

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



TESE DE DOUTORADO

Produção de nanofibras de amido e carvacrol com atividades antimicrobiana e antioxidante

Laura Martins Fonseca
Engenheira de Alimentos
Mestre em Engenharia

Pelotas, 2020

Laura Martins Fonseca

Produção de nanofibras de amido e carvacrol com atividades antimicrobiana e antioxidante

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

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias - UFPel

Prof^a. Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze - UFPel

Prof. Dr. Loong-Tak Lim – University of Guelph - UoG

Dr^a. Shanise Lisie Mello El Halal - UFPel

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F677p Fonseca, Laura Martins

Produção de nanofibras de amido e carvacrol com atividades antimicrobiana e antioxidante / Laura Martins Fonseca ; Alvaro Renato Guerra Dias, orientador. — Pelotas, 2020.

120 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Amido modificado. 2. Amilose. 3. Electrospinning. 4. Composto fenólico. 5. Nanofibras bioativas. I. Dias, Alvaro Renato Guerra, orient. II. Título.

CDD : 574.192

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias

Prof^a. Dr^a. Patricia Diaz de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Rosana Colussi

Dr^a. Graziella Pinheiro Bruni

Dr^a. Letícia Marques de Assis

Dedico aos meus pais Lisi e Zeca e a Equipe Nano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me guia e abençoa meu caminho com tantas pessoas boas e tanto amor. Agradeço à minha família. Primeiramente, agradeço aos meus pais, Lisi e Zeca, pelo apoio incondicional, por todas as palavras de incentivo, por todo amor e confiança em mim depositados. Vocês são minha base, meu porto seguro e meu exemplo. Agradeço ao meu namorado, Alexandre, por estar sempre ao meu lado, por muito amor, paciência e por ser esse companheiro incansável. Agradeço ao meu filho de quatro patas, Bob, que me dá tanta alegria e amor. Agradeço às minhas três avós, Aury, Mimi e Marta, que já não se encontram mais entre nós, mas que tanto me ensinaram na vida e das quais sinto saudades todos dias.

Agradeço às minhas amigas da turma “desde sempre e para sempre”. Começando pela minha irmã/comadre Mari que é a “minha pessoa”. À minha linda afilhada, Martina, que me enche de amor e orgulho. Agradeço às amigas Luh, Pati, Carol e Fê por estarem sempre presentes, por permanecerem. Vocês todas são meu ombro amigo, minhas grandes conselheiras e apoiadoras. Agradeço à minha gêmea Lu, por todas as alegres jornadas Pelotas > Dom Pedrito, pelo apoio e amizade. Agradeço às amigas “From Canada to life” Dani e Bruna, com quem vivi inúmeras aventuras. Obrigada por estarem ao meu lado no doutorado sanduíche, essa etapa tão maravilhosa e desafiadora em uma terra far far away. Obrigada por essa amizade linda e sincera e por tanto que me ensinaram.

Agradeço à Equipe Nano: Fran, Grazi, Jean e Mari. Os melhores colegas e companheiros de dia a dia que alguém poderia desejar. Vocês me ensinaram tanto ao longo desses quatro anos, mostraram-me o caminho e me aguentaram todos os dias. Essa tese tem vocês em todas as páginas, desde uma simples análise até um artigo publicado e toda experiência adquirida por traz disso tudo. Somos uma equipe forte e unida.

Ao comitê de orientação. Agradeço à minha querida co-orientadora Shanise, que desde o primeiro dia de doutorado me guia. Obrigada por todos ensinamentos, por tanto me ajudar e apoiar. Agradeço aos meus orientadores Alvaro e Eleessandra, por acreditar em mim, por me guiar, por abrirem tantas portas e por me dar autonomia. “Sob as asas de vocês” cresci mais do que poderia prever. Obrigada por estarem sempre disponíveis, por tantos desafios e por depositarem tanta confiança (e verba) no meu trabalho, os frutos estão sendo colhidos. Obrigada ao meu orientador no

doutorado sanduíche no Canadá, Loong-Tak Lim, que me recebeu com muita paciência, sempre disponível e interessado. Obrigada por ter me ensinado e guiado, não somente nos seis meses na Universidade de Guelph, mas também continua com uma grande parceria que vem dando muito certo. Comissão de orientação forte eu tenho. Orgulho em ter trabalhado com vocês e meu muito obrigada.

Agradeço à Prof. Bilica, pela parceria no meu primeiro artigo de doutorado publicado. Por ter me incentivado tanto, por toda alegria e vibração positiva que me motivou em muitos dias cansativos. Às Professoras Ângela Fiorini, Caroline Borges, Francieli Stefanello e ao Prof. Eliezer Gandra, pela parceria e ensinamentos.

Agradeço aos meus colegas do DCTA que de alguma maneira participaram dessa jornada e que muito me ensinaram. Vocês ficarão para sempre em minhas lembranças: Rosane, Marjana, Milena, Bruna, Estefânia, Franciene, Cláudio, Lucas, Natalia e Helen. Agradeço à Meri, pessoa ímpar que divide os corredores do DCTA com todos nós com muita alegria, bom humor e histórias para contar. Obrigada por tanto me alegrar em dias difíceis, por todas conversas divertidas e muitas risadas.

Agradeço a todos os professores do PPGCTA. À UFPEL, UOG, FAPERGS, CAPES e CNPq.

Sou grata por tantas pessoas que estiveram ao meu lado nessa etapa que está sendo concluída. Sem vocês eu não estaria aqui, sem vocês nada disso teria sido realizado. Ninguém chega a lugar nenhum sozinho. A todos, meu muito obrigada!

Resumo

FONSECA, Laura Martins. **Produção de nanofibras de amido e carvacrol com atividades antimicrobiana e antioxidante**. 2020, 120p. Tese doutorado (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento e Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Nanofibras de amido produzidas por *electrospinning* são efetivas na encapsulação de compostos bioativos, gerando materiais biodegradáveis aplicáveis na elaboração de embalagens ativas para alimentos. Estas embalagens interagem com os alimentos, aumentando sua vida útil, como as antimicrobianas que retardam o crescimento de microrganismos deteriorantes ou patogênicos em alimentos, ou ainda, as com atividade antioxidante que retardam as oxidações ocorrentes no armazenamento. Nesse contexto, objetivou-se com o estudo produzir nanofibras a partir de amido de diferentes fontes (milho e batata) com diferentes teores de amilose, nativos ou modificados, e incorporá-las com carvacrol visando a produção de um material com atividades antimicrobiana e antioxidante. A tese está subdividida em três capítulos, sendo no primeiro produzidas nanofibras de amido de milho nativo e aniônico, ambos com diferentes teores de amilose. No segundo foi estudada a produção de nanofibras de amido de batata solúvel com diferentes tempos de descanso da solução polimérica formadora de nanofibras. Por fim, no terceiro capítulo foram produzidas nanofibras de amido de batata para encapsulação de carvacrol e avaliação de suas atividades antimicrobiana e antioxidante. Nos capítulos 1 e 2 as nanofibras foram produzidas e avaliadas quanto às suas propriedades morfológicas, estruturais e térmicas. As nanofibras de amido de batata solúvel apresentaram-se contínuas, com diâmetros na ordem de nanômetros e alta estabilidade térmica (Capítulo 2). Assim, foram escolhidas para encapsulação de carvacrol (Capítulo 3). As nanofibras de amido/carvacrol apresentaram alta atividade antioxidante frente ao radical ABTS e antimicrobiana reduzindo o crescimento de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus* e ainda mantendo sua atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* por 30 dias. Assim, mostrando potencial para serem aplicadas na conservação de alimentos pela formação de embalagens ativas.

Palavras-Chave: Amido modificado; Amilose; *Electrospinning*; Composto fenólico; Nanofibras bioativas.

Abstract

FONSECA, Laura Martins. **Starch/carvacrol nanofibers with antimicrobial and antioxidant activities**. 2020, 120p. Doctoral Thesis (PhD in Food Science and Technology) - Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Electrospun nanofibers are effective in encapsulating bioactive compounds, generating biodegradable materials applicable as active packaging for food products. These packages interact with food, increasing its shelf life, such as antimicrobials that prevent the growth of deteriorating or pathogenic microorganisms in food. As well as those packages with antioxidant activity that delay oxidations during storage. In this context, the aim of the study was to produce and characterize nanofibers from starch from different sources (corn and potato) with different amylose contents, native or modified. Furthermore, to incorporate the nanofibers with carvacrol aiming at the production of an antimicrobial and antioxidant material. The thesis is divided into three Chapters: First, nanofibers of native and anionic corn starch were produced, both with different amylose contents. In the second chapter, the production of potato starch nanofibers with different aging times of polymeric fiber-forming solution was studied; Finally, in the third chapter, potato starch nanofibers were produced to encapsulate carvacrol and evaluate its antimicrobial and antioxidant activities. In Chapters 1 and 2, the nanofibers were produced and evaluated for their morphological, structural and thermal properties. The soluble potato starch nanofibers were continuous, with diameters in the order of nanometers and high thermal stability (Chapter 2). Thus, they were chosen for the encapsulation of carvacrol (Chapter 3). The starch/carvacrol nanofibers showed high antioxidant against ABTS radical and antimicrobial activity, reducing the growth of *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* and *S. aureus* and maintaining their antimicrobial activity against *S. aureus* for 30 days. The nanofibers showed potential to be applied in food products conservation through the formation of active packages.

Keywords: Modified starch; Amylose; Electrospinning; Phenolic compounds; Bioactive nanofibers.

Lista de Figuras

Figura 1 – Modelo de uma estação de <i>Electrospinning</i> para a formação de nanofibras.....	17
Figura 2 – Representação da organização e estrutura do grânulo de amido.	19
Figura 3 – Estrutura molecular da amilose (a) e amilopectina (b).....	20
Figura 4 – Esquema da reação de fosfatação monoéster com tripolifosfato de sódio (TPF).	22

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Nanofibras pela técnica de <i>electrospinning</i>	16
3.2 Amido.....	18
3.2.1 Amido modificado	21
3.3 Nanofibras de amido pela técnica de <i>electrospinning</i>	23
3.4 Óleos essenciais e seus compostos bioativos	25
3.5 Encapsulação de compostos bioativos em nanofibras pela técnica de <i>electrospinning</i> ..	26
3.6 Embalagens ativas para alimentos	29
4 PROJETO DE PESQUISA.....	31
5 RELATÓRIO DE CAMPO.....	80
6 ARTIGO 1.....	81
7 ARTIGO 2.....	91
8 ARTIGO 3.....	99
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

A qualidade e segurança de alimentos é de extrema importância na indústria alimentícia. O uso de aditivos sintéticos na formação de embalagens ou diretamente na matriz dos alimentos é bastante difundido. Entretanto, existe uma demanda ainda em crescimento por aditivos de origem natural que garantam o aumento na vida útil, diminuição na deterioração e que retardem a contaminação dos alimentos. Nesse contexto, os óleos essenciais e seus compostos apresentam alto potencial para substituição de sintéticos principalmente devido a suas atividades antioxidante e antimicrobiana.

A nanotecnologia consiste na produção, manipulação e exploração de materiais com escala nanométrica e encontra-se em crescente desenvolvimento na ciência de alimentos e em indústrias do setor alimentício e farmacêutico (GONZÁLEZ, ALVAREZ IGARZABAL, 2015; HE, HWANG, 2016; PITAKSUTEEPONG, 2016; SAIDI, ZEISS, 2016; TAN et al., 2016). Esses materiais podem ser elaborados a partir de polímeros naturais que são biocompatíveis, biodegradáveis e de baixo custo (KONG, ZIEGLER, 2012; X. LI, CHEN, YANG, 2016). Uma aplicação que vem sendo estudada para esses materiais é a nanoencapsulação de compostos bioativos, existindo diferentes técnicas para formação de nanopartículas, nanoesferas, nanofibras e nanocápsulas (ESFANJANI, JAFARI, 2016).

A técnica de *electrospinning* utiliza polímeros para formação de fibras em escala nanométrica, na qual as soluções poliméricas são provenientes de polímeros sintéticos ou naturais, como acetato de polivinila, náilon, proteínas e polissacarídeos (KONG, 2012; SADEGH-HASSANI, MOHAMMADI NAFCHI, 2014; ZHANG, TANG, ZHENG, 2016). O amido é um polissacarídeo amplamente aplicado na indústria de alimentos e de embalagens devido à sua versatilidade, sua biodegradabilidade e abundância (DAUDT, KÜLKAMP-GUERREIRO, CLADERA-OLIVERA, THYS, MARCZAK, 2014; FRANCO et al., 2010; GARCÍA-TEJEDA et al., 2013). Estudos são encontrados relatando a produção de nanofibras de amido com alto teor de amilose ou combinado com polímeros sintéticos, a partir da técnica de *electrospinning* (KONG, ZIEGLER, 2012, 2014; LANCUŠKI, VASILYEV, PUTAUX, ZUSSMAN, 2015; WANG et al., 2016), no entanto, estudos que demonstrassem a produção de nanofibras a

partir de amido com normal teor de amilose (entre 15 e 29%) e amidos modificados não eram encontrados até o momento.

O amido para ser utilizado na produção de nanofibras, geralmente necessita ser combinado com outro polímero devido a sua instabilidade no processamento. Estas características podem ser aprimoradas por meio da modificação, utilizando métodos químicos, em que ocorre a alteração de sua estrutura molecular, e consequentemente de suas propriedades (BATISTA, MENDES, CONCEI, 2008; HUI, QI-HE, MING-LIANG, QIONG, GUO-QING, 2009; KONG, 2012; LÓPEZ, ZARITZKY, GARCÍA, 2010; SUNTHORNVARABHAS, CHATAKANONDA, PIYACHOMKWAN, SRIROTH, 2011; SUNTHORNVARABHAS et al., 2014; ZHANG et al., 2016). Algumas modificações químicas, como aniônica, carregam o amido eletrostaticamente (DIAS et al., 2011a). Os amidos aniônicos, ou seja, com cargas negativas, são obtidos da reação do amido com reagentes que contenham grupos fosfato e carboxil (ČÍŽOVÁ, NEŠČÁKOVÁ, MALOVÍKOVÁ, BYSTRICKÝ, 2016; KUO, LAI, 2007; WEN et al., 2016). Os amidos aniônicos, em relação ao nativo, apresentam capacidade de retenção de substâncias e cargas (Kuo, Lai, 2007), o que pode aprimorar sua estabilidade no processamento, uma vez que aumenta sua condutividade elétrica, auxiliando na ação do campo elétrico, facilitando com que a solução conduza corrente elétrica e forme uma rede sólida de nanofibras. Outra característica diretamente ligada a dificuldade na produção de nanofibras é a viscosidade da solução polimérica de amido, assim a utilização de amido solúvel pode acarretar em alterações positivas neste parâmetro promovendo viscosidade adequada à solução e melhor estabilidade durante a produção de nanofibras (FONSECA, et al., 2019a).

Os materiais em escala nanométrica, como por exemplo, as fibras ultrafinas e nanofibras, produzidos a partir de polímeros naturais podem ser incorporados de compostos bioativos devido a sua alta área superficial em relação ao volume o que propicia efetiva encapsulação e liberação controlada desses compostos. Podendo ser utilizados óleos essenciais ou seus compostos isolados, como o carvacrol, com ação antimicrobiana e antioxidante (ARAUJO, LONGO, 2016). O carvacrol é um composto fenólico efetivo na inibição do crescimento microbiano deteriorante em alimentos e um agente antioxidante que protege as células de danos ocorridos do estresse oxidativo (LAFARGE, BOU-MAROUN, PONTOIRE, CAYOT, LE BAIL, 2017).

Diversos estudos são encontrados relatando as propriedades bioativas do carvacrol (AIT-OUAZZOU, ESPINA, GARCÍA-GONZALO, PAGÁN, 2013; BELDA-GALBIS, LEUFVÉN, MARTÍNEZ, RODRIGO, 2014; GURSUL, KARABULUT, DURMAZ, 2019; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, AMODIO, COLELLI, 2017; RAMOS, BELTRÁN, PELTZER, VALENTE, GARRIGÓS, 2014; RAMOS et al., 2013). Devido à sua alta instabilidade, estudos utilizam técnicas de encapsulação para entrega efetiva de suas propriedades bioativas ao destino desejado. Cheng et al., (2019) encapsularam carvacrol em filmes de alginato, já Tas et al., (2019) utilizaram coberturas de haloisita para encasular carvacrol, ambos os estudos sugeriram a aplicação em embalagens de alimentos com atividades bioativas. Existem estudos que utilizam *electrospinning* para encapsulação de carvacrol, como Tampau, González-Martínez, Chiralt, (2018) que utilizaram policaprolactona (PCL) como material de parede na formação de nanofibras que aplicaram em filmes de amido formando um filme multicamada. Scaffaro, Lopresti, (2018) utilizaram políácido láctico (PLA) como material de parede ou ainda Tampau, González-Martínez, Chiralt, (2017) que utilizaram PCL e amido para encapsulação. Na fabricação de embalagens com compostos bioativos, a técnica de *electrospinning* é promissora devido à possibilidade de produção de materiais em escala nanométrica. Essa técnica apresenta grande vantagem pois não necessita de altas temperaturas em sua produção.

Compostos bioativos encapsulados podem ser adicionados no interior de uma embalagem na forma de sachês ou como uma membrana com atividade antimicrobiana e antioxidante, obtendo-se uma embalagem ativa (BHUSHANI, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; WEN et al., 2016). Estas embalagens, além de protegerem o alimento embalado contra elementos externos, interagem diretamente com o mesmo aumentando sua vida útil e segurança (BHUSHANI, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; MACHADO, BORGES, BRUNO, 2011). Neste contexto essa tese está subdividida em três capítulos contemplando a produção de nanofibras de amido por *electrospinning*. No primeiro capítulo foi realizada a elaboração de nanofibras de amidos de milho com diferentes teores de amilose nativos e aniônicos. O segundo capítulo é referente a formação de nanofibras de amido de batata solúvel com diferentes tempos de descanso da solução polimérica formadora de nanofibras. Por fim, no terceiro capítulo foram utilizadas nanofibras de

amido de batata para encapsulação de carvacrol e avaliação de suas atividades antimicrobiana e antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Objetivou-se com o estudo produzir nanofibras pela técnica de *electrospinning* a partir de amidos de diferentes fontes, com diferentes teores de amilose, nativos ou modificados, e incorporá-las com carvacrol visando à obtenção de membranas com atividades antimicrobiana e antioxidante.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir nanofibras pela técnica de *electrospinning* a partir de amidos de milho normal e de alta amilose, nativos e aniônicos;
- Produzir nanofibras pela técnica de *electrospinning* a partir de amido de batata solúvel;
- Caracterizar as soluções poliméricas de amido formadoras de nanofibras quanto ao seu comportamento reológico e condutividade elétrica;
- Avaliar o tempo de repouso das soluções poliméricas e sua influência na formação de nanofibras;
- Caracterizar as nanofibras quanto as suas propriedades morfológicas, estruturais e térmicas;
- Encapsular, pela técnica de *electrospinning*, o carvacrol nas nanofibras de amido que apresentarem melhores características morfológicas e estruturais;
- Caracterizar as nanofibras incorporadas com carvacrol quanto as suas propriedades morfológicas, estruturais, térmicas e mecânicas;
- Caracterizar as nanofibras incorporadas com carvacrol quanto as suas atividades antioxidante e antimicrobiana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nanofibras pela técnica de *electrospinning*

Electrospinning ou eletrofiação é uma técnica simples e versátil, em que são produzidas fibras com diâmetros na ordem de nanômetros (nanofibras ou fibras ultrafinas). Esta técnica possibilita o controle do diâmetro e da morfologia das nanofibras, bem como a continuidade no processamento na geração de nanofibras uniformes e contínuas (FuH, WU, HE, HUANG, HU, 2016; GÖNEN et al., 2016; NGUYEN, HWANG, MOON, 2016; ZHANG et al., 2016).

A técnica de *Electrospinning* é baseada na geração de um campo elétrico por meio do qual são formadas as nanofibras (SALLES, 2013). O modelo de uma estação de *electrospinning* é ilustrado na Figura 1 e consiste basicamente em uma fonte de alta voltagem, uma bomba infusora com uma seringa (capilar) e um coletor. O processo ocorre quando uma solução polimérica, contida na seringa, é eletricamente carregada, por alta voltagem, formando um jato que sai da agulha da seringa em direção ao coletor. O campo elétrico é formado por um eletrodo positivo conectado à seringa e um eletrodo negativo conectado ao coletor, assim uma carga é induzida na superfície do fluido. Ao aumentar a intensidade do campo, o fluido sai como filamentos contínuos, pela repulsão das cargas, formando na ponta da agulha uma forma cônica, denominada Cone de Taylor, assim as nanofibras são formadas em função da atração e do transporte da solução polimérica pela evaporação do solvente utilizado (FUH et al., 2016; KIM, LEE, UNNITHAN, PARK, KIM, 2015; LAURICELLA, PONTRELLI, COLUZZA, PISIGNANO, SUCCI, 2015; SALLES, 2013; YÖRDEM, PAPILA, MENCELOĞLU, 2008).

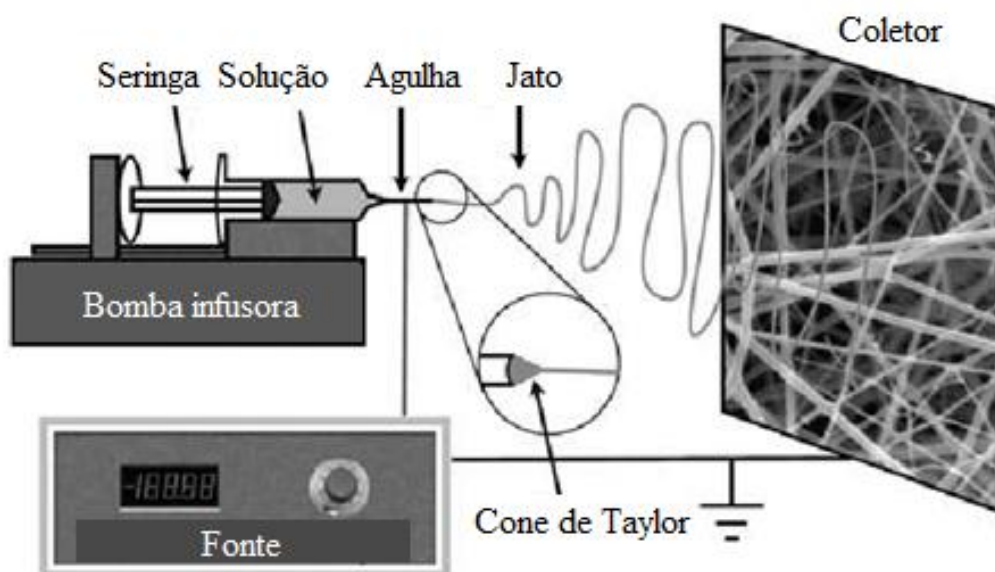


Figura 1 – Modelo de uma estação de *Electrospinning* para a formação de nanofibras.

Fonte: SALLES, 2013, p.2.

Durante o processo são aplicadas forças de cisalhamento nas cadeias poliméricas da solução, evaporando o solvente e solidificando o fluido ao chegar no coletor. Um fator importante para que ocorra essa formação é a escolha adequada do solvente, o qual evapora e leva a deposição do polímero sólido no coletor na forma de uma rede, onde as nanofibras são orientadas aleatoriamente (KIM, HUBER, 2013; SALLES, 2013; YU et al., 2008).

A técnica de *electrospinning* é bastante difundida em pesquisas na produção de nanofibras, bem como a técnica de *electrospraying* na produção de cápsulas. Essas técnicas diferem quanto aos parâmetros utilizados no processamento, principalmente na voltagem aplicada ao sistema e na concentração da solução polimérica. Seus produtos apresentam vantagens estruturais e funcionais, podendo ser aplicados em diversos ramos da indústria, incluindo têxtil, biomédica, produção de filtros, sensores, cosméticos, alimentos, embalagens, entre outras (BEL HAAJ et al., 2016; GUO et al., 2016; I. G. KIM et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

As nanofibras são materiais com alta área de superfície que apresentam uma vasta possibilidade de aplicações. Uma das principais técnicas na produção de nanofibras é a de *electrospinning* (BABAPOOR, KARIMI, KHORRAM, 2016; BHARDWAJ, KUNDU, 2010; REZAEI, TAVANAI, NASIRPOUR, 2016), a qual possibilita o controle de seu diâmetro, que é considerado um parâmetro crucial para

suas propriedades físicas, biológicas, mecânicas e ópticas. São denominadas nanofibras aquelas que apresentam diâmetro de até 100 nm, e quando maiores são então consideradas fibras ultrafinas (GÖNEN, EROL TAYGUN, KÜÇÜKBAYRAK, 2016).

As características das nanofibras são diretamente relacionadas aos parâmetros da solução polimérica (viscosidade, concentração e condutividade elétrica); aos parâmetros do processo (voltagem, distância do coletor e fluxo de alimentação); e aos parâmetros ambientais (temperatura e umidade relativa). O tipo de polímero utilizado como matéria-prima, bem como seu peso molecular, também interferem diretamente no processamento das nanofibras (GÖNEN et al., 2016). Uma das propriedades mais importantes em ser avaliadas é a viscosidade das soluções poliméricas formadoras de fibras, sendo mensurados, além da viscosidade, parâmetros reológicos e avaliação do comportamento de cada solução. Essas características influenciam diretamente na formação e características das fibras (FONSECA et al., 2019a; FONSECA et al., 2019b).

Para produção de nanofibras, podem ser utilizados diversos polímeros sintéticos, que abrangem a maioria das pesquisas realizadas, naturais ou ainda a combinação dos dois. A produção de nanofibras a partir de materiais de origem natural vem crescendo e possibilitando a exploração de novas matérias-primas a serem usadas para este fim. Diversos polímeros naturais mostraram-se eficientes na produção de nanofibras ou nanocápsulas, como quitosana, proteínas (como zeína e gelatina), celulose, colágeno, entre outros, sendo escolhidos de acordo com a aplicação a que se deseja destinar (BHARDWAJ, KUNDU, 2010). Ainda estão sendo estudados polímeros para esse fim, como o amido, que encontra-se dentre os materiais com maior disponibilidade em fontes naturais e, além de sua alta disponibilidade, ainda é biocompatível, biodegradável e apresenta diversas possibilidades de modificações e aplicações (BEL HAAJ, THIELEMANS, MAGNIN, BOUFI, 2016).

3.2 Amido

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, (Resolução RDC nº 263, 2005) “o amido é o produto amiláceo extraído de partes comestíveis de cereais, tubérculos, raízes ou rizomas”. É um carboidrato encontrado na maioria dos

vegetais que fornece de 70 a 80% das calorias que o homem consome. Pode ser oriundo de diversas fontes botânicas, apresentando característica e propriedades distintas, como a forma e o tamanho do grânulo (FRANCO et al., 2010; RIBEIRO, SERAVALLI, 2007).

O grânulo de amido possui estrutura semicristalina com regiões cristalinas e amorfas. É composto por um centro original de crescimento, denominado hilo e ao seu redor por duas macromoléculas, amilose e amilopectina (Figura 2), sendo a região cristalina composta por cadeias de amilopectina e as regiões amorfas por pontos de ramificação e cadeias de amilose. A proporção e a organização física dessas macromoléculas no grânulo influenciam em sua funcionalidade e determinam o comportamento do amido em suas diversas aplicações (ROCHA, DEMIATE, FRANCO, 2008).

O teor de amilose influencia diretamente nas propriedades, aplicações e na estrutura do amido. Amidos com diferentes teores de amilose podem ser classificados como *waxy* o qual é considerado sem amilose, constituído apenas por amilopectina; amido normal que apresenta de 10 a 25% (p/p) em teor de amilose e; alta amilose com 50% (p/p) (Hylon V), com 70% (p/p) (Hylon VII) ou ainda com 80% (p/p) (Gelose 80) (QIAO et al., 2016; YANG et al., 2016).

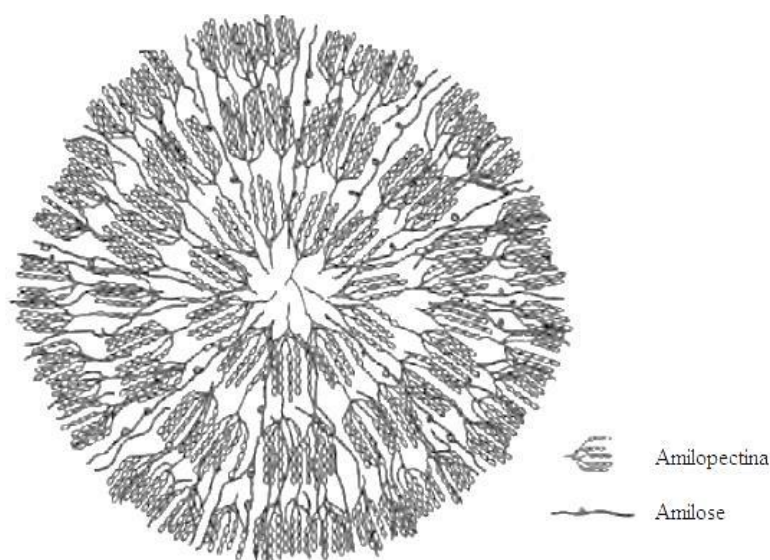


Figura 2 – Representação da organização e estrutura do grânulo de amido.

Fonte: ALMEIDA, 2012, p.32.

A amilose apresenta cadeia linear de tamanho médio, com unidades de α -D-glucopirranose ligadas por ligações glicosídicas α 1-4 (Figura 3a), já a amilopectina possui cadeia ramificada com unidades de α -D-glucopirranose unidas por ligações α 1-4 e α 1-6, que conferem ramificações a cadeia, entre um grupo hidroxila e um carbono das cadeias de glicose (Figura 3b) (CHEN et al., 2015).

