadeias poliméricas durante o *electrospinning*. Transformando-as em estruturas emaranhadas orientadas, as quais estão também presentes nas nanofibras solidificadas (DEITZEL et al., 2001). A cristalinidade da quitosana em pó não foi calculada

porque este polímero é semicristalino e não foi encontrada entalpia de fusão referente à quitosana 100% cristalina.

A estabilidade térmica das nanofibras de 3% quitosana/2% PEO e 3% quitosana/2% PEO/1% CF, verificada pela análise de TGA exibiram valores de temperatura de máxima degradação que variaram de 297,5 °C a 323 °C, respectivamente, enquanto que a degradação da quitosana ocorreu em 301 °C e do PEO em 384,8 °C. Esta mudança de temperatura pode ser atribuída à maior área superficial específica das estruturas das nanofibras, o que levou ao aquecimento uniforme dentro destes materiais.

Pode-se afirmar que as nanofibras foram termicamente estáveis em torno de 300 °C, o que é favorável para aplicação em alimentos, uma vez que este material é destinado a ser utilizado a uma temperatura consideravelmente mais baixa como no processo de embalagem, armazenamento e transporte (ARRIETA et al., 2015). Além disso, as embalagens de alimentos compostas de polietileno de baixa densidade apresentam temperatura de degradação acima de 300 °C, sendo um valor próximo encontrado para as nanofibras poliméricas (COUTINHO; MELLO; MARIA, 2003).

Durante o fenômeno de degradação ocorreu a maior perda de massa de 65,4 e 55,1% para nanofibras de 3% quitosana/2% PEO e 3% quitosana/2% PEO/1% CF, respectivamente. Para os polímeros quitosana e PEO em pó e os compostos fenólicos a perda de massa correspondeu a 34,1, 89,9 e 34,0 %, respectivamente. A curva termogravimétrica gerada quando os compostos fenólicos foram integrados às nanofibras apresentaram comportamento de perda de massa praticamente idêntico à curva das nanofibras produzidas apenas com os polímeros, o que evidencia que a adição dos compostos não altera a estabilidade térmica das nanofibras.

A diferença das temperaturas iniciais, finais e de máxima degradação nas nanofibras, pode estar relacionada com a adição dos compostos fenólicos, o que confirma a incorporação dos mesmos nas nanofibras. Se os compostos estivessem livres nas amostras, causariam o surgimento de outras regiões de declínio na curva na faixa de aproximadamente 120 °C a 170 °C.

Através desta análise pode-se verificar que as nanofibras não apresentaram traços do solvente utilizado na solução polimérica, uma vez que, o ácido acético possui ponto de evaporação em torno de 118,1 °C. Assim, verificou-se em todas as curvas que não houve nenhuma alteração visível nesta faixa de temperatura. Em virtude destes resultados, pode-se concluir que houve a eliminação completa do solvente durante a formação das nanofibras no *electrospinning*.

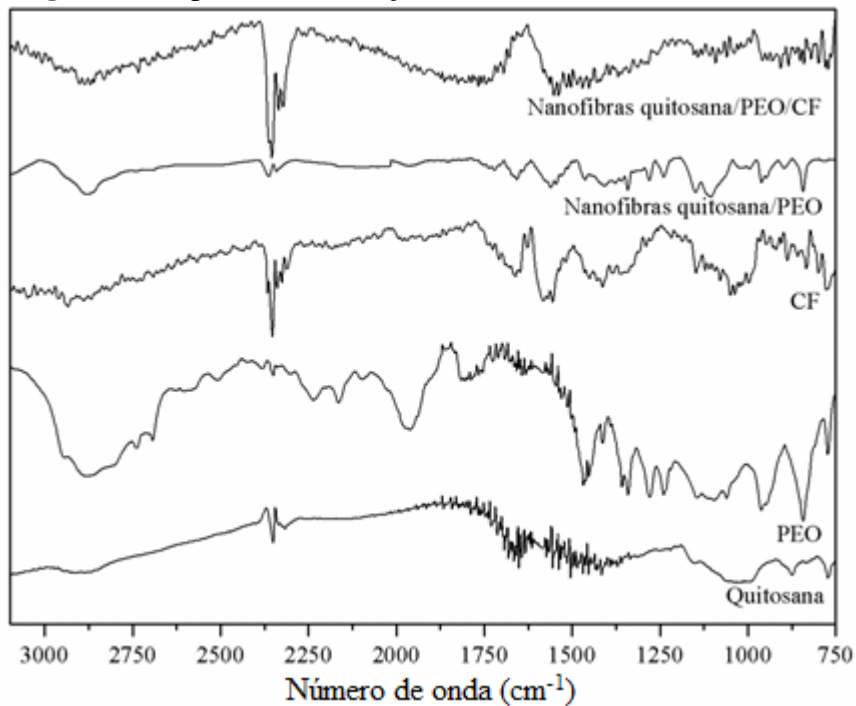
3.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURA DAS NANOFIBRAS

As interações das composições das espécies químicas das nanofibras e a confirmação da incorporação dos compostos fenólicos foram analisadas por espectros FTIR. Os espectros das nanofibras, polímeros e compostos fenólicos (CF) são mostrados na Figura 3 com deslocamento arbitrário para comparação. As faixas de absorção características para a quitosana foram observadas em 1100 cm^{-1} mostrando o alongamento antissimétrico da ponte C-O-C e nas bandas de 1060 e 1029 cm^{-1} sendo as vibrações envolvendo alongamento C-O. Estes picos são característicos para a estrutura de polissacarídeos de quitosanas (VASCONCELOS et al., 2006; WAN et al., 2006). As bandas de amida I e II de quitosana em 1650 e 1565 cm^{-1} , respectivamente, estão presentes na amostra, porém muito fracas.

As bandas de absorção típicas para PEO foram detectadas a 2885 cm^{-1} e atribuídas ao alongamento de CH_2 (DUAN et al., 2004; ZIVANOVIC et al., 2007). Outras bandas características foram observadas em 1148 , 1101 , 1062 e 958 cm^{-1} e são atribuídas a vibração de estiramento C-O-C (DUAN et al., 2004). A banda de 1467 cm^{-1} é atribuída a flexão C-H e as faixas de 1358 e 1340 cm^{-1} são atribuídas a deformação CH do grupo metil. As bandas de absorção OH podem ser negligenciadas, pois o PEO utilizado na configuração experimental tem massa molecular relativamente elevada (900 kDa) (SAWATARI; KONDO, 1999). As nanofibras de quitosana/PEO apresentam pico de baixa intensidade no espectro 2885 cm^{-1} referente ao componente CH_2 do polímero PEO.

O pico detectado próximo de 2350 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H dos compostos fenólicos e também a deformação simétrica da ligação O-C-O (oxigênio-carbono). Observa-se que este pico tem maior intensidade no espectro CF e nas nanofibras de 3% quitosana/2% PEO/1% CF, o que confirma a incorporação dos compostos fenólicos nas nanofibras, intensidade intermediária no espectro quitosana e baixa intensidade no espectro nanofibras 3% quitosana/2% PEO.

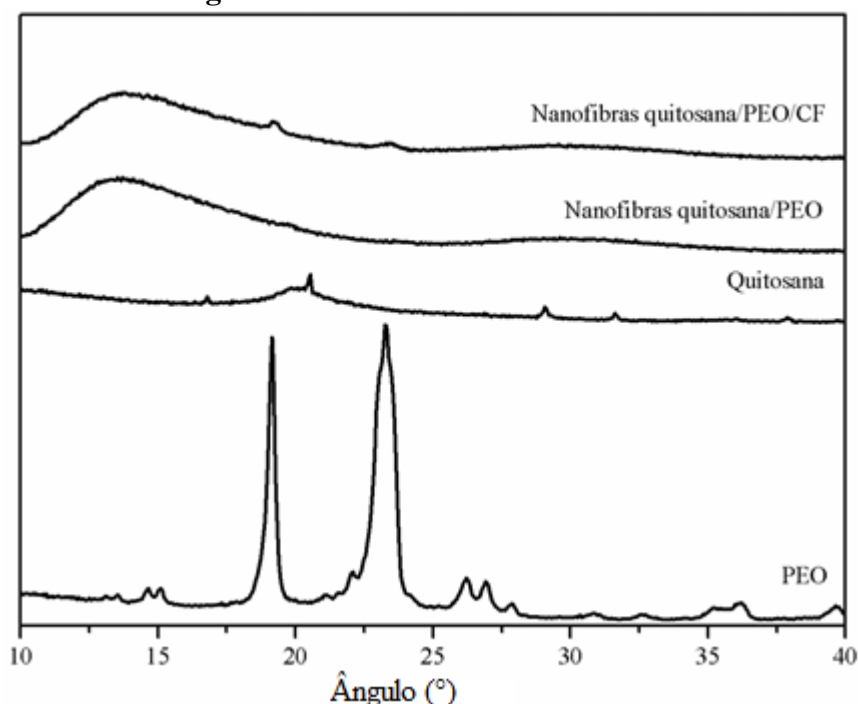
A análise dos espectros infravermelhos das nanofibras de 3% quitosana/2% PEO indicou que estas consistem dos componentes químicos presentes nos polímeros quitosana e PEO em pó, porém com menor intensidade. Isso pode estar relacionado com o processo *electrospinning*, o qual pode ter alterado a estrutura das moléculas dos polímeros para a formação das nanofibras. Contudo, a adição dos compostos fenólicos à solução de 3% quitosana/2% PEO conduziu a redução da intensidade das bandas dos polímeros, enquanto que as bandas características dos compostos fenólicos aumentaram a sua intensidade.