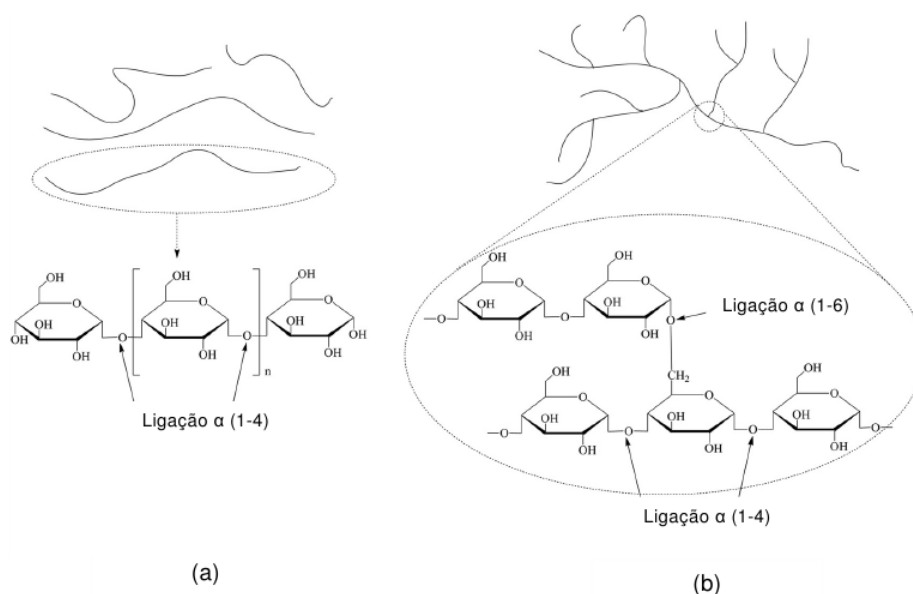


Figura 3 – Estrutura molecular da amilose (a) e amilopectina (b).

Fonte: CHEN et al., (2015), p. 67460.

O grânulo de amido é birrefringente, apresentando alto grau de organização molecular, que pode ser observado pela microscopia com luz polarizada, com a visualização de uma imagem denominada “Cruz de Malta”. A birrefringência e a cristalinidade do amido dependem das matérias-primas, da proporção de amilose e amilopectina e do grau de ordenamento estrutural dos grânulos (ALMEIDA, 2012; ORDÓÑEZ, 2005).

A utilização industrial do amido vem crescendo e se aperfeiçoando devido à sua diversidade, podendo ser aplicado, por exemplo, como espessante ou estabilizante no processamento de alimentos. Esse polissacarídeo também tem sido utilizado na elaboração de embalagens (DIAS et al., 2011b; SILVA et al., 2006) e uma outra possibilidade de aplicação seria na produção de nanofibras e membranas. Apesar de sua ampla utilização, o amido nativo apresenta baixa resistência térmica e instabilidade no processamento e, dependendo da sua aplicação, essas

características podem dificultar o seu uso. As propriedades do amido podem ser aprimoradas a partir de sua modificação, o que aumenta sua utilização em aplicações industriais (HALAL et al., 2015; VANIER et al., 2012).

3.2.1 Amido modificado

A modificação do amido acarreta em alterações nas suas propriedades químicas e físicas aprimorando suas propriedades funcionais. Os processos de modificação podem ser físicos, enzimáticos ou químicos, e também pela combinação de dois ou mais destes processos (ADEBOWALE, AFOLABI, OLU-OWOLABI, 2006; HUANG, LU, LI, TONG, 2007; HUI et al., 2009; SILVA et al., 2006). O amido possui grande quantidade de hidroxilas, como pode ser visto na Figura 3 (Seção 3.2), o que possibilita sua modificação química por esses sítios ativos (CHEN et al., 2015).

Os amidos modificados quimicamente são produzidos por derivatização com tratamentos de oxidação, acetilação, ligação cruzada, eterificação, esterificação, entre outros. Os métodos de modificação por reação de eterificação ou esterificação são aqueles com uso de um catalizador alcalino tendo como resultado a substituição de unidades de glicoses (UG) por radicais (introduzidos de acordo com a modificação e o reagente escolhido) expressos em grau de substituição (GS). A modificação ocorre pela introdução de cadeias laterais não iônicas, iônicas ou catiônica na cadeia de amido, sendo os amidos aniônicos àqueles obtidos pela introdução de grupos com cargas negativas (CHEN et al., 2015; MUCCILLO, 2009).

Os amidos aniônicos são produzidos pela incorporação de um grupo carboxil ou fosfato (ČÍŽOVÁ et al., 2016; PENG et al., 2016) e podem ser obtidos pela modificação química de fosfatação, em que são introduzidos grupamentos iônico fosfato na molécula de amido (Figura 4). Para substituição dos grupos hidroxila por esses grupamentos é necessário o controle de condições de processo, como temperatura (entre 120 e 170 °C), tempo de reação (de 1 a 2 horas) e pH. Dentre os reagentes mais utilizados está o tripolifosfato de sódio (TPF) pois apresenta baixo custo, além disso, é de fácil manuseio e processamento. O uso de TPF produz amidos com boa claridade de pasta e considerável aumento em sua hidratação e solubilidade.

O GS de grupos fosfato é determinado pelo tempo e temperatura de reação, bem como pelo controle do pH e concentração do reagente (BATISTA et al., 2008; LIMBERGER, SILVA, EMANUELLI, COMARELA, DALPIEVE, 2008). O GS permitido para aplicação desses amidos modificados em alimentos é de 0,01 a 0,15 contendo 1 a 5% de fósforo (CHEN ET AL., 2015; MUCCILLO, 2009; XIE, LIU, CUI, 2005). Para uso em alimentos o *Codex Alimentarius* preconiza teor de fósforo residual máximo de 0,5%. Já para embalagens alimentícias ainda não é encontrada uma legislação específica.

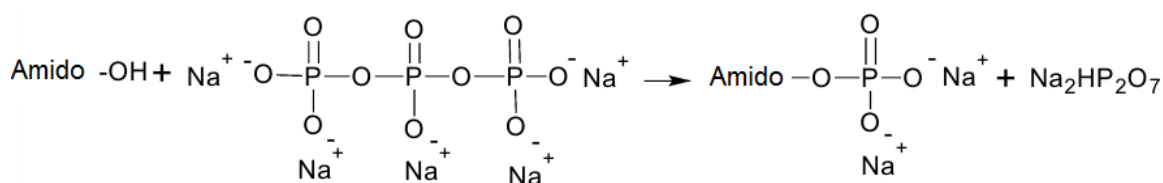


Figura 4 – Esquema da reação de fosfatação monoéster com tripolifosfato de sódio (TPF).

Fonte: XIE; LIU; CUI, 2005, p. 20.

Na obtenção do mono-éster-fostato a reação ocorre pela esterificação de um grupo hidroxila (C-6). Assim, ocorre a eliminação de alguns grupos hidroxila e introdução de radicais carregados negativamente nas cadeias de amilose, que se repelem mantendo-se mais afastadas. Esses amidos são denominados polieletrólitos aniônicos (XIE et al., 2005).

Quanto a aplicação, o amido aniônico, ou fosfatado, é utilizado em alimentos como estabilizante de emulsões, em padarias e alimentos que necessitem de maior estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento (XIE et al., 2005). Como os reagentes utilizados para a fosfatação, estando dentro do teor residual delimitado, são permitidos em contato com alimentos, buscam-se aplicações diferenciadas para esses amidos modificados, relacionadas à área da indústria alimentícia. Uma possibilidade seria a produção de nanofibras por *electrospinning*, uma vez que a introdução de cargas negativas nas cadeias do amido pode auxiliar na formação das nanofibras (principalmente pela alteração de sua condutividade elétrica) que podem ser aplicadas à produtos alimentícios e/ou embalagens ativas mostrando como vantagem sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (FONSECA et al., 2019b).

Outra modificação que pode acarretar em melhoria nas propriedades do amido é a modificação enzimática, na qual enzimas hidrolisam o amido, ou seja, clivam suas

cadeias alterando suas propriedades químicas e físicas, como na formação de amido solúvel, proporcionando aplicações mais bem definidas (SEVERO, MORAES, RUIZ, 2010). Para produção de nanofibras, essa modificação pode trazer benefícios uma vez que em solução, o amido apresenta alta viscosidade, não sendo possível ser eletroestirado. Assim, a modificação enzimática pode gerar amido solúvel que apresenta menor viscosidade em solução, tornando possível a produção de nanofibras a partir dele (FONSECA, et al., 2019a). Comercialmente existem amidos de batata solúvel, que já foram estudados para aplicação em alimentos e também como matriz polimérica de vários materiais como Vasconcelos et al. (2012) que produziram hidrogéis de amido de batata solúvel e Li et al. (2016) que encapsularam curcumina em nanopartículas de amido de batata solúvel produzidas por métodos de agitação.

3.3 Nanofibras de amido pela técnica de *electrospinning*

Fibras ultrafinas ou nanofibras de amido podem ser aplicadas em materiais biodegradáveis (KONG e ZIEGLER, 2014), sendo um material ambientalmente correto. Em amidos de alta amilose, as moléculas interagem entre si e formam um emaranhado mais facilmente comparado aos amidos com menor teor de amilose, uma vez que as moléculas de amilopectina são mais volumosas e não se emaranham o suficiente durante o processo para formação das nanofibras (KONG e ZIEGLER, 2012). Assim, com moléculas mais volumosas, ocorre maior dificuldade da ação do campo elétrico para formação do Cone de Taylor e, conseqüente, formação do jato que dá origem às nanofibras. Essa problemática pode ser solucionada com a introdução de cargas ao polímero, facilitando a ação do campo elétrico, excitação dos elétrons presentes na matriz polimérica e formação do emaranhado. Estas cargas podem ser introduzidas pela modificação química do amido por fosfatação. Outra maneira de facilitar a formação de nanofibras por *electrospinning* é a diminuição da viscosidade pela formação de amido solúvel por reação química ou enzimática, como abordado na Seção 3.2.1.

Até então, não se encontravam estudos que utilizassem amido com teores de amilose normal ou amido modificado, como matéria-prima para produção de nanofibras. Existem alguns estudos relatando a produção de micro ou nanofibras de amido de alta amilose, bem como de amido combinado a outros polímeros. Kong;

Ziegler, (2012) avaliaram as propriedades reológicas da solução de amido de alta amilose, Gelose 80, em diferentes concentrações de amido e do solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Também avaliaram a capacidade dessas soluções de formar nanofibras pela técnica de *electrospinning*, utilizando uma configuração modificada da técnica, denominada *electro-wet-spinning*, na qual utiliza-se um banho de solvente para coleta das fibras, e obtiveram microfibras de amido Gelose 80. Ainda no mesmo estudo, os autores avaliaram a capacidade de formação de nanofibras dos amidos Hylon VII, Hylon V, Melojel e Amioca e de feijão mungo, e relataram a obtenção de microfibras somente de amido Hylon VII, sendo que com o Melojel e Amioca não obtiveram nanofibras. Já os amidos Hylon V e de feijão mungo (que é constituído de 15 a 35% de amilose) apresentaram fraca habilidade de formar nanofibras (*electrospinnability*, do inglês).

Os mesmos autores publicaram um estudo com a caracterização de nanofibras de amido Gelose 80 obtidas no estudo anteriormente citado (KONG, ZIEGLER, 2014) e relataram a produção de nanofibras uniformes e contínuas. Kong; Ziegler, (2013) utilizaram amido Hylon VII como matéria-prima, realizaram uma variação dos parâmetros de *electrospinning* (fluxo de alimentação, distância do coletor, voltagem e concentração do polímero na solução) e avaliaram sua influência no diâmetro das fibras, que variou significativamente de $3,35 \times 10^3$ à $22,35 \times 10^3$ nm.

Lancuški et al., (2015) produziram fibras de amido de alta amilose, Hylon VII, utilizando ácido fórmico como solvente, em diferentes concentrações. A redução na concentração do solvente acarretou em fibras com diâmetros menores, variando de 84 à 304 nm, o que sugere grande influência da água na solução e formação de nanofibras com diâmetros menores 100 nm (consideradas nanofibras). O amido pode ser ainda combinado com outros polímeros sintéticos já sendo encontrados estudos de amido de mandioca com poliácido láctico – PLA ou poli (óxido de etileno) – PEO (SUNTHORNVARABHAS et al., 2011, 2014).

A técnica de *electrospinning* gera nanofibras contínuas que podem ser coletadas na forma de membranas, ou do inglês “*nonwovens*”. Essas membranas apresentam propriedades como aumento da sua atividade superficial, aumento na capacidade da superfície em se ligar com grupos funcionais e maior porosidade. Assim, seu uso como material de encapsulação para de óleos essenciais e compostos bioativos se torna de grande interesse para as indústrias alimentícias e farmacêuticas,

devido à sua capacidade de proporcionar uma liberação controlada e específica desses compostos (LIM, MENDES, e CHRONAKIS, 2019).

3.4 Óleos essenciais e seus compostos bioativos

Os óleos essenciais são misturas de substâncias voláteis orgânicas, oriundos de plantas, raízes, flores e pericarpos de frutos cítricos, que podem ser obtidos por destilação e arraste com vapor de água, por extração com maceração, entre outros. Embalagens incorporadas com óleos essenciais e/ou seus compostos atuam pela difusão dos compostos voláteis para o alimento, inibindo a proliferação de microrganismos, os quais alteram o aroma, sabor, cor e textura dos alimentos e consequentemente diminuem a vida útil dos mesmos (REALINI, MARCOS, 2014; VEGA-LUGO e LIM, 2009).

Cada óleo essencial apresenta vários compostos, dentre eles, fenóis, aldeídos, terpenos e ácidos, que apresentam diferentes ações dificultando que o microrganismo crie resistência, como ocorre nos antimicrobianos sintéticos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais vem sendo avaliada frente a diversos microrganismos, como os deteriorantes de alimentos e produtores de toxinas alimentares (ARAUJO, LONGO, 2016; CALO, CRANDALL, O'BRYAN, RICKE, 2015; FORMOLO, 2009; GHABRAIE, VU, TATA, SALMIERI, LACROIX, 2016; MACHADO et al., 2011).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não foi totalmente descoberto. Acredita-se que ocorra pela penetração dos compostos nas membranas da bactéria até o interior da célula inibindo suas propriedades funcionais. Sua principal ação é dada pelos compostos fenólicos os quais cada óleo essencial apresenta diferentes proporções, como por exemplo, carvacrol, timol e eugenol, que possuem uma rápida e eficiente resposta como antimicrobiano, alterando a permeabilidade da célula, causando danos nas membranas e deterioração da bactéria (CALO et al., 2015; MACHADO et al., 2011).

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) apresentam em sua fração compostos fenólicos voláteis, como o carvacol e timol. Estes são conhecidos por sua atividade antioxidante a qual inibe o estresse oxidativo, e por sua atividade antimicrobiana atuando na inibição do crescimento

microbiano, ambos em alimentos e que podem vir a prejudicar à saúde do consumidor (ARAUJO e LONGO, 2016; AZEREDO et al., 2011; FRATINI et al., 2017; GURSUL et al., 2019). Carvacrol (CRV) é um monoterpeneo que, além das atividades citadas, ainda apresenta atividade antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória mostrando efeitos de grande interesse na área da saúde e fármacos (GUIMARÃES et al., 2015). Além disso, é um composto reconhecido como um aditivo seguro, (GRAS, *generally recognized as safe*, do inglês) utilizado na indústria alimentícia em produtos de panificação, laticínios congelados, goma de mascar, doces, gelatinas, pudins, molhos e bebidas (BELDA-GALBIS, LEUFVÉN, MARTÍNEZ, RODRIGO, 2014). Ainda, o carvacrol pode ser utilizado em frutas e vegetais como Martínez-Hernández, Amodio, Colelli, (2017) que encapsulou carvacrol em nanopartículas de quitosana para manter a qualidade de cenouras frescas fatiadas e Ramos et al. (2013) que avaliou as propriedades antifúngicas de filmes de polipropileno (PP) contendo carvacrol visando o aumento da vida útil pós-colheita de morangos e pão frescos durante o armazenamento.

Esses materiais bioativos são produzidos devido a esses compostos apresentarem uma grande limitação, sua elevada volatilidade e baixa resistência a altas temperaturas. Assim, quando submetido a temperaturas mais elevadas, sua atividade como composto bioativo não pode ser precisamente avaliada, além de perdas em quantidade de compostos ocorrerem. Ainda vale ressaltar sua limitação de uso em alimentos processados em altas temperaturas (como pasteurizados) ou que apresentem longos períodos de armazenamento em temperaturas mais elevadas. Além disso, os compostos bioativos são degradados por outros elementos externos que reduzem sua atividade como oxigênio, umidade, luz, entre outros (GONÇALVES et al., 2017). Nesse contexto, a encapsulação de carvacrol em um material biodegradável, como nanofibras, (NEO et al., 2013) apresenta grande potencial para sua proteção contra elementos externos e liberação controlada atuando de maneira específica de acordo com o uso desejado (BHUSHANI, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

3.5 Encapsulação de compostos bioativos em nanofibras pela técnica de *electrospinning*

As nanofibras produzidas por *electrospinning*, dependendo da sua composição e dos parâmetros utilizados durante a sua produção, podem apresentar diferentes

formas e tamanhos (SALLES, 2013). São geralmente produzidas à temperatura ambiente, o que possibilita a adição de compostos como antioxidantes e antimicrobianos, que são termicamente instáveis (REZAEI et al., 2016). Devido à escala nanométrica e sua grande área de superfície, a incorporação do agente antimicrobiano e/ou antioxidante em sua matriz é promissora (WEN et al., 2016). São encontrados estudos que realizam a encapsulação de óleos essenciais e/ou seus compostos como agente bioativo, pela técnica de *electrospraying* produzindo cápsulas (GÓMEZ-MASCARAQUE, SANCHEZ, LÓPEZ-RUBIO, 2016; KHOSHAKHLAGH, KOOCHKEI, MOHEBBI, ALLAFCHIAN, 2016; LÓPEZ-RUBIO, SANCHEZ, WILKANOWICZ, SANZ, LAGARON, 2012) ou pela fabricação de fibras por *electrospinning* (ALBORZI, LIM, KAKUDA, 2013; SCAFFARO, LOPRESTI, 2018; TAMPAU, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, CHIRALT, 2018a).

A produção e caracterização de fibras com diferentes polímeros para encapsulação óleos essenciais e compostos bioativos diferenciados vêm sendo estudada. Bruni et al., (2020) relataram o uso de fibras de proteína isolada de soja/PVA para encapsulação de β -caroteno obtendo alta eficiência de encapsulação e uma efetiva e controlada liberação em meio simulante de alimentos gordurosos. Silva et al., (2018) produziram fibras de proteína isolada de soja/zeína/PEO para encapsulação de óleo essencial de gengibre mostrando alta atividade antimicrobiana frente a cinco bactérias relevantes para alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa*). Neste estudo, a efetividade das nanofibras foi confirmada por meio de uma aplicação simulando uma embalagem bioativa para queijo minas frescal, a qual apresentou alta atividade antimicrobiana pela redução da contaminação microbiana no alimento. Antunes et al., (2017) produziram fibras de zeína incorporadas com óleo essencial de eucalipto utilizando complexo de inclusão β -ciclodextrina. As fibras apresentaram atividade antimicrobiana frente a sete bactérias relevantes para alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella dysenteriae* e *Pseudomonas aeruginosa*) pela ação volátil do óleo essencial. Nos três estudos citados, os autores ressaltam a capacidade de fibras obtidas por *electrospinning* para a encapsulação de compostos bioativos na formação de embalagem ativa.

Fonseca, et al. (2019c) reportam a utilização de nanofibras de amido de batata solúvel para encapsulação de carvacrol. Até então não haviam estudos que utilizassem amido como um polímero único para encapsulação de compostos pela técnica de *electrospinning*. Nesse contexto, as nanofibras de amido/carvacrol produzidas foram avaliadas quanto sua atividade antioxidante frente ao radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS) e atividade antimicrobiana frente a quatro bactérias: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O:157H:7 e *Staphylococcus aureus*. As nanofibras apresentaram alta atividade antioxidante com percentual de inibição do radical maior de 50% para as maiores concentrações do composto avaliadas. Apresentaram também alta atividade antimicrobiana com percentuais de redução de crescimento microbiano de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus* de 89, 68, 62 e 49%, respectivamente. Ainda, neste estudo foi avaliada a efetividade das nanofibras após o armazenamento mantendo sua atividade em até 30 dias de armazenamento avaliados.

Nanofibras obtidas por *electrospinning* podem ser aplicadas na área de alimentos tanto em embalagem ativa proporcionando atividades antimicrobiana e antioxidante prolongando assim a vida útil de alimentos, bem como diretamente no alimento liberando suas propriedades para preservação do mesmo, ou ainda assim para liberação específica no organismo humano atuando como um medicamento (FONSECA et al., 2019a; FONSECA et al., 2019b).

Quando aplicadas às embalagens ativas, por exemplo, as vantagens das nanofibras e nanocápsulas são relacionadas à eficiência de encapsulação, a estabilidade, bem como a possibilidade de uma liberação controlada e específica dos compostos bioativos incorporados. Estes materiais podem ainda ser utilizados na imobilização e encapsulação de enzimas podendo ser aplicadas em biossensores ou em embalagens ativas. Ainda na área de alimentos, podem ser elaboradas embalagens comestíveis a partir de filmes de polímeros naturais, ou na produção de filtros para líquidos, utilizando membranas formadas por nanofibras (BHUSHANI, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

3.6 Embalagens ativas para alimentos

Os alimentos são acondicionados em embalagens visando prolongar sua vida útil, protegendo o alimento contra perdas na produção, transporte, comercialização e consumo, evitando principalmente contaminações e riscos ambientais. Além de conservar, a embalagem tem a função de identificar, atrair e instruir o consumidor. Uma embalagem ideal deve ser atóxica, proteger o alimento contra perdas de massa pela transpiração e reduzir as trocas gasosas com o meio. Além disso, deve ser resistente a impactos físicos, viável economicamente, adequada ao produto e ser ambientalmente correta (EVANGELISTA, 2008; GAVA, SILVA, FRIAS, 2008). A utilização de polímeros na produção de embalagens aumentou consideravelmente nos últimos anos, chegando a milhões de toneladas, devido ao crescimento da indústria petroquímica que gera grande parte da matéria-prima para sua produção. Assim, a necessidade de aprimorar cada vez mais as embalagens, aliada a preocupação com o impacto ambiental, gera o desenvolvimento de novas tecnologias de fabricação, desde a formulação até a aplicação a que se destinam (FELLOWS, 2006; HENRIQUE, CEREDA, SARMENTO, 2008).

Dentre as inovações em embalagens que podem ser produzidas a partir de materiais poliméricos, sintéticos ou naturais, estão as embalagens ativas, as quais interagem de maneira intencional com o alimento prolongando sua vida útil e mantendo sua qualidade (ALMEIDA et al., 2015; DONSI, FERRARI, 2016; NEO et al., 2013). Uma embalagem pode ser considerada ativa quando apresentar em sua constituição ou no seu interior um composto bioativo, com o intuito de aprimorar seu desempenho de acordo com a necessidade do alimento acondicionado. Essas embalagens atuam diante de sua interação direta com o alimento ou com o meio, não só na proteção contra elementos externos, mas também como agente antimicrobiano ou antioxidante, absorvedor de oxigênio, etileno, umidade, odores ou sabores, entre outras funcionalidades (BHUSHANI, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; VEGA-LUGO, LIM, 2009).

Como apresentam contato direto com o alimento ou o ambiente em que este se encontra, a aceitabilidade de compostos bioativos está mais restrita a produtos de origem natural, que sejam atóxicos e não produzam aromas e sabores (ADILAH, HANANI, 2016; BHUSHANI, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Para avaliar a

eficácia do composto contra determinado microrganismo de interesse, devem ser realizados testes, pois sua efetividade pode ser reduzida de acordo com os componentes do alimento. Diante disso, a escolha do alimento a ser embalado deve ser de acordo com os microrganismos que o composto bioativo apresenta efetividade, bem como de sua interação com o alimento e seus componentes (MACHADO et al., 2011).

As embalagens ativas são cada vez mais visadas e investigadas devido à grande demanda do mercado por alta qualidade e ao desenvolvimento de novos produtos alimentícios, que necessitam de novas tecnologias para conservação e maior proteção contra microrganismos patogênicos e deteriorantes (AL-NAAMANI, DOBRETISOV, DUTTA, 2016; MARINO, BERSANI, COMI, 2001; NEO et al., 2013). Neste contexto, visando solucionar um dos principais problemas da indústria alimentícia, ou seja, a presença de microrganismos contaminantes em alimentos, o uso de óleos essenciais e seus compostos isolados que possuam atividade antimicrobiana é uma alternativa viável e de baixo custo, além de serem provenientes de matérias-primas naturais (CALO et al., 2015; ESPITIA et al., 2012; MARINO et al., 2001).

4 PROJETO DE PESQUISA

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



Projeto de pesquisa

**PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE AMIDO INCORPORADAS COM
ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*), POR
ELECTROSPINNING, PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGEM ATIVA**

Laura Martins Fonseca
Engenheira de Alimentos
Mestre em Engenharia

Pelotas, 2016

Resumo

FONSECA, Laura Martins. **Produção de nanofibras de amido incorporadas com óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), por *Electrospinning*, para aplicação em embalagem ativa.** Qualificação de tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Embalagens ativas são aquelas que interagem com os alimentos, aumentando sua vida útil, como no caso das antimicrobianas, que retardam o crescimento de microrganismos deteriorantes de alimentos. A técnica de *Electrospinning* é bastante utilizada na produção de embalagens e, por meio da nanotecnologia, pode ser utilizada para obtenção de nanofibras a partir de soluções poliméricas provenientes de polímeros naturais, como o amido, e incorporadas de composto bioativo, como óleos essenciais. Não são encontrados estudos da produção de nanofibras, pela técnica de *Electrospinning*, a partir de amido de médio teor de amilose, bem como de amido modificado e ainda incorporadas de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), para aplicação em embalagem ativa de alimentos. Neste contexto, objetivasse com o trabalho produzir nanofibras a partir de amido de milho, com diferentes teores de amilose, nativos e modificados quimicamente e incorporá-las de óleo essencial de orégano para elaboração de embalagens ativas de alimentos. Será realizada a modificação química catiônica ou aniônica no amido de milho de médio e de alto teor de amilose, para obtenção de amidos com cargas positivas e negativas, respectivamente. Após, será realizada a caracterização quanto às suas propriedades físico-químicas, morfológicas, térmicas e de pasta. A partir dos amidos serão produzidas nanofibras, pela técnica de *Electrospinning*, que serão caracterizadas quanto a sua cristalinidade, morfologia e estabilidade térmica. Será adicionado óleo essencial de orégano à solução polimérica, para produção de nanofibras com atividade antimicrobiana, que será aplicada na forma de sachês para formação de embalagem ativa para alimentos. Será avaliada a atividade antimicrobiana das nanofibras incorporadas com óleo essencial, bem como sua efetividade ao serem aplicadas no acondicionamento de alimentos.

Palavras-Chave: Nanofibras; *Electrospinning*; amido catiônico; amido aniônico; óleo essencial de orégano; embalagem ativa.