Figura 3 - Espectro de absorção do infravermelho das amostras

A análise de difração de raios-X foi utilizada para estudar a mudança da estrutura cristalina nas nanofibras como consequência do processo de *electrospinning* e adição dos compostos fenólicos (Figura 4). Não foi possível obter curva dos compostos fenólicos, devido o estado físico do material, uma vez que o equipamento exige material sólido e os compostos estavam na forma líquida.

A partir do difratograma pode-se observar que o polímero PEO em pó apresenta estrutura cristalina representada nos picos de forte reflexão em $23,20^\circ$ e em $19,03^\circ$, no entanto a quitosana não apresentou picos na faixa de ângulo analisada. Os picos do PEO também foram analisados por Zhang et al. (2009). Após a mistura com a quitosana, a reflexão de ambos os picos do PEO diminuiu apresentando padrão plano. O difratograma das amostras de nanofibras exibiram halos amorfos de baixa intensidade.

Os resultados encontrados pelo DRX podem estar relacionados com o processo de *electrospinning*, uma vez que os cristais de PEO foram orientados através da aplicação da tensão durante a técnica para formar as nanofibras (KAKADE et al., 2007). Além disso, os halos amorfos detectados nas nanofibras podem ser devido a presença da quitosana que possui estrutura semicristalina. Os resultados da cristalinidade calculados através da entalpia (Tabela 2) também confirmaram que as nanofibras possuem menor cristalinidade em relação ao polímero PEO em pó.

Figura 4 - Resultado DRX das amostras

3.5 PROPRIEDADE ANTIBACTERIANA DAS NANOFIBRAS

As nanofibras de 3% quitosana/2% PEO e 3% quitosana/2% PEO/1% CF apresentaram inibição no crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Apêndice 3) formando halos de $6,0 \pm 0,7$ e $6,4 \pm 1,1$ mm (Tabela 3), respectivamente, sendo que a adição dos compostos fenólicos às nanofibras intensificou a inibição de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A bactéria *Escherichia coli* ATCC 25972 mostrou resistência as nanofibras de 3% quitosana/2% PEO e sensibilidade as nanofibras contendo os compostos fenólicos apresentando halo de $5,5 \pm 0,4$ mm. Isto pode ter ocorrido devido à composição diferenciada da membrana das bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*) em relação a gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). A parede celular de gram-negativas possui um componente adicional, a membrana externa, que corresponde a segunda bicamada lipídica, que adere firmemente à camada de peptidoglicano, conferindo maior rigidez. A face externa da membrana é composta de lipopolissacarídeos, o que a torna mais lipofílica em relação a substâncias exógenas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011). Liu et al. (2015) também observaram halo de inibição de 7 mm das nanofibras de quitosana/poli(vinil álcool) frente ao micro-organismo *S. aureus*, além disso, as nanofibras contendo nanopartículas de prata exibiram inibição de 7,7 mm para *E. coli*.

Dessa forma, o presente estudo confirma que a quitosana apresenta atividade antibacteriana frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na forma de nanofibras. Da mesma maneira, verificou-se que os compostos fenólicos foram incorporados nas nanofibras e não perderam sua atividade após o processo de *electrospinning*, uma vez que, o crescimento da *Escherichia coli* ATCC 25972 foi inibido somente com as nanofibras que continham os compostos fenólicos.

Tabela 3 – Resultados dos halos de inibição (mm) das amostras.

Amostras	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	ATCC 25972	ATCC 25923
CF em ácido acético 90%	7,3 ± 1,2	10,3 ± 0,5
Filmes		
Quitosana	10,6 ± 3,2	12,5 ± 3,5
PEO	-	-
Quitosana/PEO	-	8,1 ± 1,1
Nanofibras		
Quitosana/PEO	-	6,0 ± 0,7
Quitosana/PEO/CF	5,5 ± 0,4	6,4 ± 1,1

CF: compostos fenólicos;
-: amostras não apresentaram halo de inibição

Os alimentos produzidos sob boas práticas de fabricação apresentam baixo crescimento bacteriano, assim, a inibição observada das nanofibras neste estudo pode ser adequada (HOANG et al., 2010; GIALAMAS et al., 2010). Entretanto, se a concentração dos compostos fenólicos que é 1% nas nanofibras for incrementada, estas podem ser aplicadas em alimentos mesmo bem manipulados para preservar e aumentar a vida útil dos produtos. Além disso, é importante a utilização das nanofibras com o antibacteriano como revestimentos ou embalagens de alimentos, pois quando os compostos fenólicos entram em contato direto com as superfícies dos produtos pode ocorrer perda de sua atividade.

Os compostos fenólicos ressuspensos em ácido acético apresentaram halos de inibição de 7,3 ± 1,2 e 10,3 ± 0,5 mm para *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC (Apêndice 4), respectivamente. O polímero quitosana apresentou halos de 10,6 ± 3,2 mm e 12,5 ± 3,5 mm para *Escherichia coli* ATCC 25972 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, respectivamente. O filme de quitosana e PEO inibiu o crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 formando halo de 8,1 ± 1,1 mm, entretanto

não inibiu a *Escherichia coli* ATCC 25972. As bactérias também apresentaram resistência em relação ao polímero PEO.

Dessa forma, estes resultados estão de acordo com os encontrados para as nanofibras, ressaltando que a quitosana apresenta atividade frente a *Escherichia coli* ATCC 25972 e ao *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Além disso, o solvente ácido acético não interferiu na atividade dos compostos fenólicos em relação as duas bactérias, apenas sua atividade foi reduzida quando incorporados às nanofibras. Isso está relacionado com as diferentes quantidades de extrato fenólico adicionadas nos discos e nas nanofibras, uma vez que não foi possível identificar exatamente a concentração dos compostos fenólicos presentes na amostra de nanofibras utilizada para os testes.

4 CONCLUSÃO

A utilização de substâncias naturais como os compostos fenólicos microalgais e a quitosana são alternativa aos agentes antimicrobianos sintéticos para o controle microbiológico de produtos industrializados. Através da MEV foi possível verificar diâmetro médio de 214 ± 37 nm das nanofibras de 3% quitosana/2% PEO/1% de compostos fenólicos. As propriedades térmicas possibilitaram a aplicação das nanofibras como embalagens de alimentos, apresentando temperatura máxima de degradação de 323 °C, para as nanofibras de 3% quitosana/2% PEO/1% de compostos fenólicos. O espectro FTIR confirmou a incorporação dos compostos fenólicos nas nanofibras e a análise da atividade biológica determinou que as nanofibras de 3% quitosana/2% PEO/1% de compostos fenólicos apresentaram halos de inibição de $6,4 \pm 1,1$ e $5,5 \pm 0,4$ mm, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25972, respectivamente. As nanofibras de quitosana e PEO adicionadas de compostos fenólicos apresentam vantagem adicional, uma vez que pode permitir combinar a atividade antibacteriana com funções protetoras de embalagens, contribuindo para preservar a qualidade e estender a vida útil dos produtos, utilizando substâncias de origem natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOU, K.; HSU, S. L. Trichroic vibrational analysis on the α -form of poly(lactic acid) crystals using highly oriented fibers and spherulites. **Macromolecules**, v. 39, n. 9, p. 3337-3344, 2006.

ARRIETA, M. P.; LÓPEZ, J.; LÓPEZ, D.; KENNY, J. M.; PEPONI, L. Development of flexible materials based on plasticized electrospun PLA-PHB blends: structural, thermal,

mechanical and disintegration properties. **European Polymer Journal**, v. 73, p. 433–446, 2015.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Standard practice for scanning electron microscope beam size characterization**. ASTM E986 – 04, West Conshohocken, PA, USA, 2010.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Standard test method for assignment of the DSC procedure for determining Tg of a polymer or an elastomeric compound**. ASTM D7426 – 08, West Conshohocken, 2013.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Standard test method for rapid thermal degradation of solid electrical insulating materials by thermogravimetric method (TGA)**. ASTM D3850 – 12, West Conshohocken, 2013.

BAUZA, S. C. B.; LÓPEZ, E. M.; PALOU, E.; MALO, A. L. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control**, v. 62, p. 44–51, 2016.

BEACHLEY, V.; WEN, X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 3, 2009.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; MARIA, L. C. S. Polietileno: Principais Tipos, Propriedades e Aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.

DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; TAN, N. C. B. Controlled deposition of electrospun poly (ethylene oxide) fibers. **Polymer**, v. 42, n. 1, p. 261–272, 2001.