Lista de Figuras

Figura 1 – Modelo de uma estação de Electrospinning para a formação de nanofibras.....	46
Figura 2 – Representação da organização e estrutura do grânulo de amido...	49
Figura 3 – Estrutura molecular da amilose (a) e amilopectina (b).	49
Figura 4 – Esquema da reação de cationização.	51
Figura 5 – Esquema da reação de fosfatação monoéster com TPF.	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Delineamento experimental para obtenção dos amidos.....	57
Tabela 2 – Delineamento experimental para produção e caracterização de nanofibras a partir de amido.....	62
Tabela 3 – Delineamento experimental para elaboração de nanofibras de amido incorporadas com óleo essencial de orégano.	67

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	37
1.1 HIPÓTESES.....	39
1.2 OBJETIVOS.....	39
1.2.1 Objetivo Geral.....	39
1.2.2 Objetivos específicos.....	39
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	40
2.1 Embalagens de alimentos.....	40
2.1.1 Embalagens ativas.....	41
2.2 Nanotecnologia.....	43
2.2.1 Nanofibras.....	44
2.3 Electrospinning.....	45
2.4 Amido.....	48
2.4.1 Amido modificado.....	50
2.5 Nanofibras de amido pela técnica de Electrospinning.....	53
3 Capítulo 1 – Elaboração de nanofibras de amido de médio e alto teor de amilose nativos e modificados quimicamente.....	55
3.1 INTRODUÇÃO.....	55
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.2.1 Material.....	56
3.2.2 Delineamento Experimental I – Obtenção dos amidos modificados.....	57
3.2.2.1 Obtenção dos amidos catiônicos.....	57
3.2.2.2 Obtenção dos amidos aniônicos.....	58
3.2.2.3 Teor de fósforo e grau de substituição dos amidos aniônicos.....	58
3.2.2.4 Propriedades de pasta e textura de gel.....	59
3.2.2.5 Cristalinidade relativa.....	60
3.2.2.6 Grupos funcionais.....	61
3.2.2.7 Morfologia.....	61
3.2.2.8 Propriedades térmicas.....	61
3.2.3 Delineamento Experimental II - Produção de nanofibras a partir de amido de médio e alto teor de amilose, nativos e modificados.....	62

3.2.3.1	Elaboração de nanofibras pela técnica de Electrospinning	62
3.2.3.2	Viscosidade e condutividade elétrica da solução polimérica	63
3.2.3.3	Morfologia e diâmetro das nanofibras.....	63
3.2.3.3	Cristalinidade relativa	63
3.2.3.4	Grupos funcionais	64
3.2.3.5	Estabilidade térmica	64
3.2.3.6	Análise estatística	64
4	Capítulo 2 – Elaboração de embalagens ativas a partir de nanofibras de amido incorporadas com óleo essencial de orégano (<i>Origanum culgare</i>).....	65
4.1	INTRODUÇÃO.....	65
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	66
4.2.1	Material.....	66
4.2.2	Delineamento Experimental III - Elaboração de nanofibras de amido incorporadas com óleo essencial de orégano.....	66
4.2.3	Elaboração de nanofibras pela técnica de Electrospinning.....	67
4.2.4	Viscosidade e condutividade elétrica da solução polimérica.....	68
4.2.5	Composição química do óleo essencial.....	68
4.2.6	Concentração Mínima Inibitória (CMI) do óleo essencial.....	68
4.2.7	Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	69
4.2.8	Atividade antimicrobiana do óleo essencial.....	69
4.2.9	Morfologia e diâmetro das nanofibras.....	69
4.2.10	Estabilidade térmica das nanofibras.....	69
4.2.11	Atividade antimicrobiana das nanofibras.....	70
4.2.12	Aplicação das nanofibras com óleo essencial de orégano em embalagem ativa.....	70
4.2.13	Análise estatística.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia consiste na produção de materiais em escala nanométrica e encontra-se em crescente desenvolvimento na ciência de alimentos e em indústrias do setor alimentício, sendo promissora para a produção de embalagens (GONZÁLEZ; ALVAREZ IGARZABAL, 2015; HE; HWANG, 2016; PITAKSUTTEEPONG, 2016; SAIDI; ZEISS, 2016; TAN et al., 2016). Estes materiais podem ser elaborados a partir de polímeros naturais, que tem alto potencial para substituição de polímeros sintéticos, devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (KONG; ZIEGLER, 2012; LI; CHEN; YANG, 2016). Os materiais em escala nanométrica, como nanofibras, e produzidos a partir de polímeros naturais podem ser incorporados de um composto bioativo, para posterior aplicação em embalagens ativas. Estas embalagens, além de proteger o alimento embalado contra elementos externos, interagem diretamente com o mesmo aumentando sua vida útil e segurança. Embalagens ativas podem ser obtidas com a utilização de compostos bioativos como antimicrobianos, antioxidantes, absorvedores de oxigênio, odores e umidade, entre outras (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011). Como agente antimicrobiano pode ser utilizado o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), por ser efetivo na inibição do crescimento microbiano deteriorante em alimentos (ARAUJO; LONGO, 2016).

Na fabricação de embalagens com compostos bioativos, a técnica de *Electrospinning* é promissora devido à possibilidade de produção de materiais em escala nanométrica, que podem ser utilizados no interior da embalagem na forma de sachês, como uma membrana com atividade bioativa (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; WEN et al., 2016b). São encontrados poucos estudos que utilizem esta técnica para produção de materiais com a incorporação de compostos bioativos diretamente na matriz polimérica, sendo a maioria realizando sua encapsulação por *Electrospraying*.

A técnica de *Electrospinning* utiliza polímeros para formação de fibras, na qual as soluções poliméricas são provenientes de polímeros sintéticos ou naturais, como proteínas e polissacarídeos (KONG, 2012; SADEGH-HASSANI; MOHAMMADI

NAFCHI, 2014; ZHANG; TANG; ZHENG, 2016). O amido é amplamente aplicado na indústria de alimentos e de embalagens devido à sua versatilidade, sua biodegradabilidade, ao seu baixo custo e abundância (DAUDT et al., 2014; FRANCO et al., 2010; GARCÍA-TEJEDA et al., 2013). São encontrados estudos relatando a produção de nanofibras de amido com alto teor de amilose ou combinado com polímeros sintéticos, a partir da técnica de *Electrospinning* (KONG; ZIEGLER, 2012, 2014; LANCUŠKI et al., 2015; WANG et al., 2016), no entanto, estudos que demonstrem a produção de nanofibras a partir de amido com médio teor de amilose e amidos modificados não são encontrados.

O amido nativo, para ser utilizado na produção de fibras, geralmente necessita ser combinado com outro polímero (KONG, 2012; SUNTHORNVARABHAS et al., 2011, 2014; ZHANG; TANG; ZHENG, 2016), devido a sua instabilidade no processamento. Estas características podem ser aprimoradas por meio da modificação, utilizando métodos químicos, em que ocorre a alteração de sua estrutura molecular, e consequentemente de suas propriedades (BATISTA; MENDES; CONCEI, 2008; HUI et al., 2009; LÓPEZ; ZARITZKY; GARCÍA, 2010).

Algumas modificações químicas, como catiônica e aniônica, carregam o amido eletrostaticamente (DIAS et al., 2011). Os amidos catiônicos, com cargas positivas, são obtidos a partir da reação do amido com reagentes que contenham grupos amina, imina e amônio. Por outro lado, os aniônicos, com cargas negativas, são obtidos da reação do amido com reagentes que contenham fosfato e carboxil (ČÍŽOVÁ et al., 2016; KUO; LAI, 2007; PENG et al., 2016). Os amidos catiônico e aniônico, em relação ao nativo, apresentam capacidade de retenção de substâncias e cargas (KUO; LAI, 2007), o que pode melhorar sua estabilidade no processamento, uma vez que aumenta sua condutividade elétrica, auxiliando na ação do campo elétrico, facilitando com que a solução conduza corrente elétrica e forme uma rede sólida de nanofibras. Estas propriedades podem favorecer a produção de nanofibras uniformes e contínuas pela técnica de *Electrospinning*, possibilitando a utilização de amido como matéria-prima para este fim.

1.1 HIPÓTESES

- O teor de amilose no amido influencia na produção e nas características das nanofibras;
- Amidos catiônicos e aniônicos favorecem a produção de nanofibras uniformes e contínuas pela técnica de *Electrospinning*;
- As nanofibras de amido podem ser incorporadas com composto bioativo, óleo essencial de orégano, pela técnica de *Electrospinning*;
- O óleo essencial de orégano possui atividade antimicrobiana frente a microrganismos deteriorantes em alimentos;
- As nanofibras de amido incorporadas com óleo essencial de orégano são efetivas na elaboração de embalagens ativas com atividade antimicrobiana.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Produzir nanofibras a partir de amido de milho, com diferentes teores de amilose, nativos e modificados quimicamente e incorporá-las de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) para elaboração de embalagens ativas de alimentos.

1.2.1 Objetivos específicos

- Modificar quimicamente via catiônica e aniônica o amido de milho de médio e alto teor de amilose;
- Caracterizar os amidos nativos e modificados quanto as suas propriedades morfológicas, térmicas e de pasta;
- Produzir nanofibras a partir dos amidos de milho com diferentes teores de amilose, nativos e modificados, pela técnica de *Electrospinning*;

- Caracterizar as nanofibras quanto a sua cristalinidade, morfologia e estabilidade térmica;
- Produzir nanofibras de amido incorporadas com óleo essencial de orégano com atividade antimicrobiana;
- Avaliar o óleo essencial de orégano quanto a sua composição química e atividade antimicrobiana;
- Caracterizar as nanofibras com óleo essencial de orégano quanto a sua morfologia, estabilidade térmica e atividade antimicrobiana;
- Aplicar as nanofibras de amido com óleo essencial de orégano, na forma de sachês, em embalagem ativa de alimentos;
- Avaliar a efetividade como agente antimicrobiano das nanofibras com óleo essencial na elaboração de embalagem ativa para alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Embalagens de alimentos

Os alimentos são acondicionados em embalagens visando prolongar sua vida útil, protegendo o alimento contra perdas na comercialização e transporte, evitando contaminações e riscos ambientais durante a distribuição. Além de conservar, a embalagem tem a função de identificar, atrair e instruir o consumidor. Uma embalagem ideal deve ser atóxica, proteger o alimento contra perdas de massa pela transpiração e reduzir as trocas gasosas com o meio. Além disso, deve ser resistente a impactos físicos, viável economicamente, adequada ao produto e ser ambientalmente correta (EVANGELISTA, 2008; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

A utilização de polímeros na produção de embalagens aumentou consideravelmente nos últimos anos, chegando a milhões de toneladas, devido ao crescimento da indústria petroquímica que gera grande parte da matéria-prima para sua produção. Assim, a necessidade de aprimorar cada vez mais as embalagens, aliada a preocupação com o impacto ambiental, gera o desenvolvimento de novas

tecnologias de fabricação, desde a formulação até a aplicação a que se destinam (FELLOWS, 2006; HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

Dentre as inovações em embalagens que podem ser produzidas a partir de materiais poliméricos, sintéticos ou naturais, estão as embalagens ativas, as quais interagem de maneira intencional com o alimento prolongando sua vida útil e mantendo sua qualidade (ALMEIDA et al., 2015; DONSI; FERRARI, 2016; NEO et al., 2013).

2.1.1 Embalagens ativas

Uma embalagem pode ser considerada ativa quando apresentar em sua constituição ou no seu interior um composto bioativo, com o intuito de aprimorar seu desempenho de acordo com a necessidade do alimento acondicionado. Essas embalagens atuam diante de sua interação direta com o alimento ou com o meio, não só na proteção contra elementos externos, mas também como agente antimicrobiano ou antioxidante, absorvedor de oxigênio, etileno, umidade, odores ou sabores, entre outras funcionalidades (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; VEGALUGO; LIM, 2009).

Como apresentam contato direto com o alimento ou o ambiente em que este se encontra, a aceitabilidade de compostos bioativos é restrita a produtos de origem natural, que sejam atóxicos e não produzam aromas e sabores (ADILAH; HANANI, 2016; BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Para avaliar a eficácia do composto contra determinado microrganismo de interesse, devem ser realizados testes, pois sua efetividade pode ser reduzida de acordo com os componentes do alimento. Diante disso, a escolha do alimento a ser embalado deve ser de acordo com os microrganismos que o composto bioativo apresenta efetividade, bem como de sua interação com o alimento e seus componentes (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

As embalagens ativas são cada vez mais visadas e investigadas devido à grande demanda do mercado por alta qualidade e ao desenvolvimento de novos produtos alimentícios, que necessitam de novas tecnologias para conservação e

maior proteção contra microrganismos patogênicos (AL-NAAMANI; DOBRETISOV; DUTTA, 2016; MARINO; BERSANI; COMI, 2001; NEO et al., 2013). Neste contexto, visando solucionar um dos principais problemas da indústria alimentícia, ou seja, a presença de microrganismos contaminantes em alimentos, o uso de óleos essenciais com atividade antimicrobiana é uma alternativa viável e de baixo custo, além de serem provenientes de matérias-primas naturais (CALO et al., 2015; ESPITIA et al., 2012; MARINO; BERSANI; COMI, 2001).

Os óleos essenciais são misturas de substâncias voláteis orgânicas, oriundos de plantas, raízes, flores e pericarpos de frutos cítricos, que podem ser obtidos por destilação e arraste com vapor de água, por extração com maceração, entre outros. Embalagens incorporadas com óleos essenciais com atividade antimicrobiana atuam pela difusão dos compostos voláteis do óleo para o alimento, inibindo a proliferação de microrganismos, os quais alteram o aroma, sabor, cor e textura dos alimentos e consequentemente diminuem a vida útil dos mesmos (REALINI; MARCOS, 2014; VEGA-LUGO; LIM, 2009).

Cada óleo apresenta vários compostos, entre eles, fenólicos, aldeídos, terpenos, cetonas e ácidos que apresentam diferentes ações dificultando que o microrganismo crie resistência, como aos antimicrobianos sintéticos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais vem sendo avaliada frente a diversos microrganismos, como os deteriorantes de alimentos e produtores de toxinas alimentares (ARAUJO; LONGO, 2016; CALO et al., 2015; FORMOLO, 2009; GHABRAIE et al., 2016; MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não foi totalmente descoberto. Acredita-se que ocorra pela penetração nas membranas da bactéria até o interior da célula inibindo suas propriedades funcionais. Sua principal ação é dada pelos compostos fenólicos, como carvacrol, timol e eugenol, que possuem uma rápida e eficiente resposta como antimicrobiano, alterando a permeabilidade da célula, causando danos nas membranas e deterioração da bactéria (CALO et al., 2015; MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

O óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) apresenta em sua composição, variando de 80% a 98%, compostos fenólicos como carvacol e timol. Estes são os principais compostos que atuam na inibição do crescimento microbiano

deteriorantes em alimentos e prejudiciais a saúde do consumidor (ARAUJO; LONGO, 2016; AZEREDO et al., 2011; FRATINI et al., 2017). O óleo de orégano apresenta atividade antimicrobiana frente a diversas bactérias como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, entre outras (BOTRE et al., 2010), podendo ser aplicado a embalagens para acondicionamento de carnes (BOTRE et al., 2010; MARQUES et al., 2015; REALINI; MARCOS, 2014), frutas (ESPITIA et al., 2012) e vegetais (AZEREDO et al., 2011; BARBOSA et al., 2016).

A incorporação do óleo essencial em um material biodegradável (NEO et al., 2013), como nanofibras ou a encapsulação do óleo utilizando material de parede adequado, pode produzir uma nanoestrutura para formação de embalagens ativas pelo uso da nanotecnologia (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). A nanotecnologia apresenta grande potencial na ciência de alimentos, tanto no processamento, segurança e qualidade, como para produção de embalagens alimentícias (HE; HWANG, 2016).

2.2 Nanotecnologia

Na área de embalagens, o uso de nanotecnologia vem crescendo nos últimos anos (HE; HWANG, 2016; LI; CHEN; YANG, 2016) e consiste em métodos para produção de materiais em escala nanométrica que podem ser aplicados em diversos ramos da indústria, que apresentam elevada razão área superficial/volume, sendo o tamanho diretamente relacionado às suas características e propriedades. Geralmente materiais em escala nanométrica apresentam propriedades mecânicas, elétricas e ópticas diferenciadas dos demais materiais (LAURICELLA et al., 2015; PITAKSUTTEEPONG, 2016; SAIDI; ZEISS, 2016; TAN et al., 2016).

A nanotecnologia gera incertezas quando aplicada a embalagens de alimentos, tornando necessários mais estudos referentes a embalagens ativas, por exemplo, relacionados ao mecanismo de liberação dos compostos, ou seja, a migração das partículas nanométricas para o alimento ou o meio, gerando dúvidas sobre a segurança de suas aplicações, tanto para o consumidor quanto para os órgãos de

regulamentação (ALMEIDA et al., 2015). Dentre os materiais produzidos por nanotecnologia encontram-se as nanofibras, que apresentam interesse nos campos da ciência e tecnologia, devido à potencialidade de aplicações de alto desempenho que oferecem (SALLES, 2013).

2.2.1 Nanofibras

As nanofibras são materiais que apresentam diâmetro de até 100 nm, com grande comprimento e área de superfície, bem como uma vasta possibilidade de aplicações. Uma das principais técnicas na produção de nanofibras é a de *Electrospinning* (BABAPOOR; KARIMI; KHORRAM, 2016; BHARDWAJ; KUNDU, 2010; REZAEI; TAVANAI; NASIRPOUR, 2016), a qual possibilita o controle de seu diâmetro, que é considerado um parâmetro crucial para suas propriedades físicas, elétricas, biológicas, mecânicas e ópticas (GÖNEN; EROL TAYGUN; KÜÇÜKBAYRAK, 2016).

As nanofibras produzidas por *Electrospinning*, dependendo da sua composição e dos parâmetros utilizados durante a sua produção, podem apresentar diferentes formas e tamanhos (SALLES, 2013). São geralmente produzidas à temperatura ambiente, o que possibilita a adição de compostos como antioxidantes e antimicrobianos, que são termicamente instáveis (REZAEI; TAVANAI; NASIRPOUR, 2016).

Uma embalagem ativa pode ser elaborada pela introdução de uma nanoestrutura com atividade antimicrobiana, produzida por *Electrospinning*. O composto bioativo pode ser adicionado diretamente na matriz polimérica da solução, para produção das nanofibras. Devido à escala nanométrica e sua grande área de superfície, a incorporação do agente antimicrobiano é promissora na matriz do polímero (WEN et al., 2016b). A maioria dos estudos encontrados utilizam a encapsulação de óleos essenciais como composto bioativo, pela técnica de *Electrospraying* (GÓMEZ-MASCARAQUE; SANCHEZ; LÓPEZ-RUBIO, 2016; KHOSHAKHLAGH et al., 2016; LÓPEZ-RUBIO et al., 2012) e não sua adição direta

na solução polimérica durante o processo de fabricação das nanofibras por *Electrospinning*.

2.3 *Electrospinning*

Electrospinning é uma técnica simples, confiável e versátil, em que são produzidas fibras com diâmetros na ordem de nanômetros ou micrometros. Esta técnica possibilita o controle do diâmetro e da morfologia das fibras, bem como a continuidade no processamento na geração de fibras uniformes e contínuas (FUH et al., 2016; GÖNEN; EROL TAYGUN; KÜÇÜKBAYRAK, 2016; NGUYEN; HWANG; MOON, 2016; ZHANG; TANG; ZHENG, 2016).

Electrospinning, ou eletrofiação do português, deriva de fiação eletrostática e é baseada na geração de um campo elétrico por meio do qual são formadas as nanofibras (SALLES, 2013). O modelo de uma estação de *Electrospinning* é ilustrado na Figura 1 e consiste basicamente em uma fonte de alta voltagem, uma bomba infusora com uma seringa (capilar) e um coletor. O processo ocorre quando uma solução polimérica, contida na seringa, é eletricamente carregada, por alta voltagem, formando um jato que sai da agulha da seringa em direção ao coletor. O campo elétrico é formado por um eletrodo positivo conectado à seringa e um eletrodo negativo conectado ao coletor, assim uma carga é induzida na superfície do fluido. Ao aumentar a intensidade do campo, o fluido sai como filamentos contínuos, pela repulsão das cargas, formando na ponta da agulha uma forma cônica, denominada Cone de Taylor, assim as nanofibras são formadas em função da atração e do transporte da solução polimérica (FUH et al., 2016; KIM et al., 2015; LAURICELLA et al., 2015; SALLES, 2013; YÖRDEM; PAPILA; MENCELOĞLU, 2008).

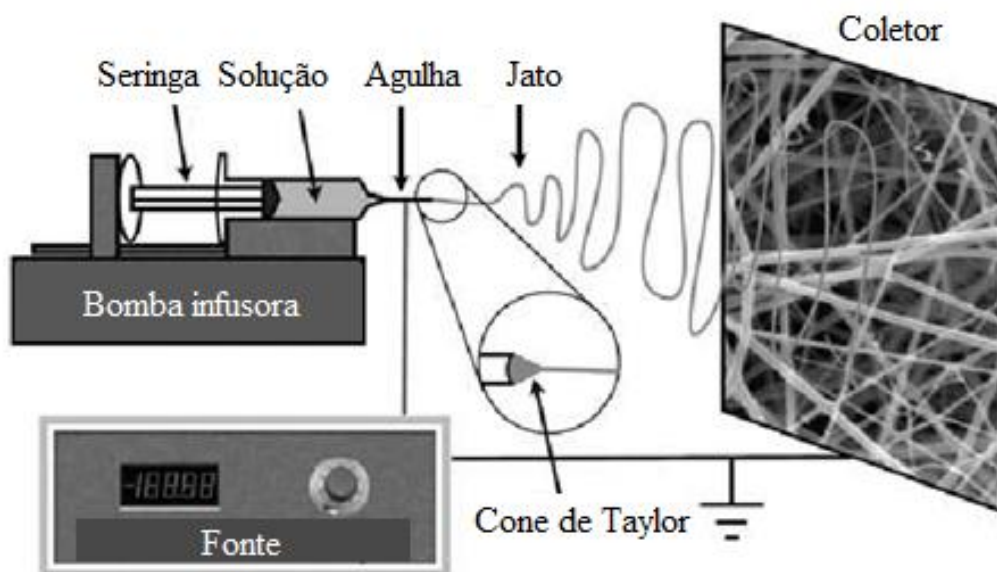


Figura 5 – Modelo de uma estação de *Electrospinning* para a formação de nanofibras.
Fonte: SALLES, 2013, p.2.

Durante o processo são aplicadas forças de cisalhamento nas cadeias poliméricas da solução, solidificando o fluido ao chegar ao coletor. Esse processo é irreversível, uma vez que as nanofibras não voltam mais a forma de equilíbrio. Um fator importante para que ocorra essa formação é a escolha adequada do solvente, o qual evapora e leva a deposição do polímero sólido no coletor na forma de uma rede, onde as nanofibras são orientadas aleatoriamente (KIM; HUBER, 2013; SALLES, 2013; YU et al., 2008).

As características das nanofibras são diretamente relacionadas aos parâmetros da solução polimérica (viscosidade, concentração e condutividade elétrica); aos parâmetros do processo (voltagem, distância do coletor e fluxo de alimentação); e aos parâmetros ambientais (temperatura e umidade relativa). O tipo de polímero utilizado como matéria-prima, bem como seu peso molecular, também interferem diretamente no processamento das nanofibras (GÖNEN; EROL TAYGUN; KÜÇÜKBAYRAK, 2016).

A técnica de *Electrospinning* é bastante difundida em pesquisas na produção de fibras, bem como a técnica de *Electrospraying* na produção de cápsulas. Essas técnicas andam juntas diferindo nos parâmetros utilizados no processamento,

principalmente na voltagem e na concentração da solução polimérica. Seus produtos apresentam vantagens estruturais e funcionais, podendo ser aplicados em diversos ramos da indústria incluindo têxtil, biomédica, produção de filtros, sensores, cosméticos, embalagens, entre outras (BEL HAAJ et al., 2016; GUO et al., 2016; KIM et al., 2015; ZHANG; TANG; ZHENG, 2016).

Quando aplicadas a embalagens ativas, por exemplo, suas vantagens são relacionadas à eficiência da encapsulação, a estabilidade dos compostos bioativos incorporados, bem como a possibilidade de uma liberação controlada destes compostos. Estas técnicas podem ainda ser utilizadas na imobilização de enzimas, por meio de sua adição, ficando aprisionadas às nanofibras, ou ainda sua encapsulação atuando como suporte estrutural para imobilização, podendo ser aplicadas como biossensores ou em embalagens ativas. Ainda na área de alimentos, podem ser elaboradas embalagens comestíveis a partir de filmes de polímeros naturais, ou na produção de filtros pela formação de membranas de nanofibras, utilizadas em processos de alimentos na filtração de líquidos (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

Para produção de nanofibras, podem ser utilizados diversos polímeros sintéticos, que abrangem a maioria das pesquisas realizadas, naturais ou ainda a combinação dos dois. A produção de nanofibras a partir de matérias-primas naturais vem crescendo e possibilitando a exploração de novas matérias-primas a serem usadas para este fim. Diversos polímeros naturais mostraram-se eficientes na produção de nanofibras ou nanocápsulas, como quitosana, proteínas, celulose, colágeno, gelatina, entre outros, sendo escolhidos de acordo com a aplicação a que se deseja destinar (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Ainda estão sendo estudadas matérias-primas para esse fim, como o amido, que encontra-se dentre os materiais com maior disponibilidade em fontes naturais e, além de sua alta disponibilidade, ainda é biocompatível, biodegradável e apresenta grandes possibilidades de modificações e aplicações (BEL HAAJ et al., 2016).

2.4 Amido

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, (Resolução RDC nº 263, 2005) “o amido é o produto amiláceo extraído de partes comestíveis de cereais, tubérculos, raízes ou rizomas”. É um carboidrato encontrado na maioria dos vegetais que fornece de 70 a 80% das calorias que o homem consome. Pode ser oriundo de diversas fontes botânicas, apresentando característica e propriedades distintas, como a forma e o tamanho do grânulo (FRANCO et al., 2010; RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

O grânulo de amido possui estrutura semicristalina com regiões cristalinas e amorfas. É composto por um centro original de crescimento, denominado hilo e ao seu redor por duas macromoléculas, amilose e amilopectina (Figura 2), sendo a região cristalina composta por cadeias de amilopectina e as regiões amorfas por pontos de ramificação e cadeias de amilose. A proporção e a organização física dessas macromoléculas no grânulo influenciam em sua funcionalidade e determinam o comportamento do amido em suas diversas aplicações (ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008).

O teor de amilose influencia nas propriedades, aplicações e na estrutura do amido. Amidos com diferentes teores de amilose podem ser classificados como amioca (waxy) o qual é considerado sem amilose, constituído apenas por amilopectina, amido normal que apresenta de 10 a 25% em teor de amilose, média amilose com 50% (Hylon V) e acima de 50% são considerados de alto teor de amilose, com 70% (Hylon VII) ou 80% (Gelose 80) (QIAO et al., 2016; YANG et al., 2016).

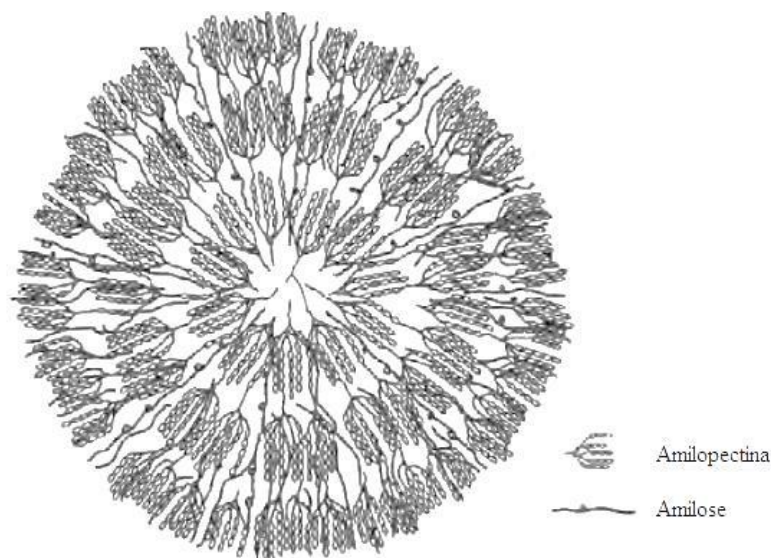


Figura 6 – Representação da organização e estrutura do grânulo de amido.
Fonte: ALMEIDA, 2012, p.32.

A amilose apresenta cadeia linear de tamanho médio, com unidades de α -D-glucopiranosose ligadas por ligações glicosídicas α 1-4 (Figura 3a), já a amilopectina possui cadeia ramificada com unidades de α -D-glucopiranosose unidas por ligações α 1-4 e α 1-6, que conferem ramificações a cadeia, entre um grupo hidroxila e um carbono das cadeias de glicose (Figura 3b) (CHEN et al., 2015).

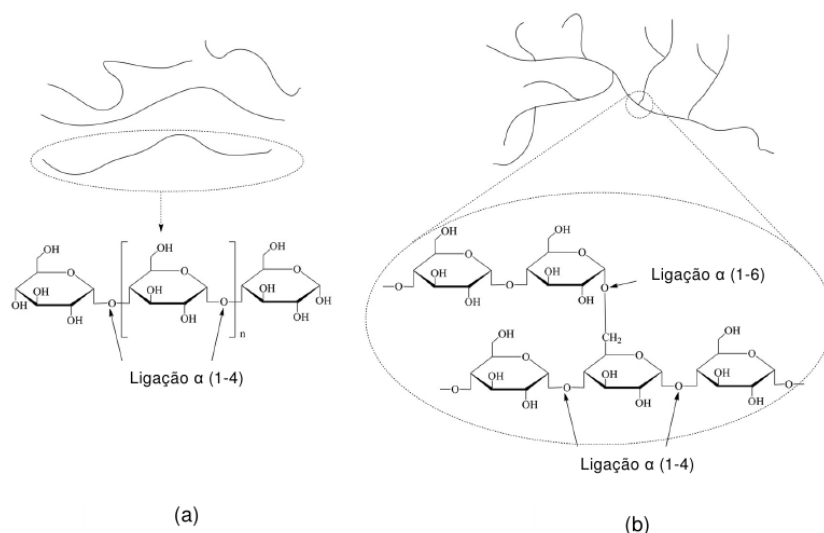


Figura 7 – Estrutura molecular da amilose (a) e amilopectina (b).
Fonte: CHEN et al., (2015), p. 67460.

O grânulo de amido é birrefringente, apresentando alto grau de organização molecular, que pode ser observado pela microscopia com luz polarizada, com a visualização de uma imagem denominada “Cruz de Malta”. A birrefringência e a

cristalinidade do amido dependem das matérias-primas, da proporção de amilose e amilopectina e do grau de ordenamento estrutural dos grânulos (ALMEIDA, 2012; ORDÓÑEZ, 2005).

A utilização industrial do amido vem crescendo e se aperfeiçoando devido à sua diversidade, podendo ser aplicado industrialmente, por exemplo, como espessante ou estabilizante no processamento de alimentos. Esse polissacarídeo também tem sido utilizado na elaboração de embalagens e, (DIAS et al., 2011; SILVA et al., 2006) outra possibilidade de aplicação seria sua utilização na produção de nanofibras.

Apesar de sua ampla utilização, o amido nativo apresenta baixa resistência térmica e instabilidade no processamento e, dependendo da sua aplicação, essas características podem dificultar o seu uso. As propriedades do amido podem ser aprimoradas a partir de sua modificação, o que aumenta sua utilização em aplicações industriais (HALAL et al., 2015; VANIER et al., 2012).

2.4.1 Amido modificado

A modificação do amido acarreta alterações em suas propriedades químicas e físicas aprimorando suas propriedades funcionais. Os processos de modificação podem ser físicos, enzimáticos ou químicos, e também pela combinação de dois ou mais destes processos (ADEBOWALE; AFOLABI; OLU-OWOLABI, 2006; HUANG et al., 2007; HUI et al., 2009; SILVA et al., 2006). O amido possui grande quantidade de hidroxilas, como pode ser visto na Figura 3, o que possibilita sua modificação química por esses sítios ativos (CHEN et al., 2015).

Os amidos modificados quimicamente são produzidos por derivatização com tratamentos de oxidação, acetilação, ligação cruzada, eterificação, esterificação, entre outros. Os métodos de modificação por reação de eterificação ou esterificação são aqueles com uso de um catalizador alcalino tendo como resultado a substituição de unidades de glicoses (UG) por radicais (introduzidos de acordo com a modificação e

o reagente escolhido) expressos em grau de substituição (GS). Neste caso, são introduzidas na amilose cadeias laterais não iônicas, iônicas ou catiônicas. Os amidos catiônicos e aniônicos são aqueles obtidos pela introdução de grupos com cargas positivas e negativas, respectivamente (CHEN et al., 2015; MUCCILLO, 2009).

O amido catiônico pode ser utilizado em diversas aplicações, como na indústria têxtil, alimentícia, de papéis, cosméticos, corantes e ainda flocculantes para tratamento de água (CHAISAWANG; SUPHANTHARIKA, 2005; KUO; LAI, 2007). Essa modificação química ocorre pela reação de eterificação com reagentes contendo cargas positivas por grupos amino, imino e amônio, alterando suas propriedades. O amido catiônico, em relação ao nativo, geralmente apresenta menor temperatura de pasta e maior pico de viscosidade e menor valor de entalpia e temperatura de transição (CHAISAWANG; SUPHANTHARIKA, 2005; CHANG; LAI, 2016; KUO; LAI, 2007; PENG et al., 2016).

Um dos reagentes utilizado para essa modificação é o 3-cloro-2-hidroxipropil trimetil amônio cloreto 3-chloro-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride (CHPTAC), o qual é aprovado pela *Food and Drug Administration* – FDA para uso em alimentos. A Figura 4 ilustra um esquema da reação de cationização, apresentando a incorporação do grupo amônio quaternário (XIE; LIU; CUI, 2005).

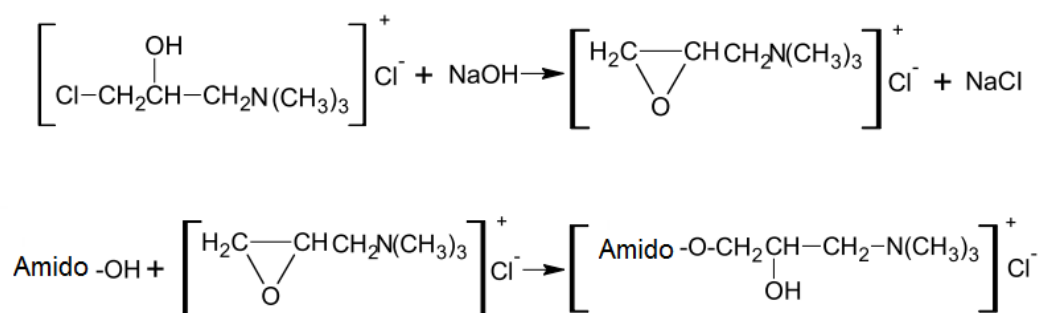


Figura 8 – Esquema da reação de cationização.
Fonte: XIE; LIU; CUI, 2005, p. 24.

Quando aplicada ao amido a cationização apresenta mais de 80% de eficiência, sendo realizada em solução aquosa, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) como reagente, a 50 °C com 4 h de reação. De acordo com o tempo de reação as

propriedades funcionais são alteradas, como a cristalinidade, na qual as intensidades dos picos de difração são reduzidas, com o aumento do GS, bem como ocorrendo alterações na solubilidade e na claridade e estabilidade das pastas (XIE; LIU; CUI, 2005).

Enquanto o amido catiônico é obtido geralmente por um grupo amônio quaternário, os amidos aniônicos são por um grupo carboxil ou fosfato (ČÍŽOVÁ et al., 2016; PENG et al., 2016) e podem ser obtidos pela modificação química de fosfatação, em que são introduzidos grupamentos iônico fosfato na molécula de amido (Figura 5). Para substituição dos grupos hidroxila por esses grupamentos é necessário o controle de condições de processo, como temperatura (entre 120 e 170 °C), tempo de reação (de 1 a 2 horas) e pH. Dentre os reagentes utilizados está o tripolifosfato de sódio (TPF) sendo o GS permitido de 0,01 a 0,15 contendo 1 a 5% de fósforo (CHEN et al., 2015; MUCCILLO, 2009; XIE; LIU; CUI, 2005). Para uso em alimentos o *Codex Alimentarius* preconiza teor de fósforo residual máximo de 0,5%.

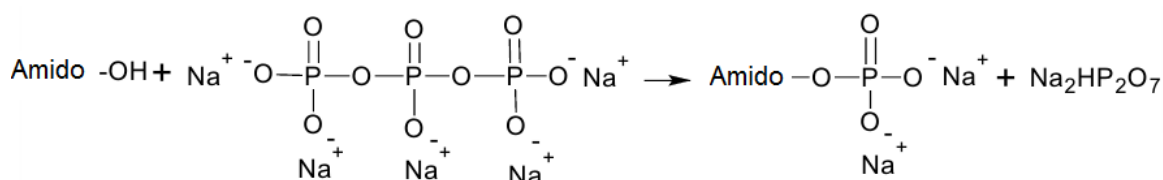


Figura 9 – Esquema da reação de fosfatação monoéster com TPF.
Fonte: XIE; LIU; CUI, 2005, p. 20.

Na obtenção do mono-éster-fostato a reação ocorre pela esterificação de um grupo hidroxila (predominantemente do C-6). Assim, ocorre a eliminação de alguns grupos hidroxila e introdução de radicais carregados negativamente nas cadeias de amilose, que se repelem mantendo-se mais afastadas. Esses amidos são denominados polieletrólitos aniônicos (XIE; LIU; CUI, 2005).

O reagente mais utilizado para obtenção de amido aniônico por fosfatação é o TPF, pois apresenta baixo custo, além disso, é de fácil manuseio e processamento. O uso de TPF produz amidos com boa claridade de pasta e considerável aumento em sua hidratação e solubilidade. O GS de grupos fosfato é determinado pelo tempo e

temperatura de reação, bem como pelo controle do pH e concentração do reagente (BATISTA; MENDES; CONCEI, 2008; LIMBERGER et al., 2008).

Quanto a aplicação, o amido catiônico é bastante aplicado na indústria papelreira como ligante e para melhoria da aderência e resistência de papéis, sendo também utilizados como aglutinante para lavagem de roupas e como floculante para suspensão de matéria inorgânica ou orgânica contendo carga negativa. Já o amido aniônico, ou fosfatado, é utilizado em alimentos como estabilizante de emulsões, em padarias e alimentos que necessitem de maior estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento (XIE; LIU; CUI, 2005).

Como os reagentes utilizados para cationização e fosfatação, estando dentro do teor residual delimitado, são permitidos em contato com alimentos, buscam-se aplicações diferenciadas para esses amidos modificados, relacionadas à área da indústria alimentícia.

2.5 Nanofibras de amido pela técnica de *Electrospinning*

A produção de nanofibras depende da capacidade das cadeias na matriz polimérica de se emaranharem. Em amidos de alta amilose, as moléculas se envolvem uma com a outra e formam um emaranhado mais facilmente. Já em amidos com menores teores de amilose, isso não ocorre com tanta facilidade uma vez que, as moléculas de amilopectina são mais volumosas e não se emaranham o suficiente durante o processo para formação das nanofibras (KONG; ZIEGLER, 2012). Assim, além de o material atuar como isolante (por ser um polímero), com moléculas mais volumosas ocorre maior dificuldade da ação do campo elétrico para formação do Cone de Taylor e, conseqüente, formação do jato que dá origem às nanofibras. Essa problemática pode ser solucionada com a introdução de cargas ao polímero, facilitando a ação do campo elétrico, excitação dos elétrons presentes na matriz polimérica e formação do emaranhado. Estas cargas podem ser introduzidas pela modificação química do amido por cationização ou fosfatação, como visto na Seção 2.4.1.

Não são encontrados estudos que utilizem amido de médio teor de amilose ou ainda de amido modificado como matéria-prima para produção de nanofibras. Existem poucos estudos com a produção de micro ou nanofibras de amido, bem como de amido combinado a outros polímeros. Kong; Ziegler, (2012) avaliaram as propriedades reológicas da solução de amido de alta amilose, Gelose 80, em diferentes concentrações de amido e do solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Avaliaram também, a capacidade dessas soluções de formar fibras pela técnica de *Electrospinning*, utilizando uma configuração modificada da técnica, denominada *Electro-wet-spinning*, e obtiveram microfibras de amido Gelose 80. Ainda no mesmo estudo, os autores avaliaram a capacidade de formação de fibras dos amidos Hylon VII, Hylon V, Melojel e Amioca e de feijão mungo, e relatam a obtenção de microfibras somente de amido Hylon VII, sendo que com o Melojel e Amioca não obtiveram fibras. Já os amidos Hylon V e de feijão mungo (que é constituído de 15 a 35% de amilose) apresentaram fraca habilidade de formar fibras.

Os mesmos autores publicaram um estudo com a caracterização de nanofibras de amido Gelose 80 com a melhor concentração de amido e DMSO do estudo anteriormente citado (KONG; ZIEGLER, 2014) e relataram a produção de microfibras uniformes e com contínuas. Kong; Ziegler, (2013) utilizaram amido Hylon VII como matéria-prima, realizaram uma variação dos parâmetros do *Electrospinning* (fluxo de alimentação, distância do coletor, voltagem e concentração do polímero na solução) e avaliaram sua influência no diâmetro das fibras, que variou significativamente de $3,35 \times 10^3$ à $22,35 \times 10^3$ nm.

Lancuški et al., (2015) produziram nanofibras de amido de alta amilose, Hylon VII, utilizando ácido fórmico como solvente, em diferentes concentrações. A redução na concentração do solvente acarretou em fibras com diâmetros menores, variando de 84 à 304 nm, o que sugere grande influência da água na solução e formação de fibras com diâmetros menores 100 nm (consideradas nanofibras).

O amido pode ser ainda combinado com outro polímero sintético, formando um compósito, já sendo encontrados estudos de amido de mandioca com poliácido láctico – PLA ou poli (óxido de etileno) – PEO (SUNTHORNVARABHAS et al., 2011, 2014).

No processo de *Electrospinning*, a formação das nanofibras ocorre pela evaporação do solvente, sendo de grande importância a escolha apropriada do mesmo, para dissolver a amostra e promover o emaranhamento das cadeias poliméricas (KONG; ZIEGLER, 2012). Já foi testada em estudos, a formação fibras de amido utilizando como solvente água, DMSO e ácido fórmico.

As nanofibras de amido podem ser aplicadas em materiais naturais e biodegradáveis, ou seja, como substituintes dos derivados do petróleo, uma vez que sua composição é inteiramente de amido, (KONG; ZIEGLER, 2014) sendo ambientalmente correto seu uso em embalagens, por exemplo.

3 Capítulo 1 – Elaboração de nanofibras de amido de médio e alto teor de amilose nativos e modificados quimicamente

3.1 INTRODUÇÃO

Electrospinning é uma técnica utilizada para a produção de fibras ultrafinas, com diâmetros de micrômetros a nanômetros. Utiliza a força eletrostática para transformar uma solução polimérica em uma rede de fibras, que podem ser utilizadas para inúmeras aplicações (VEGA-LUGO; LIM, 2008). As nanofibras são provenientes de soluções poliméricas, e as mais estudadas geralmente são obtidas a partir de polímeros sintéticos. Contudo, o uso de matérias-primas biodegradáveis e biocompatíveis para produção de nanofibras vêm crescendo cada vez mais, devido à busca por materiais que não prejudiquem o meio ambiente. Além disso, as nanofibras de polímeros naturais apresentam propriedades tão boas quanto àquelas produzidas a partir de polímeros sintéticos (KONG; ZIEGLER, 2012; LUBASOVA; MULLEROVA; NETRAVALI, 2015).

Existem estudos sobre a formação de nanofibras, por *Electrospinning*, utilizando como matéria-prima a proteína de soja (VEGA-LUGO; LIM, 2009, 2012; XU et al., 2012), a zeína (FERNANDEZ; TORRES-GINER; LAGARON, 2009), a quitosana (HOMAYONI; RAVANDI; VALIZADEH, 2009; KRIEGEL et al., 2009), e o amido de alta amilose (KONG; ZIEGLER, 2012, 2014; LANCUŠKI et al., 2015; WANG et al., 2016).

Também são encontrados na literatura estudos que combinem a utilização desses polímeros naturais com polímeros sintéticos, utilizando PEO, PVA ou PLA (CÁRDENAS et al., 2016; SUNTHORNVARABHAS et al., 2011, 2014; TANG et al., 2015). Entretanto, não existem pesquisas com a produção de nanofibras a partir de amido de milho de médio teor de amilose, ou como polímero único na solução, bem como de amido modificado.

A técnica de *Electrospinning* utiliza a geração de um campo elétrico para a formação das nanofibras, o que torna de grande importância a condutividade elétrica da solução polimérica (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Assim, para melhorar essa propriedade, pode-se fazer uso da modificação química para obtenção de um polímero com cargas negativas (aniônico) ou positivas (catiônico) (CHEN et al., 2015; PENG et al., 2016), alterando as propriedades do amido e tornando-o próprio para esse tipo de aplicação pela obtenção de uma nova matéria-prima com características adequadas para formação de nanofibras de amido pela técnica de *Electrospinning*.

Portanto, objetiva-se com o trabalho produzir nanofibras, pela técnica de *Electrospinning*, de amido de milho de médio e alto teor de amilose, nativos e modificados quimicamente.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

O amido de milho de médio teor de amilose (Hylon V – 50% de amilose) foi adquirido do acervo do Laboratório de Grãos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas. O amido de alto teor de amilose (Hylon VII – 70% de amilose) foi doado pela empresa Ingredion (São Paulo, SP – Brasil).

Para obtenção dos amidos aniônico e catiônico foram utilizados o 3-cloro-2-hidroxipropil trimetil amônio cloreto 3-chloro-2-hydroxypropyl trimethylammonium chloride (CHPTAC – SIGMA, Brasil) e o tripolifosfato de sódio (TPF – $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ –

Synth, Brasil), respectivamente. O Dimetilsulfóxido (DMSO – $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) P.A. com 99% de pureza (Synth, Brasil), como solvente na produção das nanofibras.

3.2.2 Delineamento Experimental I – Obtenção dos amidos modificados

O experimento constará de seis tratamentos em três repetições. Os tratamentos serão provenientes de dois amidos com diferentes teores de amilose e dois tipos de modificação, mais dois controles (amidos de médio e alto teor de amilose sem modificação) distribuídos de acordo com o delineamento inteiramente casualizado conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Delineamento experimental para obtenção dos amidos.

Variáveis independentes			Variáveis dependentes
Tratamento	Teor amilose	Modificação	
1	Médio	Nativo	Propriedades de pasta
2		Catiônico	Textura de gel
3		Aniônico	Cristalinidade relativa
4	Alto	Nativo	Grupos funcionais
5		Catiônico	Morfologia
6		Aniônico	Propriedades térmicas

3.2.2.1 Obtenção dos amidos catiônicos

O amido de milho catiônico será obtido de acordo com Kuo; Lai (2007), com modificações. O amido (90 g em base seca) será suspenso em 100 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,001 M e misturado com 297,1 g de 3-chloro-2-hydroxypropyl trimethylammonium chloride (CHPTAC) (com pH ajustado para 12 com NaOH 0,5 M). A solução terá pH ajustado para 11 com NaOH 0,5 M, diluída com 600 mL NaOH 0,001 M e a reação ocorrerá a 40 °C com agitação contínua (200 rpm). Após, será diluída em etanol 95% com volume igual ao da mistura e será centrifugada a 2300 rpm por 10 minutos. O precipitado será coletado e suspenso em etanol 63% (300 mL) e

neutralizado com ácido clorídrico (HCl 0,5 M). O amido catiônico será lavado sucessivas vezes com etanol 63%, até ficar livre de cloretos. Por fim, será seco em estufa a 40 °C por 12 h e o conteúdo de nitrogênio determinado pelo método de Kjeldahl da AACC, (2000). O grau de substituição (GS) será calculado conforme Equação 1, onde GS é o grau de substituição e %N₂ a porcentagem de nitrogênio.

$$GS (\%) = \frac{(162,15 \times \%N_2)}{1401 - (154,64 \times \%N_2)} \quad (1)$$

3.2.2.2 Obtenção dos amidos aniônicos

A obtenção do amido aniônico será realizada conforme Chaisawang; Supphantharika (2006), com modificações. O tripolifosfato de sódio – TPF (1,49 g) será dissolvido em água destilada (pH ajustado para 5,9). O amido (100 g em base seca) será misturado na solução de TPF sob agitação contínua durante 1 h, a temperatura ambiente, e logo será centrifugado por 4 minutos e seco em estufa com circulação de ar quente, a 40 °C por 24 h. Para efetiva fosfatação, o amido será aquecido por 2 h a 130 °C e após o arrefecimento até temperatura ambiente, será lavado inúmeras vezes por suspensão em água destilada e sua recuperação realizada por centrifugação a 2300 rpm durante 4 min. Por fim, o amido será seco a 40 °C em estufa com circulação de ar quente por 24 h e moído com moinho analítico.

3.2.2.3 Teor de fósforo e grau de substituição dos amidos aniônicos

O teor de fósforo será determinado conforme Smith; Caruso (1964). Para a curva padrão serão pesados 0,439 g de potássio fosfato monobásico anidro diluído em um litro de água destilada. Em seguida, alíquotas de 5, 10, 15, 20 e 25 mL da solução de fosfato contendo 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mg de fósforo, serão pipetadas em balão volumétrico de 100 mL, enquanto 25 mL de água destilada será adicionada em outro balão (branco). Logo, será adicionado 10 mL de ácido nítrico 29%, 10 mL de vanadato de amônio 0,25% e 10 mL de molibdato de amônio 5%,

diluindo-se com água destilada. Após 10 min será realizada a leitura em espectrofotômetro a 460 nm. A curva de calibração será obtida pela plotagem da absorbância *versus* o teor de fósforo (mg/100mL).

Para a análise das amostras, serão pesados em cadinhos 2,5 g de amostra em base seca, adicionando 2,5 mL de acetato de zinco 10%, colocados até evaporação em chapa quente e logo levados à mufla a 550 °C por 2 h. Após, serão adicionados 0,75 mL de ácido nítrico 29% e novamente a amostra será evaporada em chapa quente e levada à mufla por mais 1 h. Em seguida, será adicionado 2,5 mL de ácido nítrico 29% e 3,75 mL de água destilada e aquecidas em banho-maria (a 100 °C) por 10 min. O conteúdo do cadinho será filtrado em papel *Whatman* diretamente em balão volumétrico de 50 mL completando-se em seguida o volume do balão com água destilada. Para a leitura, será preparado um balão contendo 25 mL da amostra filtrada, 10 mL de ácido nítrico 29%, 10 mL de vanadato de amônio 0,25% e 10 mL de molibdato de amônio 5%, completando-se o volume para 100 mL. Após 10 min será realizada leitura em espectrofotômetro a 460 nm.

O grau de substituição dos amidos aniônicos será determinado conforme Equação 2, sendo *GS* o grau de substituição e *P* o teor de fósforo.

$$GS (\%) = \frac{(162 \times P)}{(3100 - 124 \times P)} \quad (2)$$

3.2.2.4 Propriedades de pasta e textura de gel

As propriedades de pasta e textura de gel serão determinadas de acordo com Vanier et al. (2012). As propriedades de pasta dos amidos serão avaliadas pelo Analisador Rápido de Viscosidade (RVA – *Rapid Visco Analyser*, modelo RVA-4, Newport Scientific, Austrália) utilizando o perfil *Standard Analysis 1*. Uma amostra de aproximadamente 3,0 g de amido será corrigida para 14% de umidade e aquecida a 50 °C por 1 min e, posteriormente, a 95 °C por 3,5 min, sendo mantidas a esta temperatura durante 2,5 min. A seguir, serão resfriadas para 50 °C por 4 min e mantidas a 50 °C por 1 min. A velocidade de rotação será de 960 rpm durante 10 s e então mantida a 160 rpm durante o restante do processo. Os parâmetros avaliados

serão: temperatura de início de formação de pasta, viscosidade máxima, quebra da viscosidade, viscosidade final e capacidade de retrogradação.

Para avaliação do perfil de textura de gel a mistura gelatinizada, após análise em RVA, será selada com parafilme para prevenir a perda de umidade e armazenada em temperatura ambiente durante 24 h para formação de um gel. O perfil será avaliado em Texturômetro (TA.XTplus, Stable Micro Systems) com *probe* cilíndrico de aço inoxidável (P/20, diâmetro de 20 mm), no qual os géis serão perfurados a 1,0 mm/s até uma distância de 10,0 mm. Serão avaliados os parâmetros de:

- Dureza: expressa pela força máxima para comprimir a amostra na primeira compressão;
- Flexibilidade: medida pela altura que a amostra recupera durante o tempo que decorre entre o final da primeira compressão e o início da segunda;
- Adesividade: área do pico negativo formado quando o êmbolo é puxado da amostra;
- Coesividade: calculada como a razão entre a área do segundo pico pela área do primeiro pico;
- Gomosidade: obtida pela multiplicação da dureza pela coesividade.

3.2.2.5 Cristalinidade relativa

A análise cristalográfica será realizada a temperatura ambiente no Difratômetro de raios-X (DRX), operando com radiação cobre $K\alpha$, voltagem de 40 kV e corrente de 20 mA. As análises serão feitas com varredura angular em 2θ de 3 à 80°, 0,02° por ponto, com taxa de 2 segundos por ponto. A cristalinidade relativa (CR) será determinada pela Equação 3.

$$CR (\%) = \frac{A_c}{A_a + A_c} \times 100 \quad (3)$$

Onde A_a é a área da região amorfa e A_c a área da região cristalina.

3.2.2.6 Grupos funcionais

Os grupos funcionais dos amidos serão identificados pela técnica de Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR – *Fourier Transform Infrared*). Os espectros serão obtidos com a utilização de um espectrofotômetro com transformada de Fourier na região de 4000-400 cm^{-1} , sendo recolhidas 30 leituras com resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.2.7 Morfologia

As micrografias serão avaliadas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL, JSM 6010LV (Japão) com sonda de dispersão de energia de raios-X (EDS) acoplada, no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul – FURG (CEME – SUL). As amostras serão revestidas com ouro em metalizador e examinadas pelo MEV, sendo as imagens capturadas em diferentes ampliações.

3.2.2.8 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos serão avaliadas utilizando um calorímetro diferencial de varredura (DSC – *Differential scanning calorimetry*, TA– 60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). Serão pesados aproximadamente 2,5 mg da amostra em cadinhos de alumínio e adicionado água destilada (1:3 m/m), estes serão hermeticamente fechados e deixados por uma hora para estabilizar. Os cadinhos contendo as amostras serão aquecidos, juntamente com um cadinho vazio como referência, sob atmosfera de nitrogênio de 30 a 120 °C com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Serão determinados os seguintes parâmetros: temperatura inicial de gelatinização (T_0), temperatura de pico (T_p), temperatura final de gelatinização (T_f) e entalpia de gelatinização (ΔH). A faixa de temperatura de gelatinização será calculada pela diferença entre T_f e T_0 (BIDUSKI et al., 2017).

3.2.3 Delineamento Experimental II - Produção de nanofibras a partir de amido de médio e alto teor de amilose, nativos e modificados.

O experimento será realizado nos laboratórios do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade de Guelph, em Guelph, Ontário, Canadá. O experimento constará de seis tratamentos em três repetições que serão provenientes de seis polímeros naturais, distribuídos conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Delineamento experimental para produção e caracterização de nanofibras a partir de amido.

Variáveis Independentes		Variáveis dependentes
Tratamento	Polímero	
		Avaliação da solução polimérica
1	Amido de média amilose nativo	Viscosidade
2	Amido de média amilose catiônico	Condutividade elétrica
3	Amido de média amilose aniônico	Avaliação das Nanofibras
4	Amido de alta amilose nativo	Morfologia
5	Amido de alta amilose catiônico	Diâmetro
6	Amido de alta amilose aniônico	Cristalinidade relativa
		Grupos funcionais
		Estabilidade térmica

3.2.3.1 Elaboração de nanofibras pela técnica de *Electrospinning*

As soluções poliméricas serão preparadas através da dissolução do amido em solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO), com concentração a ser definida, sob aquecimento e com agitação constante. Para ambos os amidos (médio e alto teor de

amilose) o aquecimento será a 70 °C, no entanto, o tempo de reação será diferente para cada amido, sendo de 35 min e 60 min para o amido de médio e alto teor de amilose, respectivamente. As nanofibras serão formadas por *Electrospinning*, com uma fonte de alta tensão (5 – 50 kV) e baixa corrente (0,5 – 1 μ A) contínua como eletrodo positivo, acoplado diretamente na agulha metálica da seringa de 1 mL contendo a amostra e posicionada em uma bomba infusora. O eletrodo negativo será acoplado ao alvo metálico que coleta as amostras.

Os parâmetros de processamento como taxa de fluxo de alimentação, distância do alvo, concentração da solução polimérica e voltagem serão pré-definidos em testes preliminares, onde serão variados de maneira aleatória, sendo fixados após a obtenção de nanofibras uniformes e contínuas.

3.2.3.2 Viscosidade e condutividade elétrica da solução polimérica

A determinação da viscosidade e condutividade elétrica das soluções será realizada em triplicata. A viscosidade será determinada com a utilização de um viscosímetro e a condutividade com um condutivímetro, ambas a temperatura ambiente.

3.2.3.3 Morfologia e diâmetro das nanofibras

Para avaliação da morfologia as nanofibras serão revestidas com ouro em metalizador e avaliadas por MEV. O diâmetro médio das nanofibras será medido em cinco imagens do MEV da mesma amostra, em 50 diferentes seguimentos medidos aleatoriamente.

3.2.3.3 Cristalinidade relativa

A análise cristalográfica será realizada de acordo com Kong; ziegler (2014) a temperatura ambiente no DRX, operando com radiação cobre $K\alpha$, voltagem de 40 kV e corrente de 20 mA. As análises serão feitas com varredura angular em 2θ de 4 à

30°, 0,02° por ponto, com taxa de 1 segundo por ponto. A cristalinidade relativa (CR) será determinada pela Equação 3 apresentada na Seção 3.2.2.5.

3.2.3.4 Grupos funcionais

A determinação dos grupos funcionais será realizada para avaliar a mudança estrutural dos amidos após a modificação química, bem como das nanofibras de amidos nativos e modificados. A técnica de FTIR será utilizada para obtenção dos espectros, com a utilização de um espectrofotômetro com transformada de Fourier na região de 4000-500 cm^{-1} , sendo recolhidas 30 leituras com resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.3.5 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das nanofibras será avaliada utilizando-se um analisador termogravimétrico. As amostras serão aquecidas em cápsulas de platina de 30 a 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ com fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹, sendo uma cápsula vazia utilizada como referência. Serão obtidas as temperaturas inicial e final de decomposição e a perda de massa.

3.2.3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos serão analisados utilizando o programa *Statistica* 7.0 (Statsoft, USA), será feita análise de variância (ANOVA), e teste de comparação de médias (*Tukey*).

4 Capítulo 2 – Elaboração de embalagens ativas a partir de nanofibras de amido incorporadas com óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

4.1 INTRODUÇÃO

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais oriundos de plantas e especiarias já foi verificada, podendo ser aplicados para conservação de alimentos por serem atóxicos e de origem natural. Um dos óleos essenciais que podem ser utilizados para este fim é o óleo de orégano (*Origanum vulgare*), que apresenta dentre seus constituintes compostos fenólicos, como carvacrol e timol (ARAUJO; LONGO, 2016; LAMBERT et al., 2001). Estes compostos se acumulam sobre a membrana celular de bactérias resultando no aumento de cerca de 90% da permeabilidade celular do microrganismo, impedindo seu desenvolvimento e causando desidratação nas células bacterianas (ARAUJO; LONGO, 2016; FORMOLO, 2009). Assim, sua utilização em embalagem ativa como agente antimicrobiano pode ser efetiva na inibição de microrganismos deteriorantes de alimentos causadores de infecções e intoxicações alimentares (ARAUJO; LONGO, 2016). As embalagens ativas objetivam prolongar a vida útil de produtos alimentícios, como técnica de conservação de alimentos, mantendo também seu valor nutricional e sensorial (WEN et al., 2016a).

Novas técnicas para elaboração de materiais destinados a produção de embalagens ativas vem sendo estudadas, sendo o uso da nanotecnologia com grande desenvolvimento nessa área. A técnica de *Electrospinning* é promissora para esse fim, na produção de materiais poliméricos (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014) e na fabricação de nanofibras, nas quais podem ser incorporados compostos bioativos, como óleos essenciais, diretamente na solução polimérica ou pela técnica de *Electrospraying*, formando nanocápsulas. A incorporação de óleo essencial na nanofibra é efetiva devido a escala nanométrica e a grande área de superfície da mesma, o que propicia efetiva liberação do composto bioativo ao longo do tempo, agindo como antimicrobiano (WEN et al., 2016b). Não foram encontrados estudos que utilizem o *Electrospinning* para produção de nanofibras de amido de milho com diferentes teores de amilose, incorporadas com óleo essencial de orégano. Com isso, objetivasse produzir nanofibras de amido de médio e alto teor de amilose,

incorporadas de óleo essencial de orégano e sua aplicação na elaboração de embalagem ativa para alimentos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

O amido de milho de médio teor de amilose (Hylon V – 50% de amilose) foi adquirido no acervo do Laboratório de Grãos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da UFPel. O amido de alto teor de amilose (Hylon VII – 70% de amilose) foi doado pela empresa Ingredion (São Paulo, SP – Brasil). O óleo de orégano será adquirido comercialmente. Os experimentos serão realizados nos Laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Agroindustrial.