DORRAKI, N.; SAFA, N. N.; JAHANFAR, M.; GHOMI, H.; SIADAT, S. O. R. Surface modification of chitosan/PEO nanofibers by air dielectric barrier discharge plasma for acetylcholinesterase immobilization. **Applied Surface Science**, v. 349, p. 940-947, 2015.

DUAN, B.; DONG, C. H.; YUAN, X. Y.; YAO, K. D. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). **Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition**, v. 15, n. 6, p. 797–811, 2004.

FOMBUENA, V.; BALART, J.; BORONAT, T.; NÁCHER, L. S.; SANOGUERA, D. G. Improving mechanical performance of thermoplastic adhesion joints by atmospheric plasma. **Materials and Design**, v. 47, p. 49–56, 2013.

GENG, X.; KWON, O. H.; JANG, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5427-5432, 2005.

GIALAMAS, H.; ZINOVIADOU, K. G.; BILIADERIS, C. G.; KOUTSOUMANIS, K. P. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-casein ate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Research International**, v. 43, n. 10, p. 2402–2408, 2010.

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

- HOANG, L. C.; GRÉGOIRE, L.; CHAINE, A.; WACHÉ, Y. Importance and efficiency of in depth antimicrobial activity for the control of listeria development with nisin incorporated sodium casein ate films. **Food Control**, v. 21, p. 1227–1233, 2010.
- HUDSON, S. M.; JENKINS, D. W. **Chitin and Chitosan**. Encyclopedia of Polymer Science and Technology, 3rd ed., Herman F. Mark. Hoboken, Eds, New Jersey: Wiley Interscience, 2001.
- KAKADE, M. V.; GIVENS, S.; GARDNER, K.; LEE, K. H.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Electric field induced orientation of polymer chains in macroscopically aligned electrospun polymer nanofibers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 2777–2782, 2007.
- KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and musclebased products: a review. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 113–130, 2006.
- KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339-2349, 2003.
- KRIEGEL, C.; KIT, K. M.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Electrospinning of chitosan–poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. **Polymer**, v. 50, n. 1, p. 189–200, 2009a.
- KRIEGEL, C.; KIT, K. M.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Influence of surfactant type and concentration on electrospinning of chitosan–poly(ethylene oxide) blend nanofibers. **Food Biophysics**, v. 4, n. 3, p. 213–228, 2009b.
- KWEON, H. Y.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Structural and thermal characteristics of *Antheraea pernyi* silk fibroin-chitosan blend film. **Polymer**, v. 42, n. 15, p. 6651, 2001.
- LI, D.; WANG, Y.; XIA, Y. Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films. **Advanced Materials**, v. 16, n. 4, p. 361-366, 2004.
- LI, Q.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A.; DUNN, E. T. Applications and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, n. 4, p. 370-397, 1992.
- LIU, Y.; LIU, Y.; LIAO, N.; CUI, F.; PARK, M.; KIM, H. Y. Fabrication and durable antibacterial properties of electrospunchitosan nanofibers with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 638–643, 2015.
- MANTILLA, S. P. S.; MANO, S. B.; VITAL, H. C.; FRANCO, R. M. Modified atmosphere in food preservation. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 437-448, 2010.
- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60-64, 2009.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2872–2876, 2010.

MYA, K.Y.; PRAMODA, K. P.; HE, C. B. Crystallization behavior of star-shaped Poly(ethylene oxide) with cubic silsesquioxane (CSSQ) core. **Polymer**, v 47, n. 14, p. 5035-5043, 2006.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEAMNARK, A.; RUJIRAVANITI, R.; SUPAPHOL, P. Electrospinning of hexanoyl chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 3, p. 298–305, 2006.

NIKOLOVA, A.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I. Rheological Characterization of Aqueous Solutions of Mixtures of Chitosan and Polyoxyethylene. **Polymer Bulletin**, v. 41, p. 115-121, 1998.

NISTA, S.V. G.; BETTINI, J.; MEI, L. H. I. Coaxial Nanofibers of Chitosan-Alginate-PEO polycomplex obtained by electrospinning. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 222-228, 2015.

PAKRAVAN, M.; HEUZEY, M. C.; AJJI, A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. **Polymer**, v. 52, n. 21, p. 4813–4824, 2011.

PEPONI, L.; GARCÍA, A. M.; KENNY, J. M. Electrospinning of PLA. In: **Poly (lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties, Additives and Applications**. Londres: The Royal Society of Chemistry, 2015. Cap. 6.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

SAWATARI, C.; KONDO, T. Interchain hydrogen bonds in blend films of poly(vinyl alcohol) and its derivatives with poly (ethylene oxide). **Macromolecules**, v. 32, n. 6, p. 1949–1955, 1999.

SHALUMON, K. T.; ANULEKHA, K. H.; GIRISH, C. M.; PRASANTH, S. V.; NAIR, R. J. Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 413–419, 2010.

- SONG, K.; WU, Q.; ZHANG, Z.; REN, S.; LEI, DOOLEY, T. K. M.; LIU, D.; JANES, M. E. Fabricating electrospun nanofibers with antimicrobial capability: A facile route to recycle biomass tar. **Fuel**, v. 150, p. 123–130, 2015.
- SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; FURLONG, E. B. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, 2011.
- SUBRAMANIAN, A.; VU, D.; LARSEN, G. F.; LIN, H. Y. Preparation and evaluation of the electrospun chitosan/PEO fibers for potential applications in cartilage tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 16, n. 7, p. 861-873, 2005.
- TOSKAS, G.; CHERIF, C.; HUND, R. D.; LAOURINE, E.; MAHLTIG, B.; FAHMI, A.; HEINEMANN, C.; HANKE T. Chitosan(PEO)/silica hybrid nanofibers as a potential biomaterial for bone regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 2, p. 713– 722, 2013.
- VASCONCELOS, C. L.; BEZERRIL, P. M.; SANTOS, D. E. S.; DANTAS, T. N. C.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. C. Effect of molecular weight and ionic strength on the formation of polyelectrolyte complexes based on poly(methacrylic acid) and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1245–1252, 2006.
- VELDE, K. V.; KIEKENS, P. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutrylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 4, p. 409-416, 2004.
- VRIEZE, S.; WESTBROEK, P.; CAMP, T. V.; LANGENHOVE, L. V. Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: feasibility study. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 19, p. 8029-8034, 2007.
- WAN, Y.; WU, H.; YU, A. X.; WEN, D. J. Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1362–1372, 2006.
- WANG, C.; CHIEN, H. S.; YAN, K. W.; HUNG, C. L.; HUNG, K. L.; TSAI, S. J.; JHANG, H. J. Correlation between processing parameters and microstructure of electrospun poly(D,L-lactic acid) nanofibers. **Polymer**, v. 50, n. 25, p. 6100-6110, 2009.
- XU, X.; CHEN, X.; LIU, A.; HONG, Z.; JING, X. Electrospun poly(l-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(l-lactide) nanocomposite fibers. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3187–3196, 2007.
- ZHANG, J. F.; YANG, D. Z.; XU, F.; ZHANG, Z. P.; YIN, R. X.; NIE, J. Electrospun core-shell structure nanofibers from homogeneous solution of poly(ethylene oxide)/chitosan. **Macromolecules**, v. 42, n. 14, p. 5278–5284, 2009.
- ZIVANOVIC, S.; LI, J. J.; DAVIDSON, P. M.; KIT, K. Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1505–1510, 2007.