4.2.2 Delineamento Experimental III - Elaboração de nanofibras de amido incorporadas com óleo essencial de orégano

O experimento será realizado com quatro tratamentos em três repetições. Os tratamentos serão provenientes da combinação de dois amidos com diferentes teores de amilose e duas concentrações de óleo de orégano, distribuídos de acordo com o delineamento apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Delineamento experimental para elaboração de nanofibras de amido incorporadas com óleo essencial de orégano.

Variáveis independentes			Variáveis dependentes
Tratamento	Polímero	Óleo de orégano ^a	
			Avaliação da solução polimérica
1	Média		Viscosidade
	amilose		Condutividade elétrica
2			
			Avaliação do óleo de orégano
3	Alta		Composição química
	amilose		CMI ^b
4			CBM ^c
			Atividade antimicrobiana
			Avaliação das nanofibras
			Morfologia
			Diâmetro
			Estabilidade térmica
			Atividade antimicrobiana

^a A concentração do óleo essencial de orégano será determinada por meio de testes preliminares.

^b Concentração Mínima Inibitória.

^c Concentração Bactericida Mínima.

4.2.3 Elaboração de nanofibras pela técnica de *Electrospinning*

As soluções poliméricas serão preparadas dissolvendo o amido em solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO), com concentração a ser definida, sob aquecimento e com agitação constante a 70 °C por 60 min para o amido com alto teor de amilose e a 70 °C por 35 min para o amido com médio teor de amilose. O óleo de orégano será adicionado à solução em concentração a ser definida, e esta será agitada por 1 h a temperatura ambiente.

As nanofibras serão formadas por *Electrospinning*, com uma fonte de alta tensão (5 – 50kV) e baixa corrente (0,5 – 1 μ A) contínua com eletrodo positivo, acoplado diretamente na agulha metálica da seringa de 1 mL contendo a amostra e posicionada em uma bomba infusora. O eletrodo negativo será acoplado ao alvo metálico que coleta as amostras.

4.2.4 Viscosidade e condutividade elétrica da solução polimérica

A viscosidade e condutividade elétrica serão determinadas a partir de medições para cada solução. A viscosidade será determinada com a utilização de um viscosímetro e a condutividade com o condutivímetro, ambas a temperatura ambiente.

4.2.5 Composição química do óleo essencial

A composição química do óleo essencial de orégano será determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas.

4.2.6 Concentração Mínima Inibitória (CMI) do óleo essencial

A CMI do óleo essencial será avaliada em ensaio de micro-diluição em placa. O óleo será diluído em *Brain Heart Infusion broth* (BHI; Oxoid, Basingstoke, UK) com adição de *Tween* 80 (Vetec), em concentração definida da bactéria inoculada. As placas serão incubadas a 37 °C por 24 h, e sua turbidez será avaliada com espectrofotômetro a 625 nm. A CMI será obtida pela menor concentração de crescimento em cada célula. O controle negativo será feito com o óleo em BHI sem a bactéria inoculada e o positivo com a bactéria e sem a presença do óleo.

4.2.7 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM do óleo essencial será estimada, sendo as amostras inoculadas de acordo com a CMI. Será definida como a concentração mais baixa na ocorrência de crescimento no meio após incubação por 24 h a 37 °C.

4.2.8 Atividade antimicrobiana do óleo essencial

Ensaio de atividade antimicrobiana do óleo essencial serão realizados pela técnica de micro-atmosfera diante de bactérias patogênicas deteriorantes de alimentos. Será expressa de acordo com a redução percentual de contagem de UFC após o tratamento com o óleo essencial.

4.2.9 Morfologia e diâmetro das nanofibras

Para avaliação da morfologia as nanofibras serão revestidas com ouro em metalizador e avaliadas por MEV. O diâmetro médio das nanofibras será medido em cinco imagens do MEV da mesma amostra, em 50 diferentes seguimentos medidos aleatoriamente.

4.2.10 Estabilidade térmica das nanofibras

A estabilidade térmica das nanofibras será avaliada utilizando-se um analisador termogravimétrico. As amostras serão aquecidas em cápsulas de platina de 30 a 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ com fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹, sendo uma cápsula vazia utilizada como referência. Serão obtidas as temperaturas de decomposição inicial e final, e também a perda de massa.

4.2.11 Atividade antimicrobiana das nanofibras

A metodologia para determinação da atividade antimicrobiana das nanofibras, bem como os microrganismos a serem testados, serão determinados de acordo com a aplicação da embalagem ativa.

4.2.12 Aplicação das nanofibras com óleo essencial de orégano em embalagem ativa

- As nanofibras incorporadas com óleo essencial de orégano serão aplicadas na forma de sachês na produção de embalagem ativa para alimentos, sendo o alimento e o tipo de embalagem escolhidos de acordo com os testes de atividade antimicrobiana do óleo;
- Será testada a efetividade do óleo essencial como agente antimicrobiano frente a bactérias presentes no alimento embalado;

4.2.13 Análise estatística

Os resultados obtidos serão analisados utilizando o programa *Statistica* 7.0 (Statsoft, USA), será feita análise de variância (ANOVA), e teste de comparação de médias (Tukey).

5 REFERÊNCIAS

AACC. **Approved methods of the AACC**, 10th ed. Method 46-11A, 08-01, 30-20 and 46-12. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 2000.

ADEBOWALE, K. O.; AFOLABI, T. A.; OLU-OWOLABI, B. I. Functional, physicochemical and retrogradation properties of sword bean (*Canavalia gladiata*) acetylated and oxidized starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 93–101, 2006.

ADILAH, Z. A. M.; HANANI, Z. A. N. Active packaging of fish gelatin films with *Morinda citrifolia* oil. **Food Bioscience**, v. 16, p. 66–71, 2016.

ALMEIDA, A. C. S.; FRANCO, E. A. N.; PEIXOTO, F. M.; PESSANHA K. L. F.; MELO N. R. Application of nanotechnology in food packaging. **Polímeros**, v. 25, p. 89–97, 2015.

ALMEIDA, E. C. **Amido modificado de Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott): Propriedades Funcionais**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

AL-NAAMANI, L.; DOBRETISOV, S.; DUTTA, J. Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 38, p. 231–237, 2016.

ARAUJO, M. M.; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Pharmacology**, v. 83, p. 1–7, 2016.

AZEREDO, G. A.; SAMFORD, T. L. M.; NUNES, P. C.; GOMES, N. J.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUZA, E. L. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541–1548, 2011.

BABAPOOR, A.; KARIMI, G.; KHORRAM, M. Fabrication and characterization of nanofiber-nanoparticle-composites with phase change materials by electrospinning. **Applied Thermal Engineering**, v. 16, p. 359- 431, 2016.

BARBOSA, I. M.; MEDEIROS, J. A. C.; OLIVEIRA, K. Á. R.; GOMES, N. J.; TAVARES, J. F.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables. **Food Control**, v. 59, p. 468–477, 2016.

BATISTA, W. P.; MENDES, C. E.; CONCEI, M. Propriedades químicas e de pasta dos amidos de trigo e milho fosforilados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 88-93, 2008.

BEL HAAJ, S.; THIELEMANS, W.; MAGNIN A.; BOUFI, S. Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: A comparative study. **Carbohydrate polymers**, v. 143, p. 310–7, 2016.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology advances**, v. 28, p. 325–47, 2010.

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

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

BOTRE, D. A; SOARES, N. D. F. F.; ESPITIA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, v. 57, p. 283–291, 2010.

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

CÁRDENAS, W.; GÓMEZ-PACHON, E. Y.; MUÑOZ, E.; VERA-GRAZIANO, R. Preparation of potato starch microfibrers obtained by electro wet spinning. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 138, p. 012001, 2016.

CHAI SAWANG, M.; SUPHANTHARIKA, M. Effects of guar gum and xanthan gum additions on physical and rheological properties of cationic tapioca starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 288–295, 2005.

CHAI SAWANG, M.; SUPHANTHARIKA, M. Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 641–649, 2006.

CHANG, S.-Y.; LAI, H.-M. Effect of trisodium citrate on swelling property and structure of cationic starch thin film. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 254–265, 2016.

CHEN, Q.; WANG, H. Yu, L.; UL ABDIN, Z.; CHEN, Y.; WANG, J.; ZHOU, W.; YANG, X.; KHAN, R. U.; ZHANG, H. CHEN, X. Recent progress in chemical modification of starch and its applications. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 67459–67474, 2015.

ČÍŽOVÁ, A.; NEŠČÁKOVÁ Z.; MALOVÍKOVÁ, A.; BYSTRICKÝ, S. Preparation and characterization of cationic and amphoteric mannans from *Candida albicans*. **Carbohydrate polymers**, v. 149, p. 1–7, 2016.

DAUDT, R. M.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; CLADERA-OLIVERA, F.; THYS, R. C. S.; MARCZAK, L. D. F. Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 420–429, 2014.

DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R.; ELIAS, M. C.; HELBIG, E.; SILVA, D. O.; CIACCO, C. F. Pasting, expansion and textural properties of fermented cassava starch oxidised with sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 268–275, 2011.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of biotechnology**, v. 233, p. 106–20, 2016.

ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; BOTTI, L. C. M.; MELO, N. R.; PEREIRA, O. L. SILVA, W. A. Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 307–316, 2012.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, p. 456–571, 2008.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e práticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 473–519, 2006.

FERNANDEZ, A.; TORRES-GINER, S.; LAGARON, J. M. Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1427–1432, 2009.

FORMOLO, F. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de distintos quimiotipos de lippia alba (mill).n.e.brown**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2009.

FRANCO, C. M. L.; OGAWA, C.; RABACHINI, T.; ROCHA, T. S.; CEREDA, M. P. JANE, J. Effect of Lactic Acid and UV Irradiation on the Cassava and Corn Starches. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 443–454, 2010.

FRATINI, F.; MANCINI, S.; TURCHI, B.; FRISCIA, E.; PITELLI, L.; GIUSTI, G.; CERRI, D. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. **Microbiological Research**, v. 195, p. 11–17, 2017.

FUH, Y.; WU, Z.; HE, Z.; HUANG, HU, W. The control of cell orientation using biodegradable alginate fibers fabricated by near-field electrospinning. **Materials Science & Engineering C**, v. 62, p. 879–887, 2016.

GARCÍA-TEJEDA, Y. V.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, C.; PÉREZ-OROZCO J. P.; RENDÓN-VILLALOBOS, R.; JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; FLORES-HUICOCHEA, E.; SOLORZA-FERIA, J.; BASTIDA, C. A. Physicochemical and mechanical properties of extruded laminates from native and oxidized banana starch during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 447–455, 2013.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, p. 195–222, 2008.

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

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; SANCHEZ, G.; LÓPEZ-RUBIO, A. Impact of molecular weight on the formation of electrosprayed chitosan microcapsules as delivery vehicles for bioactive compounds. **Carbohydrate polymers**, v. 150, p. 121–30, 2016.

GÖNEN, S. Ö.; EROL TAYGUN, M.; KÜÇÜKBAYRAK, S. Evaluation of the factors influencing the resultant diameter of the electrospun gelatin/sodium alginate nanofibers via Box-Behnken design. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 58, p. 709–23, 2016.

GONZÁLEZ, A.; ALVAREZ IGARZABAL, C. I. Nanocrystal-reinforced soy protein films and their application as active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 777–784, 2015.

GUO, J.; ZHOU, H.; AKRAM, M. Y.; MU, X.; NIE, J.; MA, G. Characterization and application of chondroitin sulfate/polyvinyl alcohol nanofibres prepared by electrospinning. **Carbohydrate polymers**, v. 143, p. 239–45, 2016.

HALAL, S. L. M.; COLUSSI, R.; DEON, V. G.; PINTO, V. Z.; VILLANOVA, F. A.; CARREÑO, N. L. V.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. D. R. Films based on oxidized starch and cellulose from barley. **Carbohydrate polymers**, v. 133, p. 644–53, 2015.

HE, X.; HWANG, H.-M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 16, p. 1–10, 2016.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231–240, 2008.

HOMAYONI, H.; RAVANDI, S. A. H.; VALIZADEH, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 656–661, 2009.

HUANG, Z.; LU, J.; LI, X.; Tong, Z. Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 128–135, 2007.

HUI, R.; QI-HE, C.; MING-LIANG, F.; QIONG, X.; GUO-QING, H. Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. **Food Chemistry**, v. 114, p. 81–86, 2009.

KHOSHAKHLAGH, K.; KOOCHEKI, A.; MOHEBBI, M.; ALLAFCHIAN, A. . Development and characterization of electrosprayed Alyssum homolocarpum seed gum nanoparticles for encapsulation of D-limonene. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 16, p. 797-945, 2016.

KIM, H.-S.; HUBER, K. C. Reaction patterns of wheat starch granules substituted with an anionic propylene oxide analog (POA) revealed by confocal microscopy and 3D anaglyph imaging. **Carbohydrate polymers**, v. 95, p. 492–500, 2013.

KIM, I. G.; LEE, J.; UNNITHAN, A. R.; PARK, C.; KIM, C. S. A comprehensive electric field analysis of cylinder-type multi-nozzle electrospinning system for mass production of nanofibers. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 251–256, 2015.

KONG, L. **ELECTROSPINNING OF STARCH FIBERS**. Tese (Doutorado em Filosofia) - Pennsylvania State University, 2012.

KONG, L.; ZIEGLER, G. R. Role of molecular entanglements in starch fiber formation by electrospinning. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 2247–53, 2012.

KONG, L.; ZIEGLER, G. R. Quantitative relationship between electrospinning parameters and starch fiber diameter. **Carbohydrate polymers**, v. 92, p. 1416–22, 2013.

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

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, p. 189–200, 2009.

KUO, W. Y.; LAI, H. M. Changes of property and morphology of cationic corn starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 544–553, 2007.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. NYCHAS, G.-J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LANCUŠKI, A.; VASILYEV, G.; PUTAUX, J. L.; ZUSSMAN, E. Rheological Properties and Electrospinnability of High-Amylose Starch in Formic Acid. **Biomacromolecules**, v. 16, p. 2529–36, 2015.

LAURICELLA, M.; PONTRELLI, G.; COLUZZA, I.; PISIGNANO, D.; SUCCI, S. JETSPIN: A specific-purpose open-source software for simulations of nanofiber electrospinning. **Computer Physics Communications**, v. 197, p. 227–238, 2015.

LI, X.; CHEN, H.; YANG, B. Centrifugally spun starch-based fibers from amylopectin rich starches. **Carbohydrate polymers**, v. 137, p. 459–65, 2016.

LIMBERGER, V. M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T.; COMARELA, C. G.; DALPIEVE, L. Modificação química e física do amido de quirera de arroz para aproveitamento na indústria de alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 84–88, 2008.

LÓPEZ, O. V.; ZARITZKY, N. E.; GARCÍA, M. A. Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 160–168, 2010.

LÓPEZ-RUBIO, A.; SANCHEZ, E.; WILKANOWICZ, S.; SANZ, Y.; LAGARON, J. M. Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 159–167, 2012.

LUBASOVA, D.; MULLEROVA, J.; NETRAVALI, A. N. Water-resistant plant protein - based nanofiber membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 1-9, 2015.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. DE F.; BRUNO, L. M. Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos. **Documento técnico/ Embrapa Agroindústria Tropical**, v. ISSN 2179, n. 145, p. 32, 2011.

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

MARQUES, J. D. L.; VOLCÃO, L. M.; FUNCK, G. D.; KRONING, I. S.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, Â. M.; RIBEIRO, G. A. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 444–450, 2015.

MUCCILLO, R. C. S. T. **Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão Mediante Provas Funcionais e Térmicas**. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

NEO, Y. P.; SWIFT, S.; RAY, S.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; JIN, J.; PERERA, C. O. Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. **Food chemistry**, v. 141, p. 3192–200, 2013.

NGUYEN, D.-N.; HWANG, Y.; MOON, W. Electrospinning of well-aligned fiber bundles using an End-point Control Assembly method. **European Polymer Journal**, v. 77, p. 54–64, 2016.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos Vol. 1**. Porto Alegre: Artmed, p. 294, 2005.

PENG, H.; ZHONG, S.; LIN, Q.; YAO, X.; LIANG, Z.; YANG, M.; YIN, G.; LIU, Q.; HE, H. Removal of both cationic and anionic contaminants by amphoteric starch. **Carbohydrate polymers**, v. 138, p. 210–4, 2016.

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

QIAO, D.; YU, L.; LIU, H.; ZOU, W.; XIE, F.; SIMON, G.; PETINAKIS, E.; SHEN, Z.; CHEN, L. Insights into the hierarchical structure and digestion rate of alkali-modulated starches with different amylose contents. **Carbohydrate polymers**, v. 144, p. 271–81, 2016.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat science**, v. 98, p. 404–19, 2014.

REZAEI, A.; TAVANAI, H.; NASIRPOUR, A. Fabrication of electrospun almond gum/PVA nanofibers as a thermostable delivery system for vanillin. **International journal of biological macromolecules**, v. 91, p. 536–543, 2016.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, p. 184, 2007.

SADEGH-HASSANI, F.; MOHAMMADI NAFCHI, A. Preparation and characterization of bionanocomposite films based on potato starch/halloysite nanoclay. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 458–462, 2014.

SAIDI, T.; ZEISS, R. Investigating promises of nanotechnology for development: A case study of the travelling of smart nano water filter in Zimbabwe. **Technology in Society**, v. 46, p. 40–48, 2016.

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

SILVA, G. O.; TAKIZAWA, F. F.; PEDROSO, R. A.; FRANCO, C. M. L.; LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S.; DEMIATE, I. M. Características físico-químicas de amidos

modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 188–197, 2006.

SMITH, R. J.; CARUSO, J. **Determination of phosphorus. In: Methods in carbohydrate chemistry: starch**. 4. ed. New York: Academic Press: USA, p. 42–46, 1964.

SUNTHORNVARABHAS, J.; CHATAKANONDA, P.; PIYACHOMKWAN, K.; SRIROTH, K. Electrospun polylactic acid and cassava starch fiber by conjugated solvent technique. **Materials Letters**, v. 65, p. 985–987, 2011.

SUNTHORNVARABHAS, J.; THUMANU, K.; LIMPIRAT, W.; KIM, H.J.; PIYACHOMKWAN, K.; SRIROTH K. Assessment of material blending distribution for electrospun nanofiber membrane by Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy and image cluster analysis. **Infrared Physics & Technology**, v. 66, p. 141–145, 2014.

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

TANG, S.; ZHAO, Z.; CHEN, G.; SU, Y.; LU, L.; LI, B.; LIANG, D.; JIN, R. Fabrication of ampicillin/starch/polymer composite nanofibers with controlled drug release properties by electrospinning. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 77, p. 594–603, 2015.

VANIER, N. L.; ZAVAREZE, E. R.; PINTO, V. Z.; KLEIN, B.; BOTELHO, F. T.; DIAS, A. R. G.; ELIAS, M. C. Physicochemical, crystallinity, pasting and morphological properties of bean starch oxidised by different concentrations of sodium hypochlorite. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1255–1262, 2012.

VEGA-LUGO, A.-C.; LIM, L.-T. Electrospinning of Soy Protein Isolate Nanofibers. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, p. 223–230, 2008.

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

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

WANG, W.; JIN, X.; ZHU, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; WANG, H.; LIN, T. Effect of vapor-phase glutaraldehyde crosslinking on electrospun starch fibers. **Carbohydrate polymers**, v. 140, p. 356–61, 2016.

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

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

XIE, S. X.; LIU, Q.; CUI, S. W. **Food Carbohydrates: chemistry, Physical Properties, and Applications**. Taylor & Francis, 2005.

XU, X.; JIANG, L.; ZHOU, Z.; WU, X. ; WANG, Y. Preparation and Properties of Electrospun Soy Protein Isolate / Polyethylene Oxide Nano fi ber Membranes. **Applied Materials & Interfaces**, v. 4, p. 4331–4337, 2012.

YANG, Z.; SWEDLUND, P.; HEMAR, Y.; MO, G.; WEI, Y.; LI, Z.; WU, Z. Effect of high hydrostatic pressure on the supramolecular structure of corn starch with different amylose contents. **International journal of biological macromolecules**, v. 85, p. 604–14, 2016.

YÖRDEM, O. S.; PAPILA, M.; MENCELOĞLU, Y. Z. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology. **Materials & Design**, v. 29, p. 34–44, 2008.

YU, J.; QIU, Y.; ZHA, X.; YU, M.; YU, J. Production of aligned helical polymer nanofibers by electrospinning. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 2838–2844, 2008.

ZHANG, X.; TANG, K.; ZHENG, X. Electrospinning and Crosslinking of COL/PVA Nanofiber-microsphere Containing Salicylic Acid for Drug Delivery. **Journal of Bionic Engineering**, v. 13, p. 143–149, 2016.

5 RELATÓRIO DE CAMPO

Objetivou-se inicialmente com presente estudo produzir nanofibras a partir de amido de milho, com diferentes teores de amilose, nativos e modificados quimicamente e incorporá-las de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) para elaboração de embalagens ativas de alimentos. Entretanto devido à dificuldade de incorporar o óleo essencial nas nanofibras, seu uso tornou-se inviável. Assim, optou-se pela utilização do composto bioativo isolado deste óleo, denominado carvacrol. Ainda, por não existirem estudos que utilizassem amido de normal amilose como matéria-prima para a formação de nanofibras por *electrospinning*, foram realizados dois estudos separadamente. No primeiro estudo foi utilizado amido de milho como proposto, e em um segundo estudo foi utilizado amido de batata solúvel. Desta forma, foram selecionadas nanofibras com resultados satisfatórios em relação a sua morfologia e ao seu diâmetro para posteriormente encapsular o carvacrol.

Além disso, o projeto foi elaborado para ser executado no Brasil, na UFPEL. No entanto, devido à possibilidade do Doutorado Sanduíche, o mesmo foi executado inicialmente no Canadá, na Universidade de Guelph. Sendo assim, foram necessárias algumas alterações no projeto, a fim de adaptá-lo com os objetivos do doutorado sanduíche. Neste sentido, objetivou-se com o trabalho produzir nanofibras, pela técnica de *electrospinning*, a partir de amidos de diferentes fontes, com diferentes teores de amilose, nativos ou modificados, com a incorporação de carvacrol, para a obtenção de membranas com atividades antimicrobiana e antioxidante.

6 ARTIGO 1



Electrospinning of native and anionic corn starch fibers with different amylose contents

Laura Martins Fonseca^{a,b}, Jean Paulo de Oliveira^a, Patricia Diaz de Oliveira^a,
Elessandra da Rosa Zavareze^a, Alvaro Renato Guerra Dias^a, Loong-Tak Lim^{b,*}

^a Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas 96010-900, Brazil

^b Department of Food Science, University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph, ON N1G2W1, Canada



ARTICLE INFO

Keywords:

Phosphorylation
Solution aging time
Electrospun starch fibers
Morphology

ABSTRACT

Through starch phosphorylation and solution aging treatments, the aim of this work was to produce electrospun fibers derived from native and anionic (modified with sodium triphosphate) corn starches with amylose contents of < 70% (w/w). The fibers of native and anionic corn starches (regular amylose and high amylose Hylon V/Hylon VII) were prepared by electrospinning of starch solutions dissolved in aqueous 75% formic acid (v/v) solvent. The effects of the aging (24, 48, and 72 h) on the rheology and electrical conductivity of the starch solutions, as well as the material properties (size distribution, morphology, and infrared spectrum) of the resulting electrospun fibers, were evaluated. Fibers produced from Hylon VII and Hylon V starches showed homogeneous morphologies, whereas the fibers from regular corn starches exhibited droplets and had heterogeneous morphologies, with diameter varied from 70 to 264 nm. Both native and anionic corn starches, with amylose contents of < 70% (w/w), produced smooth continuous fibers. The electrospun corn starch fibers potentially can be used as carriers for the encapsulation of active components in food and packaging applications.

1. Introduction

Electrospinning is a fiber-forming technique which utilizes an electrostatic field to stretch polymer solution into fibers with diameters ranging from tens to hundreds of nanometers. These materials are promising for biomedical as for vascular tissue engineering, bone tissue repair fields or as component of implant materials for its appropriate biomechanical properties and biocompatibility. In tissue engineering as biodegradable polymers porous fiber scaffolds, or environmental through biosensors (bio-functional membrane and transducer). The electrospun materials also show potential for food packaging applications as encapsulation carriers of active components (Bhardwaj & Kundu, 2010; Homayoni, Ravandi, & Valizadeh, 2009; Liu et al., 2016). The technology is very versatile for the production of electrospun fibers derived from natural and synthetic polymers, including soy protein isolate (Vega-Lugo & Lim, 2009; Xu, Jiang, Zhou, Wu, & Wang, 2012), zein (Antunes et al., 2017; Fernandez, Torres-Giner, & Lagaron, 2009), chitosan (Homayoni et al., 2009; Kriegel, Kit, McClements, & Weiss, 2009), and starch (Cárdenas, Gómez-Pachon, Muñoz, & Vera-Graziano, 2016; Kong & Ziegler, 2013, 2014; Mi et al., 2015).

Due to their linear molecular morphology, amylose polymer chains

can easily entangle to form continuous fibers. Thus, the production of electrospun starch fibers has been mainly focused on high amylose starches (Hemamalini & Dev, 2017; Kong & Ziegler, 2012; Lancuški, Vasilyev, Putaux, & Zussman, 2015; Liu, Gu, Hong, Cheng, & Li, 2017; Xu, Yang, & Yang, 2009). For example, Kong and Ziegler (2012) electrospun uniform, continuous, and smooth fibers derived from a high amylose corn starch (80% w/w amylose content), with an average diameter of several micrometers. In the same study, they observed that another starch with a lower amylose content (55% w/w) resulted in ribbon-shaped electrospun fibers with inconsistent morphologies. Other corn starches tested with < 25% amylose content could not be electrospun into fibers. In another study, Lancuški et al. (2015) electrospun corn starch fibers with 70% (w/w) amylose content, using formic acid solvents of different solvent concentrations (80, 90, and 100% v/v). They reported uniform fibers with diameters varying from 80 to 300 nm, with some beaded fibers. Similarly, Xu et al. (2009) investigated electrospun fibers prepared from polymer solutions prepared in different solvents (formic acid/water and formic acid/ethanol) using an acetate modified corn starch with 70% (w/w) amylose content. The starch was modified in to overcome its limitations (e.g., poor water stability and mechanical properties). These researchers reported thick

* Corresponding author.

E-mail address: llim@uoguelph.ca (L.-T. Lim).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.021>

Received 23 June 2018; Received in revised form 4 October 2018; Accepted 7 October 2018

Available online 11 October 2018

0963-9969/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

fibers around 50 μm in diameter with beaded morphology, and showed that the acetate starch fibers may be suitable for controlled release of drugs.

Chemical modification of starch by adding anionic and cationic groups can generate electrostatic charges that alter the physicochemical properties of the polymer (Dias et al., 2011). For example, anionic starches are obtained by reaction with reagents containing phosphate, xanthate, and carboxylate groups (Peng et al., 2016). On the other hand, anionic starches are produced by phosphorylation, which is typically carried out using sodium tripolyphosphate under a controlled pH and temperature condition. Phosphorylation introduces phosphate groups into the starch structure (Xie, Liu, & Cui, 2005), which could be favorable for the electrospinning process by increasing electrostatic on the polymer chains (Bhardwaj & Kundu, 2010). Another problem with starch-based fiber-forming solutions is their elevated viscosity after gelatinization. In the literature, difficulties in forming fibers of starches with amylose contents < 70% (w/w) have been reported (Kong & Ziegler, 2012; Stijnman, Bodnar, & Hans Tromp, 2011). Through aging (allowing the solution to rest for a period before electrospinning), it may be possible to reduce the viscosity of the starch solution to a level more conducive to electrospinning (Lancuński et al., 2015).

Through starch phosphorylation and solution aging treatments, the aim of this work was to electrospin fibers with consistent morphology from fiber-forming solutions from native and anionic corn starches with amylose contents of < 70% (w/w).

2. Material and methods

2.1. Materials

Hylon® VII and Hylon® V corn starches, with 72 and 55% (w/w) amylose contents, respectively (as determined by the supplier), were provided by Ingredion (CAS 9005-25-8, New Jersey, USA). Commercial regular corn starch (Maizena®, São Paulo, Brazil) with 29.7% (w/w) amylose content, as determined by the methodology of McGrance et al. (1998). Sodium tripolyphosphate (CAS T.1025.03.AH, São Paulo, Brazil) and formic acid (88% v/v, Fisher Chemical, CAS 64.18-6, Illinois, USA) were sourced from chemical suppliers.

2.2. Preparation of anionic starch

Regular and Hylon V corn starches were phosphorylated following the method by Chaisawang and Supphantharika (2006). Sodium tripolyphosphate (4.5 g) was dissolved in distilled water (241 mL) and the starch (301.5 g) was added and mixed. The solution was stirred for 1 h at room temperature, and then centrifuged for 4 min at 2300 rpm. The supernatant was removed and the sediment was dried at 40 °C to achieve 10–15% (w/w dry basis) moisture content. The resulting starch was heated at higher temperature (for 2 h at 130 °C) to achieve phosphorylation. To remove the free phosphorus content, the starch was washed several times with distilled water and centrifuged for 4 min at 2300 rpm. The supernatant was removed, the sediment was then dried at 40 °C for 24 h and stored for further use. The phosphorus content was determined by flame emission photometry (FEP) using the method of Smith and Caruso (1964). The as received Hylon VII corn starch was used as a control since this polysaccharide has been successfully electrospun by other researchers, and that the polymer has been well characterized.