CAPÍTULO VI

6 CONCLUSÃO GERAL

Os compostos fenólicos presentes na microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e identificados por cromatografia foram os ácidos gálico e cafeico capazes de formar halos de inibição de $11,0 \pm \leq 0,1$ e $15,7 \pm 0,6$ mm com a concentração mínima inibitória de 200 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25972, respectivamente. As nanofibras poliméricas contendo os compostos fenólicos apresentaram diâmetro médio de 810 ± 85 e 214 ± 37 nm para PHB e blenda de quitosana/PEO, respectivamente. As propriedades térmicas e espectro infravermelho confirmaram a incorporação dos compostos fenólicos e possibilitaram a aplicação das nanofibras como embalagens de alimentos por apresentarem temperatura de máxima degradação de $287,0$ °C e 323 °C, para nanofibras de PHB e blenda de quitosana/PEO contendo o extrato fenólico, respectivamente. As nanofibras de PHB e blenda de quitosana/PEO contendo os compostos fenólicos apresentaram halos de inibição de $7,5 \pm 0,4$ e $6,4 \pm 1,1$ mm para o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os resultados obtidos reforçam a ideia de aplicação dos compostos fenólicos microalgais como substâncias para controle microbiológico em alimentos. Portanto, foi possível desenvolver nanofibras com o biopolímero microalgal e os polímeros quitosana e PEO, além disso, a incorporação dos compostos fenólicos extraídos da microalga conferiram ao material a propriedade antibacteriana. Sendo assim, a potencialidade dos compostos fenólicos microalgais aliada a capacidade de produzir nanofibras poliméricas com biopolímeros e polímero natural e biodegradável, contribuem para preservar a qualidade e estender a vida útil dos produtos, além de não prejudicar o meio ambiente por serem reintegradas na natureza e concluir o ciclo do carbono.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o efeito biológico dos compostos fenólicos em outras bactérias, bolores e leveduras;
- Estudar a liofilização dos compostos fenólicos e assim variar a concentração dos mesmos nas nanofibras poliméricas;
- Padronizar metodologias de quantificação dos compostos fenólicos nas nanofibras e concentração mínima inibitória para as nanofibras poliméricas;
- Estudar a cinética de liberação dos compostos fenólicos;
- Realizar ensaio de citotoxicidade e biodegradabilidade nas nanofibras;
- Realizar a capacidade antioxidante das nanofibras com os compostos fenólicos;
- Aplicar as nanofibras produzidas como embalagem em diferentes alimentos como carnes, frutas e legumes.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHAB, M. A.; FLYNN, A.; CHIOU, B. S.; IMAM, S.; ORTS, W.; CHIELLINI, E. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA–PHB blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 9, p. 1822–1828, 2012.
- ABEDIN, R.M.A.; TAHA, H.M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae, evaluation of medium components by Plackett-Burmann Design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008.
- AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODERRESI, M.; ABIRI, R.; MIKAELI, A. Chemical composition, in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* of Iran. **Food and Chemistry and Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1137-1144, 2010.
- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. In: **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, 3. ed. Badajoz: Formatex Research Center, 2011.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 109-117, 2008.
- ANDRADY, A. L. **Science and technology of polymer nanofibers**. New Jersey: Jonh Wiley and Sons, 2008.
- ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 1, p. 43-47, 2008.
- AOU, K.; HSU, S. L. Trichroic vibrational analysis on the α -form of poly(lactic acid) crystals using highly oriented fibers and spherulites. **Macromolecules**, v. 39, n. 9, p. 3337-3344, 2006.
- ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, v. 60, n.2, p. 161-165, 2013.
- ARRIETA, M. P.; FORTUNATI, E.; DOMINICI, F.; LÓPEZ, J.; KENNY, J. M.; Bionanocomposite films based on plasticized PLA–PHB/cellulose nanocrystal blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 265–275, 2015a.
- 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.
- ARRIETA, M. P.; LÓPEZ, J.; LÓPEZ, D.; KENNY, J. M.; PEPONI, L. Development of flexible materials based on plasticized electrospun PLA-PHB blends: structural, thermal, mechanical and disintegration properties. **European Polymer Journal**, v. 73, p. 433–446, 2015b.

ARRIETA, M. P.; LÓPEZ, J.; LÓPEZ, D.; KENNY, J. N.; PEPONI, L. Biodegradable electrospun bionanocomposite fibers based on plasticized PLA–PHB blends reinforced with cellulose nanocrystals. **Industrial Crops and Products**, 2015c.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Standard practice for scanning electron microscope beam size characterization**. ASTM E986 – 04, West Conshohocken, PA, USA, 2010.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Standard test method for assignment of the DSC procedure for determining Tg of a polymer or an elastomeric compound**. ASTM D7426 – 08, West Conshohocken, 2013.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Standard test method for rapid thermal degradation of solid electrical insulating materials by thermogravimetric method (TGA)**. ASTM D3850 – 12, West Conshohocken, 2013.

AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 9, p. 835–864, 2004.

BAILEY, F. E. KOLESKE, J. V. **Poly (Ehtylene Oxide)**. New York: Academic Press, 1976.

BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly- β -hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, n. 3, 2013.

BASTARRACHEA, L.; DHAWAN, S.; SABLANI, S. S. Engineering properties of polymeric-based antimicrobial films for food packaging. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, 2011.

BAUZA, S. C. B.; LOPEZ, E. M.; PALOU, E.; MALO, A. L. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control**, v. 62, 2016.

BAYAR, S.; SEVERCAN, F. FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). **Journal of Molecular Structure**, v. 744–747, p. 529–534, 2005.

BEACHLEY, V.; WEN, X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 3, 2009.

BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27-48, 2002.

BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; BELL, I. J. S. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. S1–S7, 2011.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, 2010.

BHATTACHARJEE, A.; KUMAR, K.; ARORA, A.; KATTI, D. S. Fabrication and characterization of pluronic modified poly(hydroxybutyrate) fibers for potential wound dressing applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 63, p. 266–273, 2016.

BIERHALS, V. S.; MACHADO, V. G.; ECHEVENGU, W. O.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 42-48, 2009.

BORGES, J. A.; ROSA, G. M.; MEZA, L. H. R.; HENRARD, A. A.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, 2013.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) from potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–82, 1988.

BRIDLE, H. Nanotechnology for detection of waterborn pathogens. In: **Waterborne Pathogens Detection Methods and Applications**. Massachusetts: Academic Press, 2014. cap. 9.

BRODY, A. L.; BUGUSU, B.; HAN, J. H.; SAND, C. K.; MCHUGH, T. H. Innovative food packaging solutions. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 8, p. 107–116, 2008.

BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LAZZERI, A.; ALVAREZ, V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. **Polymer Letters**, v. 8, n. 11, p. 791–808, 2014.

BUKZEN, A. L. **Influência dos parâmetros reacionais na síntese de carboximetilquitosana e estudo cinético e termodinâmico de sua interação com íons de cobre (II) em soluções aquosas**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2013.

BUSHAN, B. **Springer Handbook of Nanotechnology**. 1. ed. New York: Springer Verlag, 2004.

CARDOSO, M. J. B.; BARBOSA, R. C.; RIES, A.; FIDELIS, T.; FOOK, M. V. L. Ensaios físico-químicos e mecânicos de membranas de quitosana com cobre, zinco e magnésio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2012.

CASPER, C. L.; STEPHENS, J. S.; TASSI, N. G.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. **Macromolecules**, v. 37, n. 2, 2004.

CHAUDHRY, Q.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A.; CASTLE, L.; AITKEN, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives and Contaminants, Part A**, v. 25, n. 3, p. 573–578, 2008.

CHEN, G.; LIU, H. Electrospun cellulose nanofiber reinforced soybean protein isolate composite film. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, p. 641–646, 2008.

CHEN, H. M.; YU, D.G. An elevated temperature electrospinning process for preparing acyclovir-loaded PAN ultrafine fibers. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 210, n. 12, p. 1551-1555, 2010.

CHOWDHURY, M.; STYLIOS, G. Effect of experimental parameters on the morphology of electrospun Nylon 6 fibres. **International Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 6, 2010.

COELHO, V. C. **Síntese de biopolímeros pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em diferentes concentrações de nutrientes**. 46f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

COLLA, L. M.; FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) platensis cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n.1, 2007.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1489–1493, 2007.

CORRÊA, M. C. S.; REZENDE, M. L.; ROSA, D. S.; AGNELLI, J. A. M.; NASCENTE, P. A. P. Surface composition and morphology of poly(3-hydroxybutyrate) exposed to biodegradation. **Polymer Testing**, v. 27, n. 4, p. 447-452, 2008.

COSTA, J. A. C.; MORAIS, M. G. Microalgae for food production. In: **Fermentation Processes Engineering in the Food Industry**. Florida: CRC Press Taylor and Francis, 2013.

COUTINHO, F.M. B.; MELLO, I. L.; MARIA, L. C. S. Polietileno: Principais Tipos, Propriedades e Aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.

CUNHA, A. M. M. V. **Desenvolvimento de filmes de quitosana com atividade antioxidante**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade de Aveiro, Portugal, 2011.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.

DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 3, p. 255–264, 2008.

DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; TAN, N. C. B. Controlled deposition of electrospun poly (ethylene oxide) fibers. **Polymer**, v. 42, n. 1, p. 261–272, 2001.

DEMIR, M. M.; YILGOR, I.; YILGOR, E.; ERMAN, B. Electrospinning of polyurethane fibers. **Polymer**, v. 43, n. 11, p. 3303-3309, 2002.

DORRAKI, N.; SAFA, N. N.; JAHANFAR, M.; GHOMI, H.; SIADAT, S. O. R. Surface modification of chitosan/PEO nanofibers by air dielectric barrier discharge plasma for acetylcholinesterase immobilization. **Applied Surface Science**, v. 349, p. 940-947, 2015.

DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Journal of Electrostatics**, v. 35, n. 2 e 3, 1995.

DUAN, B.; DONG, C. H.; YUAN, X. Y.; YAO, K. D. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). **Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition**, v. 15, n. 6, p. 797–811, 2004.

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

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RIBANI, M. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Química Nova**, v.33, p.119-123, 2010.

DUTTA, P, K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, 2009.

ELDEEN, I. M. S.; SEOW, E. M.; ABDULLAH, R.; SULAIMAN, S. F. *In vitro* antibacterial, antioxidant, total phenolic contents and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of extracts of seven *Phyllanthus* sp. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 1, p. 75–79, 2011.

ESTRADA, J. E.; BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 497-500, 2001.

FERNANDES, J.G.; CORREIA, D.M.; BOTELHO, G.; PADRÃO, J.; DOURADO, F.; RIBEIRO, C.; MÉNDEZ, S. L.; SENCADAS, V. PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. **Polymer Testing**, v. 34, p. 64–71, 2014.