2.3. Preparation of fiber-forming solutions and electrospinning

The fiber-forming starch solutions were prepared using 75% (v/v) aqueous formic acid as solvent. The concentrations of starch, fiber-forming polymer solution stirring times, and electrospinning parameters are summarized in Table 1. The solutions were stirred under constant agitation to complete starch dissolution and gelatinization.

The aging process was carried out allowing the solutions to rest (without agitation) at ambient temperature (25 ± 2 °C) for 24, 48, and 72 h before electrospinning. An electrospinning apparatus, assembled inside an environmental test chamber (Model MLR-350; SANYO Electric Co., Ltd., Japan), was used for the production of fiber at 22 ± 5 °C and 30% relative humidity. The electrospinner was equipped with a power supply (Model ES30R-5 W/DM; Gamma High Voltage Research, USA) and a syringe infusion pump (Model 780,100; Kd Scientific Inc., Holliston, MA, USA). The fiber-forming solution was loaded into a 3 mL plastic syringe attached with a 16-gauge blunt stainless-steel spinneret needle (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) pointing horizontally towards a grounded stainless-steel collector plate positioned at 15 cm away from the tip of the spinneret. The solution was pumped at a steady flow-rate (Table 1).

2.4. Rheological measurements and electrical conductivity of fiber-forming solutions

The fiber-forming solutions were prepared for rheological measurements as they were prepared for electrospinning, using the same conditions. The viscosity of the fiber-forming solutions was determined using a rheometer (Rheostress RS 150, Germany) coupled with a temperature controller (Haake DC 50, Germany). Rotatory shear deformation tests with a shear rate of 0.1 to 100 s^{-1} were carried out for 300 s at 25 °C. The Herschel–Bulkley model was used to analyze the rheological parameters, as shown by Li, Wang, Lee, and Li (2018) using Eq. (1).

$$\tau = \tau_0 + \kappa(\dot{\gamma})^n \quad (1)$$

where, τ is the shear stress (Pa), τ_0 is the yield stress (Pa), κ is the consistency index ($\text{Pa}\cdot\text{s}$), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s^{-1}), and n is the flow behavior index.

Oscillatory shear deformation was carried out by frequency sweep tests to evaluate the changes in the viscoelastic modulus as a function of angular frequency (0.1 to 10 Hz). For all fiber-forming solutions, preliminary amplitude sweep tests confirmed a 1% strain within the linear viscoelastic region. For both tests, a cone-plate geometry with a rotating cone (60 mm diameter, 2° angle, and 0.104 mm gap) was used.

For the determination of the electrical conductivity of the polymer solutions, a portable conductivity meter (MS TECNOPON, model mCA 150P, Brazil) was used. Analyses were made in triplicate at room temperature (25 ± 2 °C).

2.5. Morphology and size distribution of the electrospun starch fibers

The electrospun starch fibers were sputter-coated with gold in a vacuum chamber (Denton Vacuum in Sputtering DESK V, USA) and examined in a scanning electron microscope (SEM, Quanta FEG 250, USA) at an acceleration voltage of 10 kV. The average diameter and the size distribution of the fibers were measured using the SEM micrographs in ImageJ software (2015 version) by sixty measurements.

2.6. FT-IR analysis of starch and the starch electrospun fibers

The IR-active groups of the starch and starch electrospun fibers were analyzed using a Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometer (IRPrestige21, Shimadzu Corp., Japan) equipped with an attenuated total reflection (ATR) accessory (Pike Tech, Madison, WI). The spectrum was obtained in an average of 60 scans for each sample at a resolution of 4 cm^{-1} at room temperature.

2.7. Statistic analysis

Analytical determinations were performed in triplicate for rheological measurements and electrical conductivity. Mean values were compared by Tukey's test at 5% level of significance by analysis of

Table 1

Starch concentration, fiber-forming polymer solution stirring time, and electrospinning parameters used to produce the electrospun fibers.

Fiber-forming polymer solutions			Electrospinning parameters		
Corn starch	Concentration (% w/v) ^a	Solutions stirring time (min)	Voltage (kV)	Distance (cm)	Flow (mL.h ⁻¹)
Native Hylon VII	15	100	15	15	0.6
Native Hylon V	15	90	18	15	0.6
Anionic Hylon V	15	90	18	15	0.6
Native regular	12	40	18	15	0.8
Anionic regular	12	40	18	15	0.8

^a Starch concentration in formic acid in 75% (v/v) solution: g_{starch}/100 mL.

variance (ANOVA).

3. Results and discussion

3.1. Phosphorus content of the starches

The phosphorus content of the native regular corn starch was $0.03 \pm 0.01\%$ (w/w) and that of the anionic regular corn starch was $0.10 \pm 0.01\%$ (w/w), showing that the phosphate groups had been introduced onto the polymer chains. In their study, Stahl et al. (2007) reported $0.01 \pm 0.00\%$ (w/w) phosphorus content for a native corn starch and $0.25 \pm 0.05\%$ (w/w) for the phosphorylated starch, which are in accordance with the values found in the present study. On the other hand, native Hylon V starch had $0.05 \pm 0.01\%$ (w/w) phosphorus content, while the anionic counterpart had $0.08 \pm 0.00\%$ (w/w), showing that the Hylon V starch was only slightly modified. This behavior may be explained by the amylose/amylopectin ratio, which has a direct influence on the phosphorylation process. The introduction of phosphate groups occurs mostly in the branched amylopectin chains (Alvani, Qi, Tester, & Snape, 2011; Fortuna et al., 2013; Lim & Seib, 1993; Stahl et al., 2007) and therefore, starches with high amylose content, such as Hylon V, are less susceptible to the chemical modification. The phosphorylation is more efficient in starches with lower amylose content, resulting in a reduction in solubility, swelling, and viscosity of the starch solutions (Sitohy, El-saadany, Labib, & Rama, 2000; Stahl et al., 2007).

3.2. Concentration of polymer solutions and electrospinning conditions

Successful electrospinning of a polymer solution requires optimal processing parameters, (e.g., the applied voltage, flow rate, and spinneret-collector distance) as well as solution properties (e.g., concentration, viscosity, and electrical conductivity) (Haider, Haider, & Kang, 2015; Hulsey, Absar, & Choi, 2017; Šukytė, Adomavičiūtė, & Milašius, 2010; Tam, Oguz, Aydogdu, Sumnu, & Sahin, 2017). Preliminary experiments were conducted at different starch concentrations (5, 10, 12, 15, 17, and 20% w/v) in aqueous 75% (v/v) formic acid solvent. These starch concentrations were chosen based on the values from the literature (Kong and Ziegler (2012); Lancuški et al. (2015); Šukytė et al., 2010). Solutions with low starch concentration (5 and 10% w/v) did not form fibers, but rather produced irregular droplets that were observed under the microscope (data not shown). On the other hand, solutions with starch concentrations of 17 and 20% (w/v) were unsuitable for electrospinning because of their high viscosity, even after 24 h of solution aging, i.e., no fibers were resulted. Similar observation was reported by Lancuški et al. (2015) (Hylon VII fibers in formic acid solutions) that the gel-like starch solutions cannot be electrospun due to elevated high viscosity. However, allowing the solutions to age for at least 24 h resulting in a reduction in viscosity, rendering the solutions electrospinnable. Therefore, starch concentration of 12% (w/v) for regular amylose content starches (both native and anionic regular starches) and 15% (w/v) for high amylose content starches (Hylon VII, and native and anionic Hylon V starches) were

selected for further investigation, because of their ability to produce fibers, as observed under the microscope.

Different corn starch samples required different solution stirring times to gelatinize due to differences in water content, amylose/amylopectin ratio, temperature and botanical sources (Alcázar-Alay & Meireles, 2015; Wang et al., 2017). In this study, aqueous formic acid (75% v/v) was used as a solvent to induce chemical gelatinization, causing the amylose and amylopectin macromolecules to separate and aggregate on aging. Table 1 summarizes the distinct electrospinning parameters required for different starch solutions tested.

3.3. Rheological measurements and electrical conductivity of fiber-forming solutions

The η values of the fiber-forming polymer solutions are shown in Fig. 1, which are well-described by the Herschel–Bulkley model, with coefficients of determination (R^2) of 0.9819–0.9997 (Table 2). However, the model did not fit the data well at longer aging time (72 h) for all starch types. This deviation can be attributed to the reduction in apparent viscosity and yield stress (τ_0). The model did not describe the rheology well for the solutions with 72 h of aging due to their pseudoplastic behavior (Fig. 1c). Moreover, throughout the shear rate range tested, η remained relatively stable for all fiber-forming solutions. Overall, η values decreased with increasing aging time. For example, the η values for Hylon VII solutions decreased from 1710 to 900 mPa s as the samples were aged from 24 to 48 h. Further aging to 72 h resulted in a decrease in η value to 142 mPa s (Fig. 1). The viscosity of a starch solution depends on the amylose and amylopectin ratio and other parameters, such as molecular weight (Sitohy et al., 2000). The decreased apparent viscosity can be attributed to the partial acid hydrolysis of starch during aging in formic acid. Similar aging effects were reported by Lancuški et al. (2015) for Hylon VII starch in formic acid solution. The reorganization of starch macromolecules may have contributed to the increased electrospinnability of the aged solutions. The apparent viscosity values of the anionic starches were greater than those of the native starches. An opposite trend was reported by Stahl et al. (2007) in their studies on native and phosphate corn starches, where they observed a reduction in viscosity for a starch phosphate with a low degree of substitution. The different trend observed could be attributed to the formic acid solvent used in the present study, instead of the water in Stahl et al. (2007).

In the Herschel–Bulkley model, the n values of the fiber-forming solutions increased with increasing aging times for all starch types, except for Hylon VII where the differences were not significant ($p > 0.05$). All fiber-forming solutions exhibited n values of less than one, indicating non-Newtonian pseudoplastic behavior. The shear-thinning behavior became less noticeable with increasing aging time. On the other hand, the k values decreased significantly ($p < 0.05$) with increasing aging time. Moreover, the native starches exhibited higher k values than the anionic corn counterparts (Table 2). Li et al. (2018) reported similar rheological behaviors for an enzymatically modified oat starch. All the fiber-forming solutions showed low τ_0 values, indicating low resistance to initial flow, with no significant difference

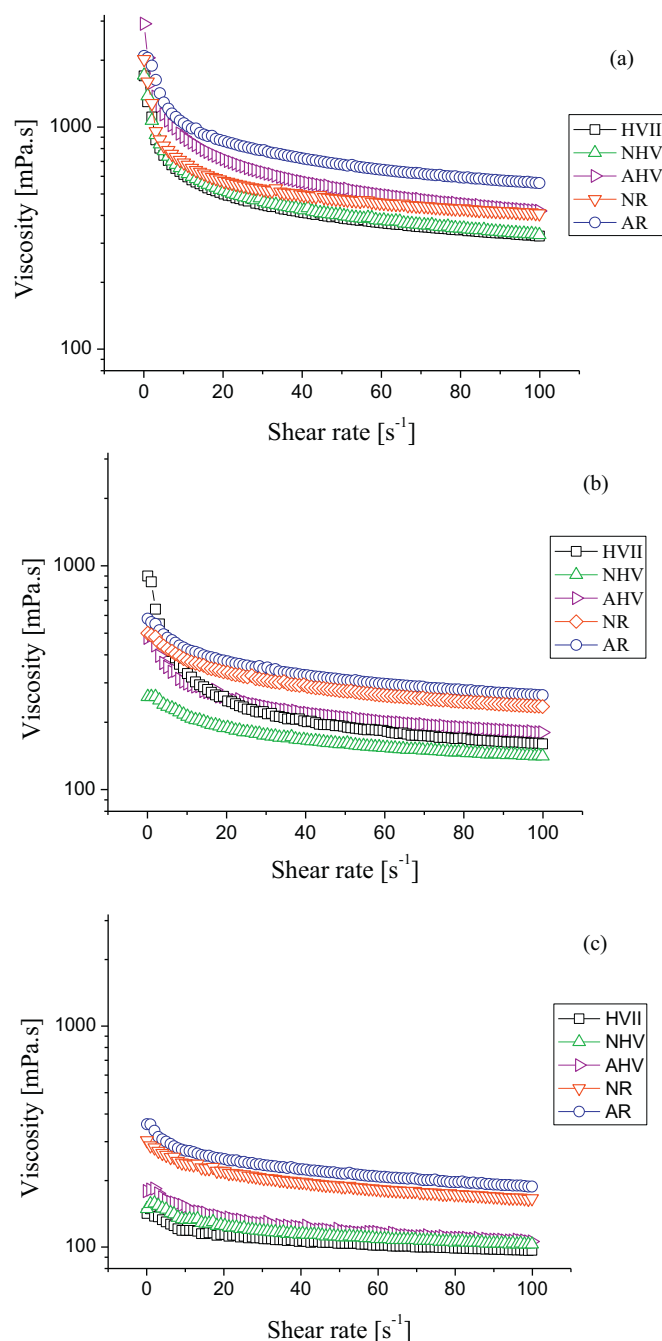


Fig. 1. Viscosity as a function of shear rate of fiber-forming solutions after different aging times: (a) 24, (b) 48, and (c) 72 h. *Native Hylon VII corn starch (HVII), native Hylon V corn starch (NHV), anionic Hylon V corn starch (AHV), native regular corn starch (NR) and anionic regular corn starch (AR).

($p > 0.05$) between corn starch types.

The oscillatory tests were performed to evaluate the effects of rheological properties on fiber formation, as well as to elucidate the effects of acid hydrolysis due to aging. The storage (G') and loss moduli (G'') as a function of frequency are presented in Fig. 2. As shown, for all aged solutions, G'' was greater than G' over the entire frequency range, implying that the liquid-like viscous behavior dominated the elastic behavior. Herrera, Vasanthan, and Chen (2017) observed similar behavior ($G'' > G'$) for wheat and oat starch solutions. Fig. 2 also shows that the G' and G'' moduli increased with increasing frequency, implying frequency-dependent rheological phenomena for all the solutions analyzed. It is noteworthy that increasing aging time resulted in

decreases in both moduli for all solutions. For example, G' and G'' values for Hylon VII decreased from 0.360 and 0.580 mPa s, respectively, to 0.009 and 0.096 mPa s, as the aging time increased from 24 to 72 h, indicative of possible hydrolysis of the starch in the formic acid solutions. The anionic starches showed a lower reduction in the G' and G'' (Fig. 2) than the native starches with aging. In addition, increased separations between G' and G'' are evident, mainly due to the progressive lowering of the storage modulus as the solutions aged. Li et al. (2016) evaluated the rheological parameters of enzymatically modified corn starch, who reported a similar reduction in the G' values with increasing modification time. They postulated that G' is representative of the structural development that retards the short-term retrogradation of starch. In addition, they correlated the decrease in G' to a reduction in amylose content induced by the enzymatic modification.

The electrical conductivity of the spin dope solution directly influences the formation of the Taylor cone - a deformed pendant droplet at the tip of the spinneret essential for electrospinning. Solutions with low conductivity may not induce sufficient charge on the surface of the Taylor cone to induce jetting (Haider et al., 2015). The anionic modification of starch in the present study did not significantly ($p > 0.05$) alter the conductivity (Table 3). Samples aged for 48 h had significantly higher ($p < 0.05$) conductivity values than those aged for 24 h, which correlated with poor consistency in fiber morphology observed in the former. Similarly, aged Hylon VII samples with increased electrical conductivity also exhibited inconsistent fiber morphology (Fig. 4).

3.4. Morphology and size distribution of the electrospun starch fibers

Fibers with different morphologies were obtained depending on the amylose content of the starches and the extent of solution aging (Fig. 4). The fibers produced from anionic Hylon V starch had more homogeneous and continuous morphologies compared to the other starch fibers. However, the fibers obtained from anionic Hylon V subjected to 24 h of aging had a larger average diameter (264 ± 37 nm) compared to those of native Hylon V starch with 48 h of aging (70 ± 23 nm) (Fig. 3). Fibers produced from solutions aged for 24 h showed the highest average diameter compared with those aged for 48 and 72 h, due to the higher apparent viscosity for the 24 h samples. In generally, a decrease in fiber diameter increases the orientation of the polymer chains along the fiber length, with a concomitant increase in surface area-to-volume ratio (Baji, Mai, Wong, Abtahi, & Chen, 2010). For this characteristic, as well as biodegradable and biocompatible properties, these fibers may be used as encapsulation carriers of bioactive components in food and biomedical applications. The different morphologies observed between the spin dope solutions can be attributed to the variation in amylose content of the starches, where the linear macromolecule contributes to chain entanglement (Xie et al., 2005). Fibers from native (Fig. 4d) and anionic (Fig. 4e) regular starches contained more beads and droplets than those produced from native (Fig. 4b) and anionic (Fig. 4c) Hylon V starches. The fibrous morphologies for the Hylon V starches can be attributed to their greater amylose content and higher solution viscosity than the regular starches. Kong and Ziegler (2012) produced fibers from starches with 80% (w/w; Gelose 80) and 55% (w/w; Hylon V) amylose contents. Consistent with the results from the present study, they reported bead-less electrospun fibers for Gelose 80, but observed heterogeneous morphologies for Hylon V.

The aging time had significant influence on the morphology of the fibers. All electrospun fiber samples had beads, which tended to increase with increasing aging time for Hylon VII (Fig. 4a) and native Hylon V (Fig. 4b). For the anionic Hylon V fibers, a reduction in beads was observed with 72 h of aging, resulting in homogeneous morphology (Fig. 4c). The formation of beaded structures can be attributed to the reduction in polymer chain entanglement, causing the break-up in the jets during the electrospinning process (Baji et al., 2010; Vega-Lugo & Lim, 2009). Also, fibers from native Hylon VII and Hylon V showed more consistent morphology after 48 h of aging. However, fibers from

Table 2
Rheological parameters of the fiber-forming polymer solutions after different aging times.

Corn starch ^a	Values of rheological model							
	Yield stress (τ_0) [Pa]		Consistency index (κ) [Pa.s ⁿ]		Flow behavior index (n) [–]		R^2	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Native Hylon VII	0.08 ± 0.01 ^{aA}	0.16 ± 0.08 ^{aA}	1.13 ± 0.19 ^{bA}	0.66 ± 0.02 ^{aB}	0.69 ± 0.00 ^{aA}	0.64 ± 0.06 ^{bA}	0.9979	0.9997
Native Hylon V	0.26 ± 0.09 ^{aA}	0.05 ± 0.01 ^{aA}	1.21 ± 0.16 ^{bA}	0.38 ± 0.07 ^{bB}	0.71 ± 0.03 ^{aB}	0.80 ± 0.02 ^{aA}	0.9984	0.9930
Anionic Hylon V	0.18 ± 0.00 ^{aA}	0.04 ± 0.00 ^{aB}	2.09 ± 0.07 ^{aA}	0.52 ± 0.00 ^{abB}	0.65 ± 0.01 ^{aB}	0.76 ± 0.01 ^{aA}	0.9994	0.9885
Native regular	0.25 ± 0.03 ^{aA}	0.06 ± 0.01 ^{aA}	1.48 ± 0.18 ^{bA}	0.57 ± 0.04 ^{abB}	0.71 ± 0.03 ^{aB}	0.80 ± 0.01 ^{aA}	0.9819	0.9970
Anionic regular	0.22 ± 0.02 ^{aA}	0.09 ± 0.04 ^{aB}	2.23 ± 0.19 ^{aA}	0.67 ± 0.04 ^{abB}	0.69 ± 0.01 ^{aB}	0.79 ± 0.00 ^{aA}	0.9948	0.9987

^{a,b}Values with different lowercase letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

^{A,B}Values with different uppercase letters, for each parameter, in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

* Polymer solution in formic acid 75% (v/v).

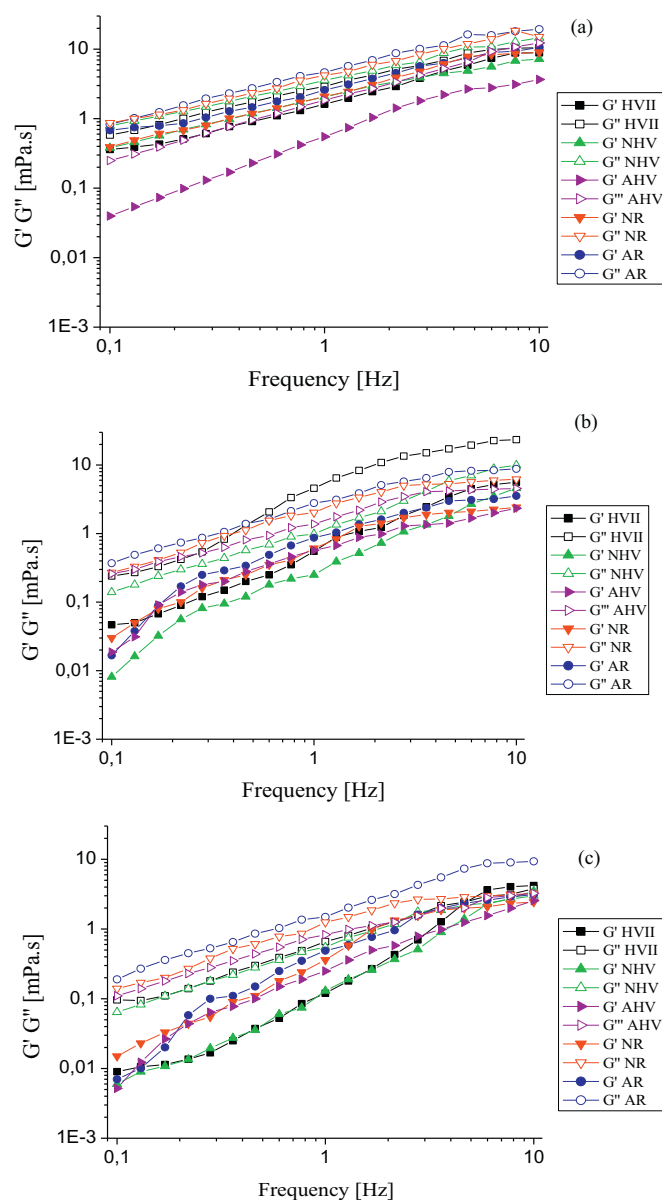


Fig. 2. Storage (G') and loss (G'') moduli of fiber-forming solutions after different aging times: (a) 24, (b) 48, and (c) 72 h. *Native Hylon VII corn starch (HVII), native Hylon V corn starch (NHV), anionic Hylon V corn starch (AHV), native regular corn starch (NR) and anionic regular corn starch (AR).

Table 3
Electrical conductivity of the fiber-forming polymer solutions after different aging times.

Corn starch ^a	Electrical conductivity (mS.cm ⁻¹)		
	24 h	48 h	72 h
Native Hylon VII	2.83 ± 0.02 ^{bB}	3.03 ± 0.02 ^{bA}	3.02 ± 0.01 ^{aA}
Native Hylon V	2.82 ± 0.02 ^{bB}	3.01 ± 0.01 ^{bA}	2.88 ± 0.02 ^{bB}
Anionic Hylon V	2.63 ± 0.04 ^{cB}	3.06 ± 0.01 ^{bA}	2.73 ± 0.01 ^{bB}
Native regular	3.05 ± 0.04 ^{aB}	3.29 ± 0.10 ^{aA}	3.15 ± 0.01 ^{aB}
Anionic regular	2.96 ± 0.01 ^{aB}	3.42 ± 0.09 ^{aA}	2.98 ± 0.03 ^{aB}

^{a, b, c}Values with different lowercase letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

^{A, B}Values with different uppercase letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

* Polymer solution from corn starch in formic acid 75% (v/v).

anionic regular and anionic Hylon V starches required a longer aging time (72 h) to attain a consistent fiber morphology.

3.5. FT-IR analysis of starch and the electrospun starch fibers

The FT-IR spectra of electrospun starch fibers are summarized in Fig. 5. The vibration at 3277 cm⁻¹ corresponds to OH group stretching (Vanmarcke et al., 2017). The bands at 1639 and 1329 cm⁻¹ are attributable to C=O and O—H deformation, respectively (Wu, Geng, Chang, Yu, & Ma, 2009). The band at 1155 cm⁻¹ is due to C—O stretching in glucose monomer (Fang, Fowler, Tomkinson, & Hill, 2002). The band at 1001 cm⁻¹ represents the starch chain vibration from C—O—C (Pelissari, Andrade-mahecha, Sobral, & Menegalli, 2013). Overall, minimal changes in vibrational frequencies between the electrospun fibers and starch samples are observed (Fig. 5). Small frequency shifts in the absorbance bands with aging is observed, which can be explained by the starch–formic acid interactions that occur in solution and/or hydrolysis (Lancuși et al., 2015), consistent with the rheological measurements and a reduction in solution viscosity. No detectable spectral differences are observed between native and phosphorylated samples, because of the low degree of modification. Similarly, Murúa-Pagola, Beristain-Guevara, and Martínez-Bustos (2009) evaluated the IR-active properties functional groups of waxy corn starch, who reported no difference between the spectra of native and phosphate starches.

4. Conclusions

Fibers from starch were successfully electrospun with average diameters ranging from 70 to 264 nm. Fibers produced via phosphorylation of Hylon V were more homogeneous, less beaded, and larger in diameter than those electrospun from unmodified Hylon V. In contrast,

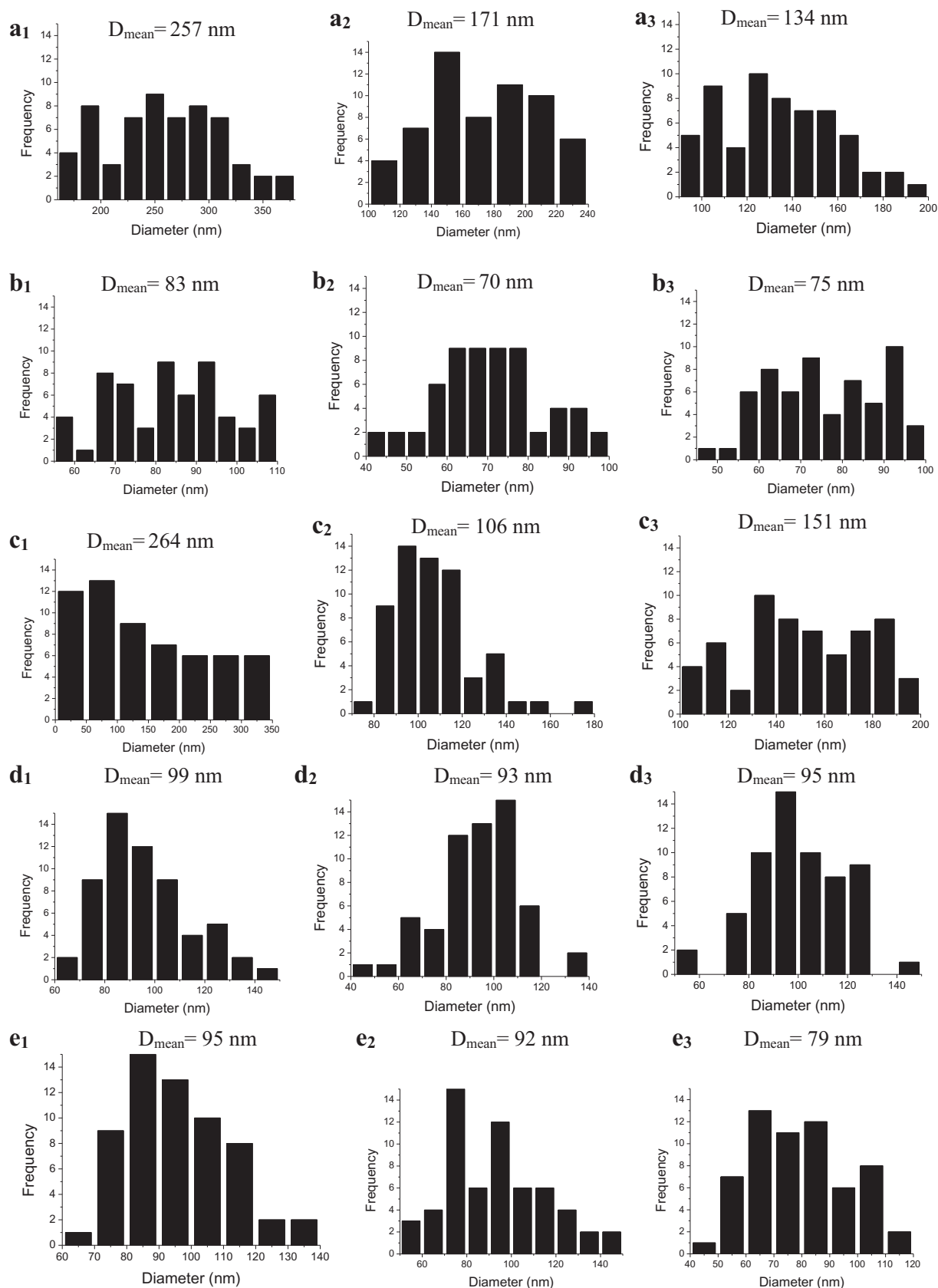


Fig. 3. Size distribution of electrospun starch fibers formed from solutions after different aging times. Native Hylon VII corn starch aged for (a₁) 24, (a₂) 48, and (a₃) 72 h; native Hylon V corn starch aged for (b₁) 24, (b₂) 48, and (b₃) 72 h; anionic Hylon V corn starch aged for (c₁) 24, (c₂) 48, and (c₃) 72 h; native regular corn starch aged for (d₁) 24, (d₂) 48, and (d₃) 72 h; and anionic regular corn starch aged for (e₁) 24, (e₂) 48, and (e₃) 72 h.

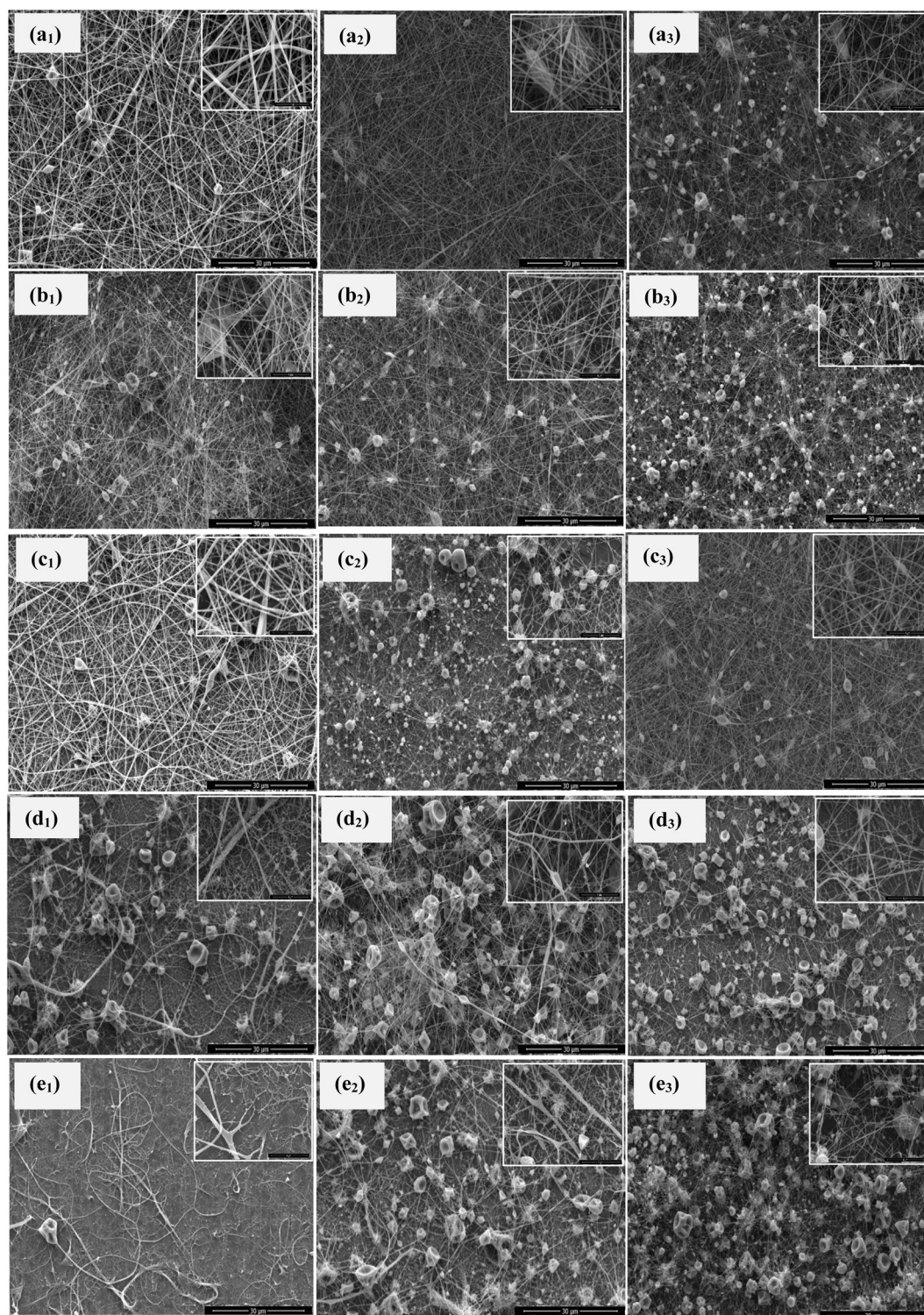


Fig. 4. Morphology of electrospun starch fibers formed from solutions after different aging times. Native Hylon VII corn starch aged for (a₁) 24, (a₂) 48, and (a₃) 72 h; native Hylon V corn starch aged for (b₁) 24, (b₂) 48, and (b₃) 72 h; anionic Hylon V corn starch aged for (c₁) 24, (c₂) 48, and (c₃) 72 h; native regular corn starch aged for (d₁) 24, (d₂) 48, and (d₃) 72 h; and anionic regular corn starch aged for (e₁) 24, (e₂) 48, and (e₃) 72 h. *scale bar of 30 μm.

regular corn starch with a typical amylose content (29.7% w/w) yielded fibers with inconsistent morphologies (i.e., short fibers with heterogeneous morphologies, beads, and droplets). Aging of the fiber-forming polymer solutions affected the rheological properties of the fibers, resulting in greater material heterogeneity. Overall, results from this study show that electrospun fibers of various morphologies can be produced from native and phosphorylated corn starches with different

amylose contents. Because starch is biocompatible and biodegradable, electrospun starch fibers can be promising for food, nutraceutical, and packaging applications. Further investigation to characterize the mechanical, barrier, and solubility properties of the starch fibers is essential.

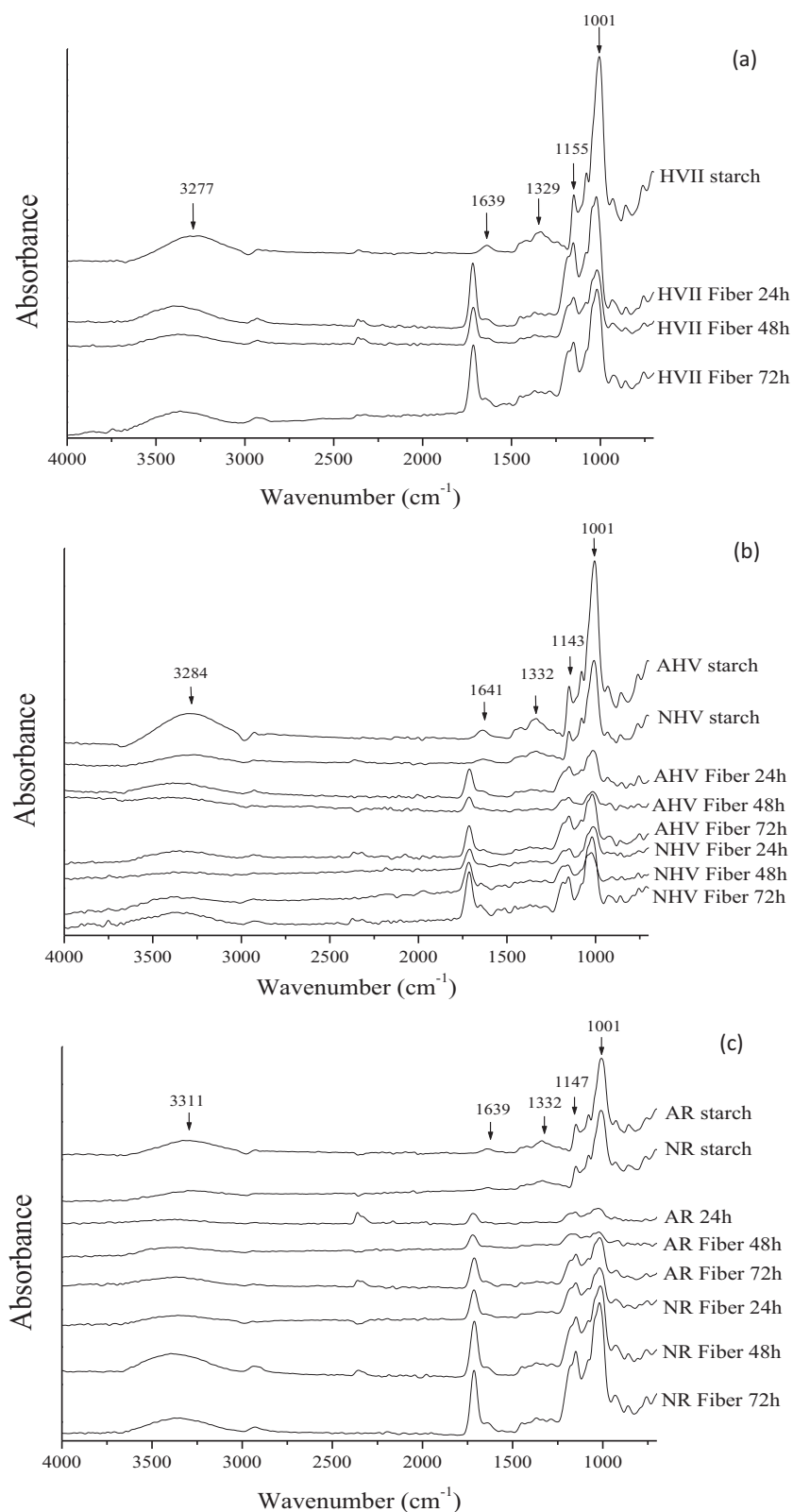


Fig. 5. FTIR spectra of starches and electrospun starch fibers after 24, 48 and 72 h of aging. (a) Native Hylon VII corn starch (HVII), (b) native Hylon V corn starch (NHV) and anionic Hylon V corn starch (AHV), and (c) native regular corn starch (NR) and anionic regular corn starch (AR).

Acknowledgements

This study was financially supported by CAPES (88881.062166/2014-01), CNPq (448800/2014-4) and FAPERGS (16/2551-0000250-9).

References

- Alcázar-Alay, S. C., & Meireles, M. A. A. (2015). Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35, 215–236.
- Alvani, K., Qi, X., Tester, R. F., & Snape, C. E. (2011). Physico-chemical properties of potato starches. *Food Chemistry*, 125, 958–965.
- Antunes, M. D., Dannenberg, G. d. S., Fiorentini, A. M., Pinto, V. Z., Lim, L., Zavareze, E. d. R., & Dias, A. R. G. (2017). Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/ cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 874–882.
- Baji, A., Mai, Y. W., Wong, S. C., Abtahi, M., & Chen, P. (2010). Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology*, 70, 703–718.
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28, 325–347.
- Cárdenas, W., Gómez-Pachon, E. Y., Muñoz, E., & Vera-Graziano, R. (2016). Preparation of potato starch microfibrils obtained by electro wet spinning. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 138, 134–146.
- Chaisawang, M., & Suphantharika, M. (2006). Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 20, 641–649.
- Dias, A. R. G., Zavareze, E. D. R., Elias, M. C., Helbig, E., da Silva, D. O., & Ciacco, C. F. (2011). Pasting, expansion and textural properties of fermented cassava starch oxidised with sodium hypochlorite. *Carbohydrate Polymers*, 84, 268–275.
- Fang, J. M., Fowler, P. A., Tomkinson, J., & Hill, C. A. S. (2002). The preparation and characterisation of a series of chemically modified potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 47, 245–252.
- Fernandez, A., Torres-Giner, S., & Lagaron, J. M. (2009). Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. *Food Hydrocolloids*, 23, 1427–1432.
- Fortuna, T., Gałkowska, D., Baczakowicz, M., Szkabar, K., Tartanus, I., Labanowska, M., & Kurdziel, M. (2013). Effect of potassium and magnesium treatment on physico-chemical and rheological properties of potato, corn and spelt starches and on thermal generation of free radicals. *Starch/Stärke*, 65, 912–922.
- Haider, A., Haider, S., & Kang, I. (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 15, 1878–5352.
- Hemamalini, T., & Dev, V. R. G. (2017). Comprehensive review on electrospinning of starch polymer for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 712–718.
- Herrera, M. P., Vasanthan, T., & Chen, L. (2017). Rheology of starch nanoparticles as influenced by particle size, concentration and temperature. *Food Hydrocolloids*, 66, 237–245.
- Homayoni, H., Ravandi, S. A. H., & Valizadeh, M. (2009). Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers*, 77, 656–661.
- Hulse, S., Absar, S., & Choi, H. (2017). Comparative study of polymer dissolution techniques for electrospinning. *Procedia Manufacturing*, 10, 652–661.
- Kong, L., & Ziegler, G. R. (2012). Role of molecular entanglements in starch fiber formation by electrospinning. *Biomacromolecules*, 13(8), 2247–2253.
- Kong, L., & Ziegler, G. R. (2013). Quantitative relationship between electrospinning parameters and starch fiber diameter. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1416–1422.
- Kong, L., & Ziegler, G. R. (2014). Fabrication of pure starch fibers by electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 36, 20–25.
- Kriegel, C., Kit, K. M., McClements, D. J., & Weiss, J. (2009). Electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. *Polymer*, 50, 189–200.
- Lancușki, A., Vasilyev, G., Putaux, J.-L., & Zussman, E. (2015). Rheological properties and electrospinnability of high-amylose starch in formic acid. *Biomacromolecules*, 16, 2529–2536.
- Li, W., Li, C., Gu, Z., Qiu, Y., Cheng, L., Hong, Y., & Li, Z. (2016). Retrogradation behavior of corn starch treated with 1,4- α -glucan branching enzyme. *Food Chemistry*, 203, 308–313.
- Li, X., Wang, Y., Lee, B. H., & Li, D. (2018). Reducing digestibility and viscoelasticity of oat starch after hydrolysis by pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*. *Food Hydrocolloids*, 75, 88–94.
- Lim, S., & Seib, P. A. (1993). Location of phosphate esters in a wheat starch phosphate P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cereal Chemistry*, 70, 145–152.
- Liu, G., Gu, Z., Hong, Y., Cheng, L., & Li, C. (2017). Electrospun starch nano fibers: Recent advances, challenges, and strategies for potential pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release*, 252, 95–107.
- Liu, H., Liu, W., Luo, B., Wen, W., Liu, M., Wang, X., & Zhou, C. (2016). Electrospun composite nanofiber membrane of poly(L-lactide) and surface grafted chitin whiskers: Fabrication, mechanical properties and cytocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, 147, 216–225.
- Mi, S., Kong, B., Wu, Z., Sun, W., Xu, Y., & Su, X. (2015). A novel electrospinning setup for the fabrication of thickness-controllable 3D scaffolds with an ordered nano fibrous structure. *Materials Letters*, 160, 343–346.
- McGrance, S. J., Cornell, H. J., & Rix, J. R. (1998). Simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products. *Starch/Stärke*, 50, 158–163.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., & Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91, 380–386.
- Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. d. A., & Menegalli, F. C. (2013). Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids*, 30, 681–690.
- Peng, H., Zhong, S., Lin, Q., Yao, X., Liang, Z., Yang, M., & He, H. (2016). Removal of both cationic and anionic contaminants by amphoteric starch. *Carbohydrate Polymers*, 138, 210–214.
- Sitohy, M. Z., El-Saadany, S. S., Labib, S. M., & Rama, M. F. (2000). Physicochemical properties of different types of starch phosphate monoesters. *Starch - Stärke*, 4, 101–105.
- Smith, R. J., & Caruso, J. (1964). Determination of phosphorus. *Methods in carbohydrate chemistry: starch* (4th ed.). New York: Academic Press.
- Stahl, J. A., Lobato, L. P., Bochi, V. C., Kubota, E. H., Gutkoski, L. C., & Emanuelli, T. (2007). *Physicochemical properties of pinhão (Araucaria angustifolia, Bert. O. Ktze) starch phosphates*. vol. 40, 1206–1214.
- Stijnman, A. C., Bodnar, I., & Hans Tromp, R. (2011). Electrospinning of food-grade polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25, 1393–1398.
- Šukytė, J., Adomavičiūtė, E., & Milašius, R. (2010). Investigation of the possibility of forming nanofibers with potato starch. *Fibers & Textiles*, 18, 24–27.
- Tam, N., Oguz, S., Aydogdu, A., Sumnu, G., & Sahin, S. (2017). Influence of solution properties and pH on the fabrication of electrospun lentil flour/HPMC blend nanofibers. *Food Research International*, 102, 616–624.
- Vanmarcke, A., Leroy, L., Stoclet, G., Duchatel-Crépey, L., Lefebvre, J., Joly, N., & Gaucher, V. (2017). Influence of fatty chain length and starch composition on structure and properties of fully substituted fatty acid starch esters. *Carbohydrate Polymers*, 164, 249–257.
- Vega-Lugo, A.-C., & Lim, L.-T. (2009). Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. *Food Research International*, 42, 933–940.
- Wang, W., Zhou, H., Yang, H., Zhao, S., Liu, Y., & Liu, R. (2017). Effects of salts on the gelatinization and retrogradation properties of maize starch and waxy maize starch. *Food Chemistry*, 214, 319–327.
- Wu, Y., Geng, F., Chang, P. R., Yu, J., & Ma, X. (2009). Effect of agar on the micro-structure and performance of potato starch film. *Carbohydrate Polymers*, 76, 299–304.
- Xie, S. X., Liu, Q., & Cui, S. W. (2005). *Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications* (1th ed.). LLC: Taylor & Francis (Chapter 8).
- Xu, W., Yang, W., & Yang, Y. (2009). Electrospun starch acetate nanofibers: Development, properties, and potential application in drug delivery. *Biotechnology Progress*, 25, 1788–1795.
- Xu, X., Jiang, L., Zhou, Z., Wu, X., & Wang, Y. (2012). Preparation and properties of electrospun soy protein isolate/polyethylene oxide nanofiber membranes. *Applied Materials & Interfaces*, 4, 4331–4337.

7 ARTIGO 2

Aging Time of Soluble Potato Starch Solutions for Ultrafine Fibers Formation by Electrospinning

Laura Martins Fonseca, Francine Tavares da Silva, Mariana Dias Antunes, Shanise Lisie Mello El Halal,* Loong-Tak Lim, and Alvaro Renato Guerra Dias

The objective of this study is to develop a methodology to produce ultrafine fibers of soluble potato starch with normal amylose content by electrospinning, and to evaluate the characteristics of the fibers produced from fiber-forming solutions subjected to different aging times. The fiber-forming polymer solutions are prepared with 40% soluble potato starch (with amylose content of $32.54 \pm 3.65\%$) and formic acid (75%) as solvent. The solutions are allowed to age for 0, 24, 48, and 72 h before electrospinning. Viscosity and electrical conductivity of the solutions are determined. The electrospun fibers are analyzed for morphology, size distribution, and thermal properties, and investigated through Fourier-transform infrared spectroscopy analysis. The shear viscosity of the solutions decreases as aging time increases from 0 to 48 h but did not change upon further aging ($p > 0.05$). The electrical conductivity did not influence the studied properties in the present study such as morphology and size distribution of the fibers. The electrospun fibers show a morphology with beads and average diameter in the range 128–143 nm. The weight loss in thermal properties is lower in the fibers than in the starch. This study shows that soluble potato starch with normal amylose content can be converted into ultrafine fibers by electrospinning like a neat polymer in a fiber-forming solution.

1. Introduction

Electrospinning is a widely employed technique used to produce ultrafine fibers by an electrostatic force that draws a polymeric solution into a mat of fibers.^[1,2] The polymeric solution can be obtained from synthetic or natural polymers. Natural polymers are increasingly used for electrospinning because they are derived from renewable feedstock and also possess other desirable end-use properties such as biodegradability, biocompatibility, and non-toxicity.^[3–6]

L. M. Fonseca, F. T. da Silva, M. D. Antunes, Dr. S. L. Mello El Halal, Prof. A. R. G. Dias
Department of Agroindustrial Science and Technology
Federal University of Pelotas
96010–900 Pelotas, RS, Brazil
E-mail: shanise.fcd@ufpel.edu.br; shanisemell@hotmail.com

L. M. Fonseca, Prof. L.-T. Lim
Department of Food Science
University of Guelph
Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada

DOI: 10.1002/star.201800089

Starch is abundant in nature but the polymer cannot be readily electrospun into ultrafine fibers. This is especially true of starches with high amylopectin content that exhibit branched macromolecular morphology, which restricts molecular movement and precludes alignment for association.^[5] Some reports suggest that high-amylose starch can be electrospun into fibers as its linear amylose macromolecules are more conducive to the chain entanglement required for the formation of a stable polymer jet during electrospinning.^[5,7] Viscosity is another factor that governs the electrospinning behavior of the polymer. High viscosity of starch following gelatinization is an issue that needs to be addressed; viscosity can be varied as a function of solution concentration and solution aging time.^[8,9] Recently, Lancuși et al.^[10] produced fibers from corn starch with high amylose content using formic acid in different concentrations as solvents, and subjecting each solution to different aging times i.e., 2, 6, 24, and 72 h before electrospinning. They reported that aging time changes the solution's rheological properties i.e., its

viscosity, and this, along with the variations in solvent concentration, results in fibers with distinct morphologies.

Other researchers electrospun native starch by incorporating synthetic polymers such as poly(ethylene oxide) (PEO) and polyvinyl alcohol (PVA) in the fiber-forming solution.^[11–13] However, in these cases, starch is not the principal polymer in the resulting fiber. Thus, to the best of our knowledge, there are no studies on the production of fibers using starch with normal amylose content (for potato starch, the normal amylose content ranges from 25% to 30%), and existing studies are focused on fibers produced from starch in combination with other polymers or with high amylose content.^[3,10,14–16]

Starch can be modified via chemical, physical, and enzymatic methods to improve its end-use properties.^[17,18] Acid and enzymatic hydrolysis can yield starch with low viscosity, high water solubility, and increased gel strength.^[19,20] These modifications can potentially increase the electrospinnability of starch. To provide structural integrity, researchers have also thermally cross-linked starch with poly(ethylene-alt-maleic anhydride), and hydroxypropyl starch with PEO.^[21,22]

The use of nanotechnology has been growing in the industry as materials such as ultrafine fibers of pure starch have high

potential for application in several areas including food packaging, drug release, cosmetics, and tissue engineering. Furthermore, ultrafine fibers of starch are biocompatible and biodegradable; this is critical for applications such as drug release that require increased bioavailability, which influences encapsulation efficiency and behavior control.^[5,23]

To our knowledge, there is no research related to the use of soluble potato starch as a neat polymer to produce electrospun fibers. The objective of this study was to develop a methodology to produce ultrafine fibers of soluble potato starch with normal amylose content by electrospinning, and to evaluate the characteristics of the fibers produced from fiber-forming solutions subjected to different aging times.

2. Experimental Section

2.1. Materials

Soluble starch from potato was obtained from Sigma–Aldrich (C₆H₁₀O₅, CAS 9005-84-9). The amylose content was 32.54 ± 3.65% as determined in the laboratory by McGrance et al.^[24] Formic acid (88% purity, CAS 64.18–6), purchased from Fisher Chemical, was used as solvent.

2.2. Electrospinning

Preliminary experiments showed that fiber-forming solutions at starch concentrations of 20% and 30% w/v in formic acid (75%) did not produce ultrafine fibers (data not shown). Therefore, a fiber-forming solution was prepared at a starch concentration of 40% w/v. The solution was prepared by dissolving 4 g of soluble potato starch in a solution of 10 mL of formic acid (75%). To complete starch dissolution and gelatinization, the solution was stirred for 24 h and electrospun after aging for 0, 24, 48, and 72 h. The electrospinning parameters used were as follows: spinneret-collector distance of 15 cm; fiber-forming solution flow rate of 0.8 mL h^{−1}; applied voltage of 15 kV; temperature of 25 ± 2 °C; and relative humidity of 20 ± 2%. The fibers were stored at room temperature (25 ± 2 °C) for further analysis.

2.3. Viscosity and Electrical Conductivity of Polymeric Solution

The viscosity of the fiber-forming solution was analyzed using a rheometer (Rheostress RS 150, Germany) with a temperature controller (Hooke DC 50, Germany). A cone-plate geometry was used, with a rotating cone (C 60) of diameter 60 mm, angle 2°, and gap 0.104 mm. A rotatory shear deformation test was performed with shear rate ($\dot{\gamma}$) in the range 0.1–100 s^{−1} for 300 s at 25 °C. The rheological parameters were analyzed according to the Herschel–Bulkley model:

$$\tau = \tau_0 + k(\dot{\gamma})^n \quad (1)$$

where τ is the shear stress (Pa), τ_0 is the yield stress (Pa), k is the consistency index (Pa.s), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s^{−1}), and n is the flow behavior index.

The electrical conductivity of the fiber-forming solution was analyzed according to Antunes et al.,^[25] using a portable conductivity meter (MS Tecnopon, model mCA 150P, Brazil). All measurements were taken in triplicate at room temperature (25 ± 2 °C).

2.4. Morphology and Size Distribution of Ultrafine Fibers of Soluble Potato Starch

Surface micrographs of the ultrafine fibers were obtained from a scanning electron microscope (Quanta FEG 250, USA). Before the analysis, the samples were sputter-coated with gold in a vacuum chamber (Denton Vacuum in Sputtering DESK V, USA). The samples were examined using a voltage acceleration of 10 kV. The average diameter and the diameter distribution of the nanofibers were evaluated using the software ImageJ on the basis of 60 randomly selected nanofibers.

2.5. Thermal Gravimetric Analysis (TGA) of Soluble Potato Starch and Its Ultrafine Fibers

The thermal properties of potato starch and the resulting electrospun fibers were evaluated using a thermogravimetric analyzer (TGA, TA-60WS, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The analysis was performed using platinum capsules containing about 4 mg of samples, which were heated from 30 to 600 °C at 30 °C min^{−1}. Nitrogen flow was 50 mL min^{−1}. An empty platinum dish was used as reference.

2.6. Fourier-Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy Analysis of Soluble Potato Starch and Electrospun Starch Ultrafine Fibers

The functional groups of potato starch and its electrospun fibers were studied using FT-IR spectroscopy. The spectra were obtained using an IRPrestige21 spectrometer (Shimadzu Corp.) equipped with an attenuated total reflection (ATR) accessory (Pike Tech, Madison, WI). The samples were placed on the ATR crystal and analyzed at room temperature (25 ± 2 °C). Tests were taken in an average of 40 scans for each sample at a resolution of 4 cm^{−1}.

2.7. Statistic Analysis

Analytical determinations were performed in triplicate, except for the TGA and FT-IR analysis, and standard deviations were reported. The average diameter of the ultrafine fibers were evaluated using 60 randomly selected nanofibers. Means were compared by Tukey's test at 5% level of significance by analysis of variance (ANOVA).

3. Results and Discussion

3.1. Electrospinning

The polymeric solution with 40% (w/v) soluble potato starch and formic acid 75% (v/v) was successfully electrospun, forming a

thin membrane (Figure S1, Supporting Information). Previous tests were performed with less concentration of starch (20% and 30%) and the solution does not formed nanofibers (data not shown). The fibers fabrication was optimized by testing electrospinning parameters as voltage, flow rate, and spinneret-collector distance. As the optimal combination of this parameters was achieved, it was selected the methodology for fibers fabrication.

3.2. Viscosity and Electrical Conductivity of Polymeric Solution

The Herschel–Bulkley model is widely utilized for starch solutions because the flow curves exhibit yield stress (τ_0).^[26–29] The Herschel–Bulkley model described the viscosity data accurately with the values of the coefficients of determination (R^2) being close to unity (Table 1 and Figure 1). The shear viscosity (η) decreased as the solution aging time increased from 0 to 48 h, as can be observed by the flow curves in the rheogram and the κ values (Table 1); κ is the consistency index and represents the viscosity of the material. However, changes in κ between 48 and 72 h of aging were not significant ($p > 0.05$). This time-dependence of η may be caused by starch hydrolysis, which can decrease fiber-forming viscosity during aging. According to Lancuński et al.,^[10] formic acid-induced chemical gelatinization of starch during prolonged storage can result in macromolecular reorganization, causing phase separation in the form of particles and aggregates that arrests further viscosity. Therefore, to produce consistent electrospun fibers, the fiber-forming solution should be aged to the extent that the starch granules are completely gelatinized but phase separation has not occurred.

Within the range of shear rates explored ($\gamma = 0\text{--}100\text{ s}^{-1}$), the η values for all fiber-forming solutions remain stable irrespective of increase in the shear strain. The value of η ranged 250–350 mPa.s for different solution aging times. A similar result was found by Lancuński et al.,^[10] who reported a η value of 250 mPa.s for high-amylose corn starch solutions prepared in an aqueous solution of formic acid (70%).

The values of the flow behavior index (n) of the fiber-forming solutions were approximately equal to one and that of τ_0 were close to zero (Table 1; the difference was not statistically significant, $p > 0.05$), which is related to the Newtonian model.^[30] However, the Newtonian model did not present a coefficient of determination that fitted.

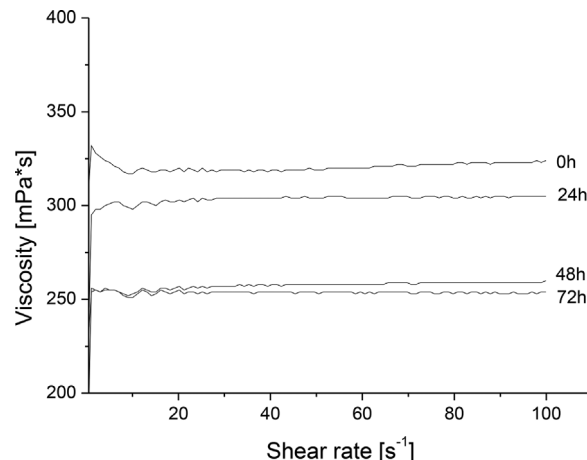


Figure 1. Viscosity of soluble potato starch as a function of shear rate in solutions subjected to different aging times.