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

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, 1927.

FOMBUENA, V.; BALART, J.; BORONAT, T.; NÁCHER, L. S.; SANOGUERA, D. G. Improving mechanical performance of thermoplastic adhesion joints by atmospheric plasma. **Materials and Design**, v. 47, p. 49–56, 2013.

FORMHALS, A. **Process and apparatus for preparing artificial threads**. US 1975504 A, 5 dez. 1930, 2 out. 1934.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRENOT, A.; CHRONAKIS, I. S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, n. 1, p. 64-75, 2003.

FURUKAWA, T.; SATO, H.; MURAKAMI, R.; ZHANG, J.; DUAN, Y. X.; NODA, I.; OCHIAI, S.; OZAKI, Y. Structure, dispersibility, and crystallinity of

poly(hydroxybutyrate)/poly(l-lactic acid) blends studied by FTIR microspectroscopy and differential scanning calorimetry. **Macromolecules**, v. 38, n. 15, p. 6445-6454, 2005.

GARCÍA, A.; SEGURA, D.; ESPÍN G.; GALINDO, E.; CASTILLO, T.; PENA, C. High production of poly-hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 117-123, 2014.

GENG, X.; KWON, O. H.; JANG, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5427-5432, 2005.

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.

GIALAMAS, H.; ZINOVIADOU, K. G.; BILIADERIS, C. G.; KOUTSOUMANIS, K. P. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-casein ate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Research International**, v. 43, n. 10, p. 2402–2408, 2010.

GONÇALVES, C. F. **Extração de biopeptídeos de origem microalgal e aplicação no desenvolvimento de nanofibras bioativas**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

GURNANI, N.; GUPTA, M.; MEHTA, D.; MEHTA, B. K. Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 4, p. 462–470, 2016.

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

HAJIMAHMOODI, M., FARAMARZI, M. A., MOHAMMADI, N., SOLTANI, N., OVEISI, M. R., NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p.43–50, 2010.

HAMMOUDA, B.; HO, D. L.; KLINE, S. Insight into clustering in poly (ethylene oxide) solutions. **Macromoleculares**, v. 37, n. 18, p. 6932-6937, 2004.

HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, C.P. A Kunits trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 3, p. 347-359, 2001.

HERRERO, M.; PUYANA, M. C.; MENDIOLA, J. A.; IBAÑEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, 2013.

HOANG, L. C.; GRÉGOIRE, L.; CHAINE, A.; WACHÉ, Y. Importance and efficiency of in depth antimicrobial activity for the control of listeria development with nisin incorporated sodium casein ate films. **Food Control**, v. 21, p. 1227–1233, 2010.

- HOLMES, R.A.; BOSTON, R.S.; PAYNE, G.A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 4, p. 559–572, 2008.
- HOSSEINI, S.; AZARI, P.; FARAHMAND, E.; GAN, S. N.; ROTHAN, H. A.; YUSOF, R.; KOOLE, L. H.; DJORDJEVIC, I.; IBRAHIM F. Polymethacrylate coated electrospun PHB fibers: An exquisite outlook for fabrication of paper-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 69, p. 257–264, 2015.
- HUANG, L.; MCMILLAN, R. A.; APKARIAN, R. P.; POURDEYHIMI, B.; CONTICELLO, V. P.; CHAIKOF, E. L. Generation of synthetic elastin-mimetic small diameter fibers and fiber networks. **Macromolecules**, v. 33, n. 8, 2000.
- HUDSON, S.M.; JENKINS, D. W. **Chitin and Chitosan**. Encyclopedia of Polymer Science and Technology, 3rd Ed., Herman F. Mark. Hoboken, Eds, New Jersey: Wiley Interscience, 2001.
- JAYAKUMAR, R.; RAMACHANDRAN, R.; KUMAR, P. T. S.; DIVYARANI, V. V.; SRINIVASAN, S.; CHENNAZHI, K. P.; TAMURA, H.; NAIR, S. V. Fabrication of chitin-chitosan/nano ZrO₂ composite scaffolds for tissue engineering applications. **International Journal Biological Macromoleculares**, v. 49, n. 3, 2011.
- KAKADE, M. V.; GIVENS, S.; GARDNER, K.; LEE, K. H.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Electric field induced orientation of polymer chains in macroscopically aligned electrospun polymer nanofibers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 2777–2782, 2007.
- KAUSHIK, P.; CHAUHAN, A. In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 348-52, 2008.
- KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and musclebased products: a review. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 113–130, 2006.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607-619, 2005.
- KHATEEB, W.; HUSSEIN, E.; QOUTA, L.; ALU'DATT, M.; AL-SHARA, B.; ABU-ZAITON, A. *In vitro* propagation and characterization of phenolic content along with antioxidant and antimicrobial activities of *Cichorium pumilum* Jacq. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 103–110, 2012.
- KHOR, E.; L. Y. LIM. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339-2349, 2003.
- KLEJDUS, B.; KOPECKY, J.; BENESOVA, L.; VACEKA, J. Solid-phase/supercritical fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 5, p. 763–771, 2009.
- KOSKI, A.; YIM, K.; SHIVKUMAR, S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. **Materials Letters**, v. 58, n. 3-4, p. 493-497, 2004.

KRIEGEL, C.; ARRECHI, A.; KIT, K.; McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Fabrication, functionalization and application of electrospun biopolymer nanofibers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 8, p. 775-797, 2008.

KRIEGEL, C.; KIT, K. M.; MCCLEMENTS D. J.; WEISS J. Electrospinning of chitosan–poly (ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. **Polymer**, v. 50, n. 1, p. 189–200, 2009a.

KRIEGEL, C.; KIT, K. M.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Influence of surfactant type and concentration on electrospinning of chitosan–poly (ethylene oxide) blend nanofibers. **Food Biophysics**, v. 4, n. 3, p. 213–228, 2009b.

KULSHRESHTHA, A.; ZACHARIA, A. J.; JAROULIYA, U.; BHADAURIYA, P.; PRASAD, G. B.; BISEN, P. S. Spirulina in health care management. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, 2008.

KUMAR, P. R.; KHAN, N.; VIVEKANANDHAN, S.; SATYANARAYANA, N.; MOHANTY, A.; MISRA, M. Nanofibers: effective generation by electrospinning and their applications. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 1, 2012.

KWEON, H. Y.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Structural and thermal characteristics of *Antheraea pernyi* silk fibroin-chitosan blend film. **Polymer**, v. 42, n. 15, p. 6651, 2001.

LECLERCQ, S.; HARLANDER, K. R.; REINECCIUS, G. A. Formation and characterization of microcapsules by complex coacervation with liquid or solid aroma cores. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, n. 1, p. 17-24, 2009.

LI, D.; WANG, Y.; XIA, Y. Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films. **Advanced Materials**, v. 16, n. 4, p. 361-366, 2004.

LI, Q.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A.; DUNN, E. T. Applications and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, n. 4, p. 370-397, 1992.

LI, X. T.; ZHANG, Y.; CHEN, G. Q. Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials. **Biomaterials**, v. 29, n. 27, p. 3720–3728, 2008.

LIN, Y.; YAO, Y.; YANG, X.; WEI, N.; LI, X.; GONG, P.; LI, R.; WU, D. Preparation of poly(ether sulfone) nanofibers by gas-jet/electrospinning. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, n. 2, p. 909-917, 2008.

LIU, Y.; LIU, Y.; LIAO, N.; CUI, F.; PARK, M.; KIM, H. Y. Fabrication and durable antibacterial properties of electrospun chitosan nanofibers with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 638-643, 2015.

LUGO, A. C. V.; 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.

MA, P.; XU, P.; CHEN, M.; DONG, W.; CAI, X.; SCHMIT, P.; SPOELSTRA, A. B.; LEMSTRA, P. J. Structure property relationships of reactively compatibilized PHB/EVA/starch blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 299-306, 2014.

- MA, Z.; KOTAKI, M.; INAI, R.; RAMAKRISHNA, S. Potential of nanofiber matrix as tissue engineering scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 1-2, p. 101–109, 2005.
- MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, 2007.
- MANTILLA, S. P. S.; MANO, S. B.; VITAL, H. C.; FRANCO R. M. Modified atmosphere in food preservation. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 437-448, 2010.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 67, n. 3, p. 187-195, 2001.
- MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532-1542, 2013.
- MARTINS, L.; CARDOSO, D. Production of ethylene glycols and derivatives by catalytic reactions of ethylene oxide. **Química Nova**, v. 28, n.2, 2005.
- MARTINS, R. G. **Síntese, extração e caracterização de biopolímeros de origem microalgal para desenvolvimento de nanofibras**. 148f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.
- MAZOOCHI, T.; JABBARI, V. Chitosan nanofibrous scaffold fabricated via electrospinning: the effect of processing parameters on the nanofiber morphology. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 16, n. 5, p. 277-289, 2011.
- MO, X. M.; XU, C. Y.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1883-1890, 2004.
- MORAIS, M. G. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.
- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60-64, 2009.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 144-150, 2008.
- MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2872–2876, 2010.
- MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Spirulina* LEB 18 for developing nanofibers. **Polímeros**, v. 25, n. 2, 2015.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Biofunctionalized nanofibers using *Arthrospira (Spirulina)* biomass and biopolymer. **BioMed Research International**, v. 15, 2015.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, 2014a.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biological Effects of *Spirulina (Arthrospira)* Biopolymers and Biomass in the Development of Nanostructured Scaffolds. **BioMed Research International**, 2014b.

MOREIRA, J. B. **Engenharia de microalgas para concepção de uma biorrefinaria utilizando CO₂ como fonte de carbono**. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MOTHANA, R. A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 1, p. 177-181, 2005.

MOUBAYED, N. M. S.; HOURI, H. J.; KHULAIFI, M. M.; FARRAJ, D. A. Antimicrobial, antioxidant properties and chemical composition of seaweeds collected from Saudi Arabia (Red Sea and Arabian Gulf). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 162–169, 2016.

MOUSAVI, S. R.; REZAEI, M. Nanotechnology in agriculture and food production. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, v. 7, n. 10, p. 31-53, 2011.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C.; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, 2008.

MUTHULAKSHMI, M.; SARANYA, A.; SUDHA, M.; SELVAKUMAR, G. Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from *Spirulina* isolated from fresh water body against various human pathogens. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 3, p. 7-11, 2012.

MYA, K.Y.; PRAMODA, K. P.; HE, C. B. Crystallization behavior of star-shaped poly (ethylene oxide) with cubic silsesquioxane (CSSQ) core. **Polymer**, v 47, n. 14, p. 5035-5043, 2006.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEAMNARK, A.; RUJIRAVANITI, R.; SUPAPHOL, P. Electrospinning of hexanoyl chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 3, p. 298–305, 2006.

NGAH, W. S. W.; TEONG, L. C.; HANAFIAH, M. A. K. M. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1446-1456, 2011.

- NICOSIA, A.; GIEPARDA, W.; FLACZYK, J. F.; WALENTOWSKA, J.; WESOŁEK, D.; VAZQUEZ, B.; PRODI, F.; BELOSI, F. Air filtration and antimicrobial capabilities of electrospun PLA/PHB containing ionic liquid. **Separation and Purification Technology**, v. 154, p. 154-160, 2015.
- NIKOLOVA, A.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I. Rheological Characterization of Aqueous Solutions of Mixtures of Chitosan and Polyoxyethylene. **Polymer Bulletin**, v. 41, p. 115-121, 1998.
- NISTA, S.V. G.; BETTINI, J.; MEI, L. H. I. Coaxial Nanofibers of Chitosan-Alginate-PEO polycomplex obtained by electrospinning. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 222-228, 2015.
- OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; FERREIRA, C. F. R.; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2326-2331, 2008.
- OUERGHEMMI, I.; REBEY, I. B.; RAHALI, F. Z.; BOURGOU, S.; PISTELLI, L.; KSOURI, R.; MARZOUK, B.; TOUNSI, M. S. Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. **Journal of Food and Drug Analysis**, p. 1-10, 2016.
- PAKRAVAN, M.; HEUZEY, M. C.; AJJI, A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. **Polymer**, v. 52, n. 21, p. 4813-4824, 2011.
- PALAVRA, A. M. F.; COELHO, J. P.; BARROSO, J. G.; RAUTER, A. P.; FARELEIRA, J. M. N. A.; MAINAR, A.; URIETA, J. S.; NOBRE, B. P.; GOUVEIA, L.; MENDES, R. L.; CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from microalgae and volatile oils from aromatic plants. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 60, p. 21-27, 2011.
- PARISI, A.S.; YOUNES, S.; REINEHR, C.O.; COLLA, L.M. Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 297-301, 2010.
- PARK, J. A.; KIM, S. B. Preparation and characterization of antimicrobial electrospun poly (vinylalcohol) nanofibers containing benzyl triethylammonium chloride. **Reactive and Functional Polymers**, v. 93, 2015.
- PEPONI, L.; BIAGIOTTI, J.; KENNY, J. M.; MONDRAGÓN, I. Statistical analysis of the mechanical properties of natural fibers and their composite materials. **Polymer Composite**, v. 29, n. 3, p. 321-325, 2008.
- PEPONI, L.; GARCÍA, A. M.; KENNY, J. M. Electrospinning of PLA. In: **Poly (lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties, Additives and Applications**. Londres: The Royal Society of Chemistry, 2015. Cap. 6.
- PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; FERREIRA, I. C. F. R.; FERRERES, F.; BENTO, A.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant

potential of different cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2287–2295, 2007.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.

PLACKETT, D.; SIRÓ, I. **Polyhydroxyalkanoates (PHAs) for food packaging**. Woodhead Publishing Limited, 2011.

PLAZA, M.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A. A.; IBÁÑEZ, E. Innovative natural functional ingredients from microalgae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7159-7170, 2009.

PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; REINA, G. G. B; HERRERO, M.; SEÑORÁNS, F. J.; IBÁÑEZ, E. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 450-455, 2010.

PRAKASH, J.W.; JOHNSON, M.; JEEVA, S. Antimicrobial activity of certain fresh water microalgae from Thamirabarani River, Tamil Nadu, South India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. S170-S173, 2011.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of microalgae: a review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

PUGLIA, D.; FORTUNATI, E.; D'AMICO, D. A.; MANFREDI, L. B.; CYRAS, V. P.; KENNY, J. M. Influence of organically modified clays on the properties and disintegrability in compost of solution cast poly(3-hydroxybutyrate) films. **Polymer Degradation and Stability**, v. 99, p. 127-135, 2014.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 6, n. 3, p. 373-380, 2002.

RAMAKRISHNA, S.; FUJUHARA, K.; TEO, W. E.; LIM, T. C.; MA, Z. **An introduction to electrospinning and nanofibers**. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2005.

RAMAKRISHNA, S.; JOSE, R.; ARCHANA, P. S.; NAIR, A. S.; BALAMURUGAN, R.; VENUGOPAL, J.; TEO, W. E. Science and engineering of electrospun nanofibers for advances in clean energy, water filtration, and regenerative medicine. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 23, p. 6283-6312, 2010.

RAMIER, J.; BOUDERLIQUE, T.; STOILOVA, O.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I.; LANGLOIS, V.; RENARD, E.; ALBANESE, P.; GRANDE, D. Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 38, p. 161–169, 2014.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 326-334, 2012.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 521-39, 2009.

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

RENJU, G. L.; KURUP, G. M.; SARITHA, K. C. H. Effect of lycopene from *Chlorella marina* on high cholesterol-induced oxidative damage and inflammation in rats. **Inflammopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 45–54, 2014.

RIBEIRO, C. A.; BRETANHA, C. C.; GIACOBBO, G.; SOUZA, M. M.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos extraídos de fontes naturais aplicados como conservadores em massas de pizza. **Revista de Ciência e Inovação IF Farroupilha**, v. 1, n. 1, p. 129-138, 2016.

RIEGER, K. A.; SCHIFFMAN, J. D. Electrospinning an essential oil: cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 561-568, 2014.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

ROCHA, S. B. **Nanofibras de isolado proteico de bijupirá (*Rachycentron canadum*): desenvolvimento, caracterização e avaliação toxicológica**. 86 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

RYAN, B. J.; PODUSKA, K. M. Roughness effects on contact angle measurements. **American Journal of Physics**, v. 76, n. 11, p. 1074-1077, 2008.

SANTOS, A. O.; FREIRE, J. A. S.; CARVALHO, T. D.; BARBOSA, T. C.; PRATES, R. P.; SILVA, J. C. R. L.; FARIAS, P. K. S. Atividade antibacteriana e antioxidante de óleos essenciais cítricos com potencialidade para inclusão como aditivos em alimentos. **Caderno Ciências Agrárias**, v. 8, n. 3, p. 15-21, 2016.

SAWATARI, C.; KONDO, T. Interchain hydrogen bonds in blend films of poly(vinyl alcohol) and its derivatives with poly (ethylene oxide). **Macromolecules**, v. 32, n. 6, p. 1949–1955, 1999.

SCHARFF, R. L. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 1, p. 123-131, 2012.

SCHMATZ, D. A.; UEBEL, L. S.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Scaffolds containing *Spirulina* sp. LEB 18 biomass: Development, characterization and evaluation of *in vitro* biodegradation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1050-1059, 2016.

SEMARY, N. A. E. The characterisation of bioactive compounds from an Egyptian *Leptolyngbya* sp. strain. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 55-59, 2012.

SHALUMON, K. T.; ANULEKHA, K. H.; GIRISH, C. M.; PRASANTH, S. V.; NAIR, R. J. Single step electrospinning of chitosan/poly (caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 413–419, 2010.

SHARMA, L.; SINGH, A. K.; PANDA, B.; MALLICK, N. Process optimization for poly- β -hydroxybutyrate production in a nitrogen fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 5, p. 987-993, 2007.

SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. A. **Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications**. London: RSC Publishing, 2011.

SHENOY, S. L.; BATES, W. D.; FRISCH, H. L.; WNEK, G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit. **Polymer**, v. 46, n. 10, p. 3372-3384, 2005.

SILVA, C. K. **Produção biotecnológica de biopolímeros aplicando processo cíclico de reutilização de resíduo da extração de poli-hidroxibutirato (PHB)**. 2016. 71f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

SILVA, G. A.; CZEISLER, C.; NIECE, K. L.; BENIASH, E.; HARRINGTON, D. A.; KESSLER, J. A.; STUPP, S.I. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. **Science**, v. 303, n. 5662, p. 1352–1355, 2004.

SILVA, M. J. D.; ENDO, L. H.; DIAS, A. L. T.; SILVA, G. A.; SANTOS, M. H.; SILVA, M. A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 267-274, 2012.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629-1634, 2007.

SINDHU, R.; AMMU, B.; BINOD, P.; DEEPTHI, S. K.; RAMACHANDRAN, K. B.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 783-794, 2011.

SINGH, L.; WAHID, Z. Review Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 968-982, 2014.

SMITH, V. J.; DESBOIS, A. P.; DYRYNDA, E. A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and microalgae. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1213-1262, 2010.

SONG, K.; WU, Q.; ZHANG, Z.; REN, S.; LEI, DOOLEY, T. K. M.; LIU, D.; JANES, M. E. Fabricating electrospun nanofibers with antimicrobial capability: A facile route to recycle biomass tar. **Fuel**, v. 150, p. 123–130, 2015.

SONSECA, A.; PEPONI, L.; SAHUQUILLO, O.; KENNY, J. M.; GIMÉNEZ, E. Electrospinning of biodegradable polylactide/hydroxyapatite nanofibers: study on the morphology, crystallinity structure and thermal stability. **Polymer Degradation Stability**, v. 97, n. 10, p. 2052-2059, 2012.

- SOUZA, M. M. **Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da produção de aflatoxina por extratos fenólicos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis***. 176 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.
- SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella phyrenoidosa*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 680-685, 2010.
- SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; FURLONG, E. B. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, 2011.
- SPASOVA, M.; MINCHEVA, R.; PANEVA, D.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I. Perspectives on: criteria for complex evaluation of the morphology and alignment of electrospun polymer nanofibers. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 21, n. 5, 2006.
- STEFFENS, C. A. **Respiração e permeabilidade de filmes poliméricos**. 88f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- STEFFENS, D.; LERSCH, M.; ROSA, A.; SCHER, C.; CRESTANI, T.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; PRANKE, P. A new biomaterial of nanofibers with the microalga spirulina as scaffolds to cultivate with stem cells for use in tissue engineering. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 4, p. 710-718, 2013.
- SUBRAMANIAN, A.; VU, D.; LARSEN, G. F.; LIN, H. Y. Preparation and evaluation of the electrospun chitosan/PEO fibers for potential applications in cartilage tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 16, n. 7, p. 861-873, 2005.
- SUNG, S. Y.; SIN, L. T.; TEE, T. T.; BEE, S. T.; RAHMAT, A. R.; RAHMAN, W. A. W. A.; TAN, A. C.; VIKHRAMAN, M. Antimicrobial agentes for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 110-123, 2013.
- TANTAWY, S. T.A. Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 9, n. 1, p. 663- 666, 2011.
- TAVARES, T. M.; SERAFINI, A. B. Carnes de hambúrgueres prontas para consumo: aspectos legais e riscos bacterianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 1, p. 1-21, 2006.
- TAYLOR, G. I. Disintegration of water drops in an electric field. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 291, n. 1382, 1964.
- TEO, W. E.; RAMAKRISHNA, S. A. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. **Nanotechnology**, v. 17, n. 14, p. R89-R106, 2006.
- TONCHEVA, A.; SPASOVA, M.; PANEVA, D.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I. Polylactide (PLA) based electrospun fibrous materials containing ionic drugs as wounddressing materials: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 63, n. 13, p. 657-671, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

TOSKAS, G.; CHERIF, C.; HUND, R. D.; LAOURINE, E.; MAHLTIG, B.; FAHMI, A.; HEINEMANN, C.; HANKE, T. Chitosan (PEO)/silica hybrid nanofibers as a potential biomaterial for bone regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 2, p. 713–722, 2013.

TRIPATANASUWAN, S.; ZHONG, Z.; RENEKER, D. Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly (ethylene oxide) aqueous solution. **Polymer**, v. 48, n. 19, p. 5742-5746, 2007.

UEBEL, L. S.; SCHMATZ, D. A.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.; MUCILLO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Quercetin and curcumin in nanofibers of polycaprolactone and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): assessment of *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 30, p. 7586-7592, 2016.

UNNITHAN, A. R.; BARAKAT, N. A. M.; NIRMALA, R.; AL-DEYAB, S. S.; KIM, H. Y. Novel electrospun nanofiber mats as effective catalysts for water photosplitting. **Ceramics International**, v. 38, n. 6, p. 5175-5180, 2012.

VASCONCELOS, C. L.; BEZERRIL, P. M.; SANTOS, D. E. S.; DANTAS, T. N. C.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. C. Effect of molecular weight and ionic strength on the formation of polyelectrolyte complexes based on poly (methacrylic acid) and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1245–1252, 2006.

VASITA, R.; KATTI, D. S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. **Journal of International of Nanomedicine**, v. 1, n. 1, p. 15–30, 2006.

VELDE, K. V.; KIEKENS, P. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 4, p. 409-416, 2004.

VENUGOPAL, J.; LOW, S.; CHOON, A. T.; RAMAKRISHNA, S. Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 84, n. 1, p. 34–48, 2008.

VRIEZE, S.; WESTBROEK, P.; CAMP, T. V.; LANGENHOVE, L. V. Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: feasibility study. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 19, p. 8029-8034, 2007.

VRIEZE, S.; CAMP, T. V.; NELVIG, A.; HAGSTRÖM, B.; WESTBROEK, P.; CLERCK, K. The effect of temperature and humidity on electrospinning. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 5, 2009.

WAN, Y.; WU, H.; YU, A. X.; WEN, D. J. Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1362–1372, 2006.

WANG, C.; CHIEN, H. S.; YAN, K. W.; HUNG, C. L.; HUNG, K. L.; TSAI, S. J.; JHANG, H. J. Correlation between processing parameters and microstructure of electrospun poly(D,L-lactic acid) nanofibers. **Polymer**, v. 50, n. 25, p. 6100-6110, 2009.

WANG, X.; YUE, T.; LEE, T. C. Development of Pleurocidin-poly (vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application. **Food Control**, v. 54, p. 150-157, 2015.

WANG, X.; UM, I. C.; FANG, D.; OKAMOTO, A.; HSIAO, B. S.; CHU, B. Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electrospinning and non-toxic post treatments. **Polymer**, v. 46, n. 13, p. 4853-4867, 2005.

WANG, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, C.; LI, P. Characterization and cooperative antimicrobial properties of chitosan/nano-ZnO composite nanofibrous membranes. **Food Chemistry**, v. 132, p. 419-427, 2012.

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

WONG, S. C.; BAJI, A.; LENG, S. Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly (ϵ -caprolactone). **Polymer**, v. 49, n. 21, p. 4713-4722, 2008.

XIU, Y.; ZHU, L.; HESS, D. W.; WONG C. P. Relationship between work of adhesion and contact angle hysteresis on superhydrophobic surfaces. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 30, p. 11403-11407, 2008.

XU, G.; YE, X.; LIU, D.; MA, Y.; CHEN, J. Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuyou) during maturity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 5, p. 382– 389, 2008.

XU, X.; CHEN, X.; LIU, A.; HONG, Z.; JING, X. Electrospun poly(l-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(l-lactide) nanocomposite fibers. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3187–3196, 2007.

YANG, Q. B.; LI, D. M.; HONG, Y. L.; LI, Z. Y.; WANG, C.; QIU, S. L.; WEI, Y. Preparation and characterization of a PAN nanofibre containing Ag nanoparticles via electrospinning. **Synthetic Metals**, v. 137, n. 3, 2010.

YAO, S.; WANG, X.; LIU, X.; WANG, R.; DENG, C.; CUIL, F. Effects of ambient relative humidity and solvent properties on the electrospinning of pure hyaluronic acid nanofibers. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, n.7, p. 4752-4758, 2013.

YARIN, A.; KOOMBHONGSE, S.; RENEKER, D. Bending instability in electrospinning of nanofibers. **Journal Applied Physics**, v. 89, n. 5, 2001.

YING, Y.; ZHIDONG, J.; QIANG, L.; ZHICHENG, G. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polyethylene oxide solution. **Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 13, n. 3, p. 580-585, 2006.

ZHANG, C. X.; YUAN, X. Y.; WU, L. L.; HAN, Y.; SHENG, J. Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 3, p. 423-432, 2005.

ZHANG, J. F.; YANG, D. Z.; XU, F.; ZHANG, Z. P.; YIN, R. X.; NIE, J. Electrospun core-shell structure nanofibers from homogeneous solution of poly(ethylene oxide)/chitosan. **Macromolecules**, v. 42, n. 14, p. 5278–5284, 2009.

ZHANG, M.; THOMAS, N. L. Blending polylactic acid with polyhydroxybutyrate: The effect on thermal, mechanical, and biodegradation properties. **Advances in Polymer Technology**, v. 30, n. 2, p. 67-79, 2011.

ZHANG, Y. Z.; LIU, G. M.; WENG, W. Q.; DING, J. Y.; LIU, S. J. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82–8, 2015.

ZHAO, S.; WU, X.; WANG, L.; HUANG, Y. Electrospinning of ethylecyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, n. 1, 2004.

ZHIJIANG, C.; YI, X.; HAIZHENG, Y.; JIA, J.; LIU, Y. Poly(hydroxybutyrate)/cellulose acetate blend nanofiber scaffolds: Preparation, characterization and cytocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 757–767, 2016.

ZHOU, C.; WANG, Q.; WU, Q. UV-initiated crosslinking of electrospun poly (ethylene oxide) nanofibers with penta erythritol triacylate: effect of irradiation time and incorporated cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1779-1786, 2012.

ZIVANOVIC, S.; LI, J. J.; DAVIDSON, P. M.; KIT, K. Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1505–1510, 2007.

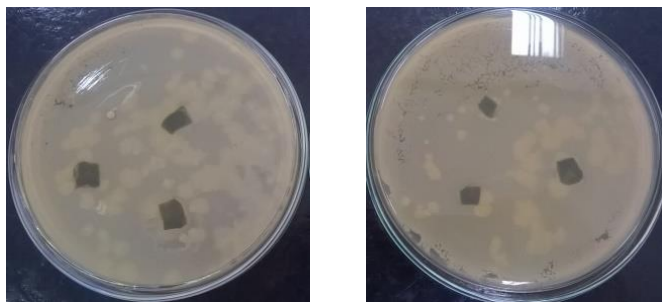
ZONG, X.; KIM, K.; FANG, D.; RAN, S.; HSIAO, B. S.; CHU, B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. **Polymer**, v. 43, n. 16, p. 4403-4412, 2002.

ZUSSMAN, E.; YARIN, A. L.; WEIHS, D. A micro-aerodynamic decelerator based on permeable surfaces of nanofiber mats. **Experiments in Fluids**, v. 33, n. 2, p. 315-320, 2002.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Atividade antibacteriana das nanofibras de 35% PHB (a, c) e 35% PHB contendo 1% de compostos fenólicos (b, d)

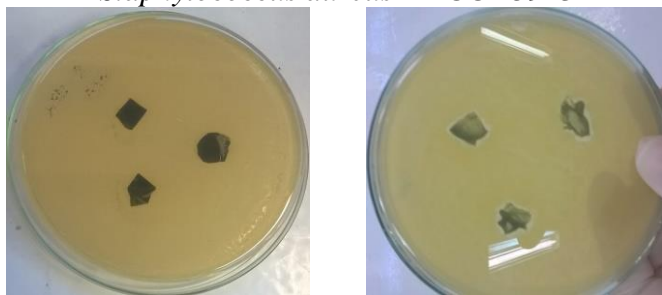
Escherichia coli ATCC 25972



(a)

(b)

Staphylococcus aureus ATCC 25923

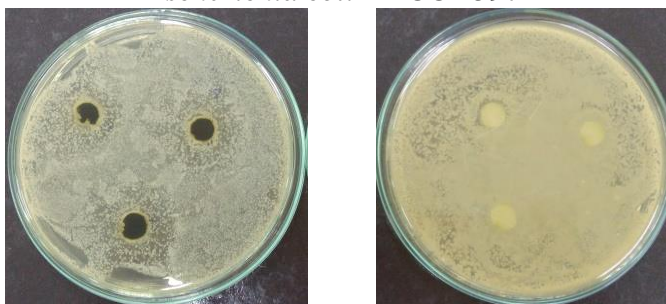


(c)

(d)

Apêndice 2 - Atividade antibacteriana do filme de PHB microalgal (a, c) e dos compostos fenólicos em clorofórmio (b, d)

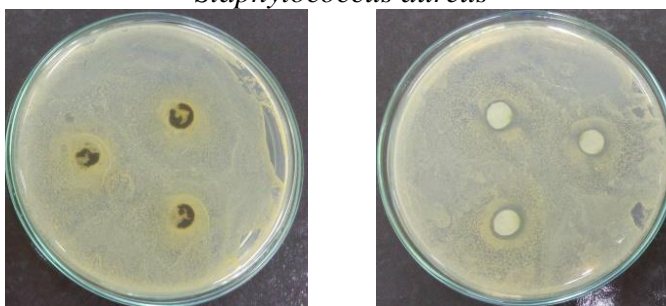
Escherichia coli ATCC 25972



(a)

(b)

Staphylococcus aureus

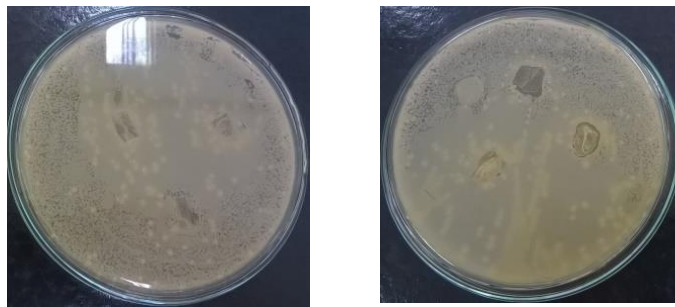


(c)

(d)

Apêndice 3 - Atividade antibacteriana das nanofibras de 3% quitosana/2% PEO (a, c) e 3% quitosana/2% PEO/1% CF (b, d)

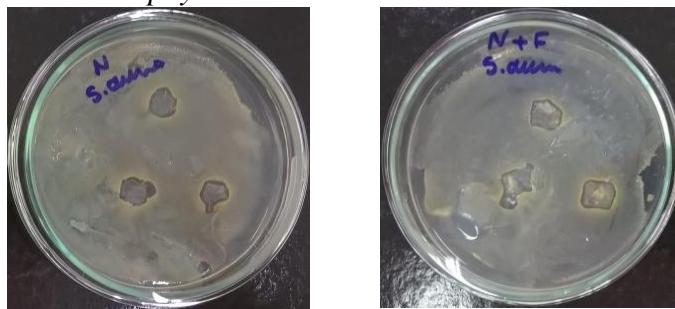
Escherichia coli ATCC 25972



(a)

(b)

Staphylococcus aureus ATCC 25923

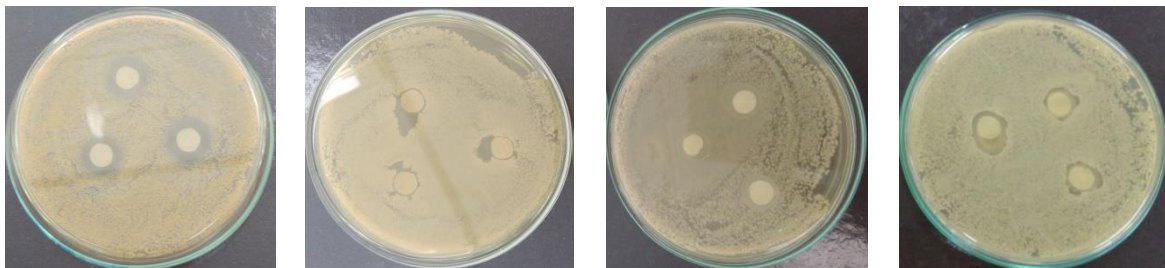


(c)

(d)

Apêndice 4 - Atividade antibacteriana dos compostos fenólicos em ácido acético 90% (a, e), dos polímeros quitosana (b, f) e PEO (c, g) e do filme de 3% quitosana/2% PEO (d, h)

Escherichia coli ATCC 25972



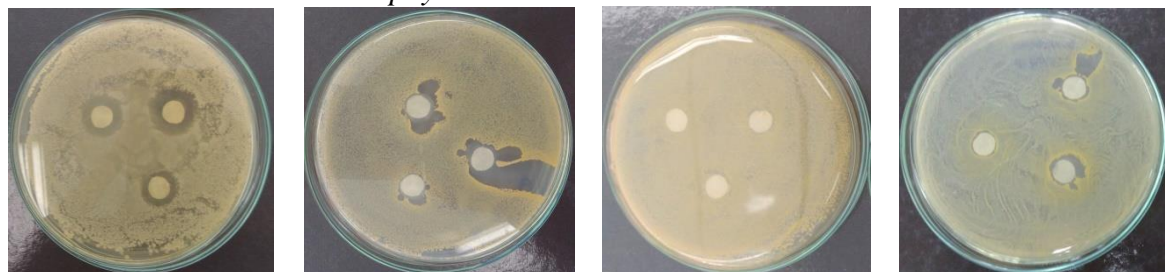
(a)

(b)

(c)

(d)

Staphylococcus aureus ATCC 25923



(e)

(f)

(g)

(h)