Przetaczek-Rożnowska^[27] applied the Herschel–Bulkley model to analyze native potato starch solutions (5% starch in water) and reported a κ value of $3.95 \pm 0.13\text{ Pa.s}^n$. A similar κ value of $4.95 \pm 0.03\text{ Pa.s}^n$ was reported by Fortuna et al.^[26] for a 5% potato starch in water solution. The κ values found in the present study for a 40% starch in formic acid solution were lower, ranging from 0.2539 ± 0.0019 to $0.3207 \pm 0.0012\text{ Pa.s}^n$. The reduced viscosity of the modified potato starch may be an important contributor to the improved electrospinnability of the fiber-forming solutions.^[8] In addition, Przetaczek-Rożnowska^[27] and Fortuna et al.^[26] reported τ_0 values of 4.53 ± 0.23 and $4.88 \pm 0.09\text{ Pa.s}$, respectively. In contrast, despite the higher starch concentration in solution used in the present study, the τ_0 values were lower, indicating that the modified potato starch solutions had lower resistance to initiate flow—a property favorable to initiate jetting during electrospinning.^[31]

The viscosity of the modified starch solutions did not affect the morphology and diameter of the electrospun fibers analyzed. Solutions prepared from native starches were viscous, which prevent the formation of polymer jet. On the other hand, the soluble potato starch solutions were less viscous, which allowed jetting during electrospinning, although the formation of beads is more relevant. Thus, the viscosity of the fiber-spinning solution must be optimized to allow for the molecular chain entanglement essential for the formation of fibers.^[2] On the other hand, the values of electrical conductivity did not show

Table 1. Viscosity and electrical conductivity values of soluble potato starch solutions subjected to different aging times.

Solution aging times [h]	Electrical conductivity [mS.cm^{-1}]	Values of rheological model ^{a)}			
		τ_0 [Pa]	κ [Pa.s^n]	n [–]	R^2
0	2.00 ± 0.02^{ab}	0.0165 ± 0.0002^a	0.3207 ± 0.0012^a	1.0023 ± 0.0028^a	0.9974
24	2.07 ± 0.08^a	0.0534 ± 0.0028^a	0.2968 ± 0.0064^b	0.9896 ± 0.0239^a	0.9985
48	2.04 ± 0.01^a	0.0013 ± 0.0054^a	0.2539 ± 0.0019^c	1.0063 ± 0.0012^a	0.9899
72	1.90 ± 0.01^b	0.0133 ± 0.0033^a	0.2627 ± 0.0039^c	0.9970 ± 0.0028^a	0.9958

^{a,b,c} Values with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

^{a)} Rheological parameters: τ_0 , yield stress; κ , consistency index; n , flow behavior index.

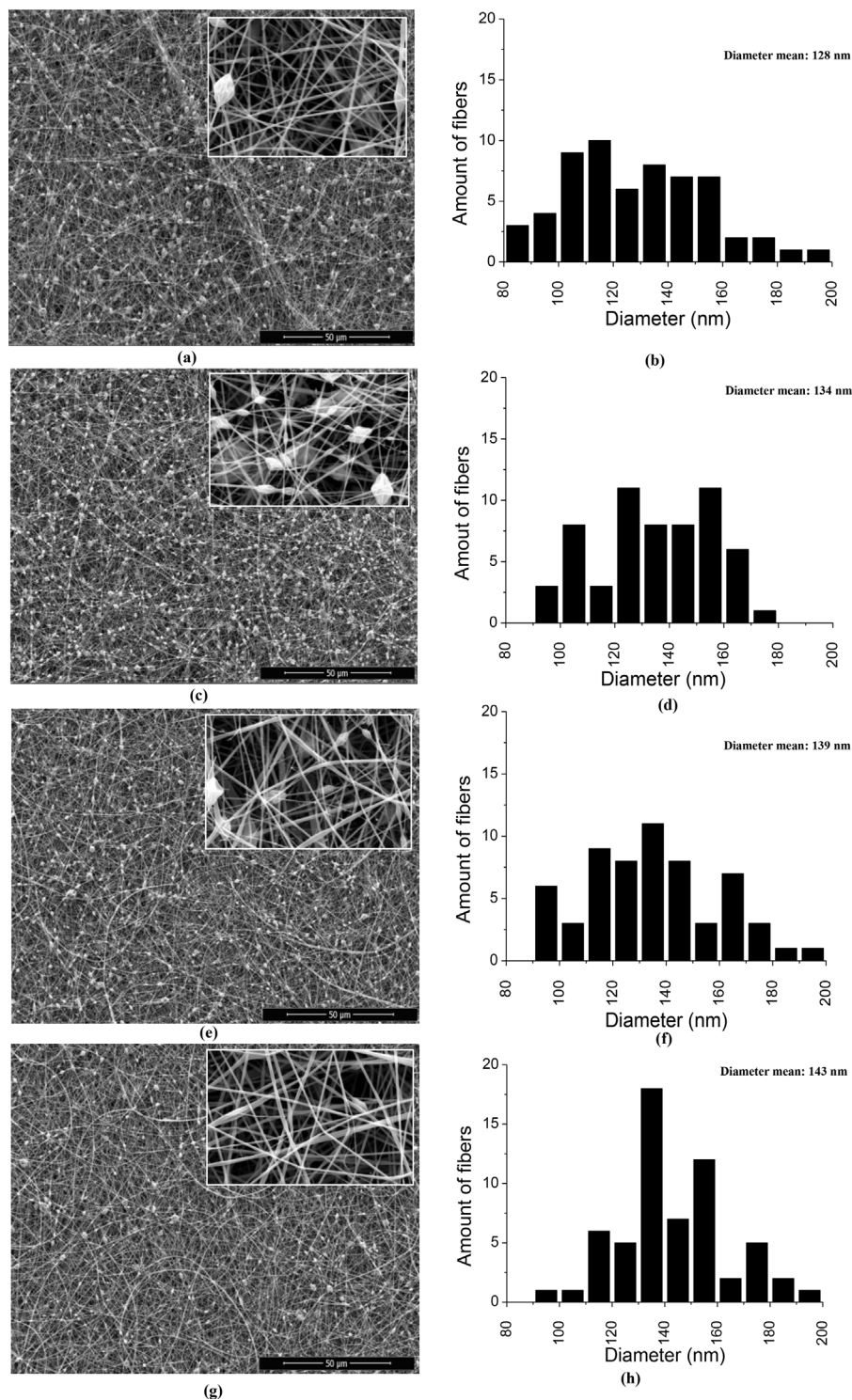


Figure 2. Morphology and size distribution of ultrafine fibers of soluble potato starch in solutions subjected to different aging times a, b) 0 h, c, d) 24 h, e, f) 48 h, and g, h) 72 h.

statistically significant difference ($p > 0.05$) for solutions subjected to 0, 24, and 48 h of aging; this was also the case for solutions with 0 and 72 h of aging (Table 1). The lack of a specific trend indicates that electrical conductivity was not a main determinant of the morphology of the electrospun fibers.

3.3. Morphology and Size Distribution of Ultrafine Fibers of Soluble Potato Starch

The morphology and size distribution of the electrospun fibers of soluble potato starch are shown in Figure 2. The fibers were homogeneous and randomly oriented. All the micrographs showed beads in the fibers. The presence of beads can be attributed to the instability of the polymer jet during electrospinning due to inadequate polymer chain entanglement and the dominant surface tension effect.^[32] This can influence the application of the fibers. According to Li et al.,^[33] who produced starch fibers using centrifugal spinning, amylopectin occasioned the bead formation. Cárdenas et al.^[16] recently produced microfibers from potato starch with high amylose content by electro wet-spinning using dimethylsulfoxide as solvent. The authors produced ribbon-shaped microfibers devoid of beads.

The diameter means of the electrospun fibers did not presented significant difference ($p > 0.05$) with increase in aging time (Figure 2). Cárdenas et al.^[16] reported microfibers from high-amylose potato starch with roughness and agglomerations, and an average diameter of 15–25 μm , which is ten times higher than the values in this study. This can be attributed mostly by the modification of starch, being the viscosity of soluble potato starch very low in solution generating thicker fibers. This difference can also occur due to difference in the material, as botanic source and amylose content. Šukytė et al.^[34] studied the production of fibers from PVA with potato starch by electrospinning, and found diameters in a range of ≈ 250 –350 nm.

3.4. TGA of Soluble Potato Starch and Its Ultrafine Fibers

The TGA analysis is important to evaluate the degradation of starch and its ultrafine fibers at high temperatures; this is important if the fibers are to be employed in processes that

Table 2. TGA of soluble potato starch and its ultrafine fibers in solutions subjected to different aging times.

TGA parameters	Soluble potato starch	Soluble potato starch nanofibers			
		Time [h] ^{c)}			
		0	24	48	72
T_i [°C] ^{a)}	299.75	252.42	241.00	240.14	252.29
T_f [°C] ^{b)}	381.57	369.65	371.94	374.38	378.64
Weight loss of 240–390 °C (%)	78.81	73.22	72.76	75.07	74.26

^{a)} T_i , initial decomposition temperature; ^{b)} T_f , final decomposition temperature; ^{c)} solution time of rest before the electrospinning process.

require high temperatures as in coating packaging thermoformed. The decomposition temperatures, initial (T_i) and final (T_f), as well as the mass weight loss are presented in Table 2. As shown, the aging time influences the decomposition temperatures as well as the weight loss; in the temperature range 240–390 °C, solutions with aging times of 48 and 72 h showed greater weight loss than other solutions. In addition, soluble potato starch showed greater weight loss than did the electrospun fibers. Even though the differences in the thermal properties of the ultrafine fibers were slight, higher solution aging times (48 and 72 h) corresponded to greater weight loss. The ultrafine fibers started to degrade earlier than did pure starch, which is indicated by the higher T_i for starch.

During the TGA analysis, starch weight loss occurs because of thermal degradation of the polysaccharide chains.^[35] Gelatinization of starch occurs in excess water and at high temperatures. However, by using formic acid, it is possible to gelatinize starch through chemical gelatinization that entails disruption of starch into amylose and amylopectin macromolecules and aggregates.^[36,37] The solvent evaporates during electrospinning, causing the entanglement of polymer chains essential for the formation of fibers.^[14] Thus, the composition of the fibers is pure starch, and that could explain the similarity in the thermal properties of starch and its ultrafine fibers. However, in the fiber-forming solution occurs intermolecular interactions between the solvent and starch, which maintain the chains entanglement after the electrospinning process, and this can strengthen the material causing lower degradation and lower weight loss. Cárdenas et al.^[16] evaluated the thermal properties of the microfibers of potato starch with high amylose content, and found a T_i of 250 °C and a weight loss of 60%, which is 22.07% lower than the highest value found in the present study.

3.5. FT-IR Analysis of Soluble Potato Starch and Electrospun Ultrafine Starch Fibers

The FT-IR spectra showed similar vibrational behaviors among the samples (Figure 3). The large band at 3305 cm^{-1} is attributed to the hydroxyl (OH) group stretching. The band at 2931 cm^{-1} corresponds to the C–H group stretching.^[38,39] The amide III vibration is characterized by the bands at 1647 cm^{-1} (C=O) and at 1338 cm^{-1} (NH).^[40] The vibration at 1143 and 1076 cm^{-1} indicates the presence of –C–O– of glucose (C–O deformation).^[38–40] The band at 995 cm^{-1} describes the amorphous part of the starch structure.^[40] Cárdenas et al.,^[16] who produced microfibers of potato starch with high amylose content, also found similar bands in the FT-IR spectra with no dislocation between the bands of starch and starch microfibers.

A small displacement in the bands from soluble potato starch (2931, 1647, 1338, 1076, and 991 cm^{-1}) was observed when compared with those of ultrafine fibers in solutions with different aging times (Table 3). During the chemical gelatinization of the starch and formic acid solutions, reorganization occurs, and starch macromolecules tend to aggregate as a function of solution aging times.^[10] This observation suggests interactions between the hydrogen bounds of starch and the solvent, and may be the reason for the small displacement in the bands observed when the same fiber-forming solution is compared at different aging times.

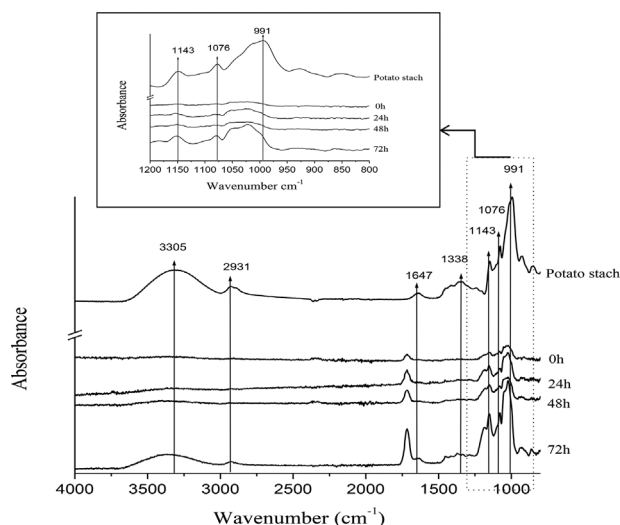


Figure 3. FT-IR spectra of soluble potato starch and its ultrafine fibers in solutions subjected to different aging times.

In the electrospinning process, the solvent used in the fiber-forming solution totally evaporate. This can be evidenced by the fibers spectra that in 0, 24, and 48 h of solution aging time did not reported a hydroxyl group band. Even though, in the 72 h of aging time the spectra present a hydroxyl group it can be related to the absorption of humidity from the environment once the FTIR analysis was made by ATR.

4. Conclusions

Soluble potato starch with normal amylose content showed potential to produce ultrafine fibers by electrospinning. The aging time of the solution influenced the viscosity of the fiber-forming polymer solution. The solutions showed a Newtonian behavior. The ultrafine fibers presented a cylindrical and homogeneous morphology with several beads, and with average diameter in the range 128–143 nm. Electrical conductivity was not found to be influential in determining the characteristics of the ultrafine fibers produced from solutions with different aging

Table 3. FT-IR bands for soluble potato starch and its ultrafine fibers in solutions subjected to different aging times.

Soluble potato starch FT-IR bands vibrations [cm ⁻¹]	Soluble potato starch ultrafine fibers Solution aging time [h]			
	0	24	48	72
3305	3363	3348	3390	3360
2931	2906	2924	2926	2922
1647	1720	1714	1710	1712
1338	1363	1355	1363	1348
1143	1145	1149	1149	1149
1076	1076	1078	1083	1084
991	1014	1016	1037	1018

times. The thermal properties of the ultrafine fibers were similar to those of starch, with a slight reduction in mass weight loss. The ultrafine fibers showed the same functional groups as that of starch, with some displacement in the bands, which indicates interactions in the solution as a function of aging time. Future studies are necessary to explore the methodology to produce fibers with starch with normal amylose content as a neat polymer and with improved properties such as mechanical strength and water solubility for further use in applications such as in food packaging or drug release in the biomedical field.

Abbreviations

ATR, attenuated total reflection; PEO, poly(ethylene oxide); PVA, polyvinyl alcohol; TGA, thermal gravimetric analysis.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors would like to thank CNPq (448800/2014-4) and CAPES (88881.062166/2014-01).

Keywords

electrospinning, soluble potato starch, starch ultrafine fibers

Received: March 20, 2018

Revised: May 11, 2018

Published online: July 22, 2018

- [1] A.-C. Vega-Lugo, L.-T. Lim, *J. Biobased Mater. Bio.* **2008**, 2, 223.
- [2] N. Bhardwaj, S. C. Kundu, *Biotechnol. Adv.* **2010**, 28, 325.
- [3] L. Kong, G. R. Ziegler, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 2247.
- [4] D. Lubasova, J. Mullerova, A. N. Netravali, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, 132, 756.
- [5] G. Liu, Z. Gu, Y. Hong, L. Cheng, C. Li, *J. Control. Release* **2017**, 252, 95.
- [6] Y. P. Neo, S. Swift, S. Ray, M. Gizdavic-Nikolaidis, J. Jin, C. O. Perera, *Food Chem.* **2013**, 136, 1013.
- [7] T. Hemamalini, V. R. G. Dev, *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 106, 712.
- [8] J. G. Ledezma-Oblea, E. Morales-Sánchez, M. Gaytán-Martínez, J. D. Figueroa-Cárdenas, V. A. Gaona-Sánchez, *Rev. Mex. Ing. Quím.* **2015**, 14, 497.
- [9] B. Murúa-pagola, C. I. Beristain-guevara, F. Martínez-bustos, *J. Food Eng.* **2009**, 91, 380.
- [10] A. Lancuški, G. Vasilyev, J.-L. Putaux, E. Zussman, *Biomacromolecules* **2015**, 16, 2529.
- [11] J. Sunthornvarabhas, K. Thumanu, W. Limpirat, H.-J. Kim, K. Piyachomkwan, K. Sriroth, *Infrared Phys. Technol.* **2014**, 66, 141.
- [12] J. Sunthornvarabhas, P. Chatakanonda, K. Piyachomkwan, K. Sriroth, *Materials Lett.* **2011**, 65, 985.
- [13] S. Tang, Z. Zhao, G. Chen, Y. Su, L. Lu, B. Li, D. Liang, R. Jin, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2015**, 77, 594.

- [14] L. Kong, G. R. Ziegler, *Food Hydrocoll.* **2014**, 36, 20.
- [15] W. Wang, X. Jin, Y. Zhu, C. Zhu, J. Yang, H. Wang, T. Lin, *Carbohydr. Polym.* **2016**, 140, 356.
- [16] W. Cárdenas, E. Y. Gómez-Pachon, E. Muñoz, R. Vera-Graziano, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. **2016**, 138, 134–146.
- [17] K. Alvani, R. F. Tester, C. Lin, X. Qi, *Food Hydrocoll.* **2014**, 36, 273.
- [18] J. Zhao, Z. Chen, Z. Jin, P.-B. Waard, P. Buwalda, H. Gruppen, H. A. Schols, *Carbohydr. Polym.* **2015**, 131, 424.
- [19] D. Li, N. Yang, X. Zhou, Y. Jin, L. Guo, Z. Xie, *Food Hydrocolloids* **2017**, 71, 198.
- [20] D. Li, X. Li, O. Lamikanra, Q. Luo, Z. Liu, J. Yang, *Food Chem.* **2017**, 229, 57.
- [21] B. Oktay, E. Basturk, N. Kayaman-apohan, M. V. Kahraman, *Polym. Composites* **2013**, 34, 1321.
- [22] I. Silva, M. Gurruchaga, I. Goni, M. Fernández-Gutiérrez, B. Vásquez, J. S. Román, *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, 105, 312.
- [23] D. W. Hobson, *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology*. Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc, **2009**, pp. 189–202.
- [24] S. J. McGrance, H. J. Cornell, J. R. Rix, *Starch/Stärke* **1998**, 50, 158.
- [25] M. D. Antunes, G. S. Dannenberg, A. M. Fiorentini, V. Z. Pinto, L.-T. Lim, E. R. Zavareze, A. R. G. Dias, *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 104, 874.
- [26] T. Fortuna, D. Gałkowska, M. Baczakowicz, K. Szkabar, I. Tartanus, M. Łabanowska, M. Kurdziel, *Starch/Stärke* **2013**, 65, 912.
- [27] I. Przetaczek-Rożnowska, *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 101, 536.
- [28] X. Li, Y. Wang, B. H. Lee, D. Li, *Food Hydrocolloids* **2017**, 75, 88.
- [29] W. Berski, A. Ptaszek, P. Ptaszek, R. Ziobro, G. Kowalski, M. Grzesik, B. Achremowicz, *Carbohydr. Polym.* **2010**, 83, 665.
- [30] F. Xie, P. J. Halley, L. Avérous, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, 37, 595.
- [31] A. C. Stijnman, I. Bodnar, R. Hans Tromp, *Food Hydrocolloids* **2011**, 25, 1393.
- [32] D.-N. Nguyen, Y. Hwang, W. Moon, *Eur. Polym. J.* **2016**, 77, 54.
- [33] X. Li, H. Chen, B. Yang, *Carbohydr. Polym.* **2016**, 137, 459.
- [34] J. Šukytė, E. Adomavičiūtė, R. Milašius, *Fiber Textiles* **2010**, 18, 24.
- [35] A. Vanmarcke, L. Leroy, G. Stoclet, L. Duchatel-crépy, J. M. Lefebvre, N. Joly, V. Gaucher, *Carbohydr. Polym.* **2017**, 164, 249.
- [36] T. Divers, E. Balnois, *Carbohydr. Polym.* **2007**, 68, 136.
- [37] T. Divers, I. Pillin, J. Feller, G. Levesque, Y. Grohens, *Starch/Stärke* **2004**, 56, 389.
- [38] J. M. Fang, P. A. Fowler, J. Tomkinson, C. A. S. Hill, *Carbohydr. Polym.* **2002**, 47, 245.
- [39] J. Hong, R. Chen, X.-A. Zeng, Z. Han, *Food Chem.* **2016**, 192, 15.
- [40] F. M. Pelissari, M. M. Andrade-mahecha, P. J. A. Sobral, F. C. Menegalli, *Food Hydrocolloids* **2013**, 30, 681.

8 ARTIGO 3



Development of antimicrobial and antioxidant electrospun soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol

Laura Martins Fonseca^{a,b,*}, Claudio Eduardo dos Santos Cruxen^a, Graziella Pinheiro Bruni^{a,b},
Ângela Maria Fiorentini^a, Eleessandra da Rosa Zavareze^a, Loong-Tak Lim^b, Alvaro Renato Guerra Dias^a

^a Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

^b Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, ON N1G2W1, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2019

Received in revised form 21 July 2019

Accepted 10 August 2019

Available online 12 August 2019

Keywords:

Starch nanofibers

Carvacrol

Electrospinning

Electrospun nonwovens

Antimicrobial

Antioxidant

ABSTRACT

In this study, a method was developed to encapsulated carvacrol in nanofibers from soluble potato starch. The carvacrol was added in starch solutions at various concentrations (0, 20, 30 and 40% v/v) and electrospun into fibers. The morphology, size distribution, thermal stability, FT-IR spectra, relative crystallinity (RC) and antioxidant of the electrospun fibers were analyzed. For mechanical properties and antimicrobial activities evaluation electrospun nonwovens were obtained. The carvacrol-loaded nanofibers showed homogeneous morphology and average diameters ranging from 73 to 95 nm. The carvacrol encapsulated in the nanofibers had greater thermal stability than the free carvacrol. FT-IR analysis showed interactions between starch and carvacrol. The RC of the nanofibers was approximately 40%. The electrospun nonwovens mechanical properties did not present significant differences ($p < 0.05$). The 40% carvacrol-loaded nanofibers exhibited higher antioxidant activity with 83.1% of inhibition. The electrospun nonwoven loaded with 30% carvacrol resulted in 89.0% reduction of *Listeria monocytogenes*, 68.0% for *Salmonella Typhimurium*, 62.0% for *Escherichia coli* and 49.0% for *Staphylococcus aureus*. These electrospun nonwovens sustained antimicrobial activity for at least 30 days against *S. aureus*. The starch nanofibers are promising materials for application as a vehicle for carvacrol release in antimicrobial and antioxidant food packages.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Currently, driven by high demand, the food sector has been demanding innovations in several products. One of the innovations is related to the of food packaging where the requirement has become a package that is not only designed to contain and protect, but also a package that interacts in a positive way, promoting benefits, whether for the food or for the consumer. In this context, active or intelligent packaging appears as an alternative to attend the demands of the food sector. Researchers have focused their studies on the development of packaging from the use of nanotechnology, which is growing in the food science and food industry.

Materials at nanometric scale, such as nanofibers, can be incorporated with bioactive compounds, for application as active packaging. These packages are used as food preservation technique and intended to extend the shelf life of food products, while maintaining its nutritional and sensory value. Active packages can be produced with the

use of bioactive compounds such as antimicrobials, antioxidants, oxygen absorbent, odors and moisture control, among others [1,2].

Among the bioactive compounds, essential oils, or its compounds, are used as antioxidant and antimicrobial agents. Carvacrol is the major component of oregano or thyme oils; it can accumulate on the cell membrane of a bacteria resulting in an increase of about 90% in cellular permeability of the microorganism, preventing its development and causing dehydration in bacterial cells. Thus, its use in active packaging as an antimicrobial agent may be effective on the inhibition of pathogenic microorganisms that cause food-borne illnesses [3]. Carvacrol can also act as an antioxidant agent by controlling its release in packages for food products that are susceptible to oxidation during storage [4].

Electrospinning is a technique which produces nanoscale materials that can be used for active package formation within the nanofibers, as an electrospun nonwoven, inside the package [1,2]. There are several studies regarding the use of electrospinning to produce materials for bioactive compounds incorporation directly in the polymeric matrix, as fibers with antimicrobial activity from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex [5], or protein fibers loaded with ginger essential oil [6]. There are also fibers with antioxidant activity by the use of zein to encapsulate gallic acid [7,8] or fish oil [9]. In most of these studies, it was observed that bioactive compounds incorporated

* Corresponding author at: Pelotas, Rio Grande do Sul, 96010-900, Brazil.

E-mail addresses: lmfonseca@ufpel.edu.br (L.M. Fonseca), llim@uoguelph.ca (L.-T. Lim).

into polymer matrices retained their functionality. The incorporation of bioactives in nanofibers is effective acting as antimicrobial and/or antioxidant [10]. Electrospun fibers are produced through a fiber-forming solution from synthetic or natural polymers, as proteins or polysaccharides [6,11]. However, nanomaterials from natural polymers have high potential for the substitution of synthetic polymers, due to their biocompatibility, biodegradability and low cost [11].

Starch is widely applied in the food and food packaging industries because of its versatility, biodegradability, low cost, and abundance [12]. There are studies reporting the production of starch electrospun fibers with amylose content $\geq 70\%$ (w/w) or combined with synthetic polymers [11,13–15]. Our research group studied the production of native and anionic corn starch ultrafine fibers with different amylose contents that exhibited different morphologies and average diameter in a range of 70 to 264 nm [16]. Another study carried out by our group, reported the production of ultrafine fibers from soluble potato starch with continuous and beaded fibers of diameters in a range of 128 to 143 nm [17]. The fibers in our previously studies could be applied in food packaging as a bioactive carrier.

The objective of this study was to develop a method to encapsulate carvacrol in electrospun nanofibers derived from soluble potato starch. Physical, thermal and mechanical properties, as well as the antimicrobial and antioxidant activities of the electrospun fibers were characterized.

2. Material and methods

2.1. Materials

Soluble starch from potato ($(C_6H_{10}O_5)_n$, Sigma-Aldrich, CAS 9005-25-8) with $32.5 \pm 3.6\%$ of amylose content, as determined in a previously study [17], was used as polymer matrix for fiber formation. Formic acid was used as solvent (85% purity, Synth, CAS 01A1034.01). Carvacrol was purchased from Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$ purity, CAS 499-75-2). Antioxidant activity was assayed using ABTS $\cdot^+$ + (2,2-azino bis (3-ethylbenzo thiazoline-6- sulfonic acid) diammonium salt, CAS 30931-67-0). Antimicrobial activity of the electrospun nonwovens was evaluated against four foodborne pathogens: *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* O:157H:7 (NCTC 12900) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933).

2.2. Preparation of fiber-forming polymeric solutions

The polymeric solutions were prepared with soluble potato starch 50% in formic acid 75% (5 g of starch dissolved in 10 mL of a solution with formic acid and deionized water) as defined in preliminary tests. The solutions were stirred for 24 h to achieve starch gelatinization and then allowed to age for more 24 h. Carvacrol was added to the starch solution at different concentrations in dry bases (20, 30 or 40%, v/v) and stirred for 15 min, followed by electrospinning. The starch solution without carvacrol was used as control.

2.3. Rheological measurements of the fiber-forming solutions

The rheological parameters of the fiber-forming solutions were measured using a programmable rheometer (Brookfield, Model DV – III ULTRA, USA). The solution was poured (approximately 0.5 mL) in a stainless-steel recipient coupled to the rheometer with a $n^\circ 51$ spindle and analyzed at shear rate of $\dot{\gamma} = 0\text{--}100\text{ s}^{-1}$. The power law model (Eq. (1)) was applied to determine the apparent viscosity “ η_{ap} ” at 55 s^{-1} , the consistency coefficient “ κ ” (Pa $\cdot$ s) n and the flow behavior index “ n ” (unitless)

$$\sigma = \kappa \times \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

where σ is the shear stress applied (Pa) and $\dot{\gamma}$ the shear rate (s^{-1}).

2.4. Electrospinning process

Soluble potato starch nanofibers for carvacrol encapsulation were produced using an electrospinning apparatus equipped with a power supply (INSTOR, INSES-HV30, Brazil) and a syringe infusion pump (KD Scientific, Model 100, Holliston, England). The fiber-forming solution was loaded into a 3 mL plastic syringe attached with a 0.7 mm diameter stainless-steel spinneret needle positioned 20 cm away from a grounded stainless-steel collector plate. The nanofibers were electrospun at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) controlled by an air conditioner and a relative humidity set at $45 \pm 2\%$ with a dehumidifier. The solution was pumped at a steady flow-rate of $0.60\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ and an applied voltage of $+25.0\text{ kV}$ and -3.0 kV . For mechanical properties and the antimicrobial analysis, 4 mL of the fiber-forming solutions were used to electrospun nonwovens for standardization of the thickness of the samples.

2.5. Soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol characterization

2.5.1. Morphology and size distribution of the nanofibers

The nanofibers morphology was analyzed by a scanning electron microscope (SEM, Jeol, JSM-6610LV, USA). The samples were sputter-coated with gold and analyzed using a voltage acceleration of 10 kV. The size distribution and the average diameter were obtained with the SEM micrographs on the basis of fifty randomly selected nanofibers, using ImageJ software (2015 version).

2.5.2. Thermal stability of the nanofibers

The thermal stability of the nanofibers and its constituents (soluble potato starch and carvacrol) was determined by a thermogravimetric analyzer (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japan). The samples, about 5 mg, were heated in platinum capsules with heating rate of $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ in a range of $30\text{--}600^\circ\text{C}$ and nitrogen flow of $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. An empty platinum capsule was used as the reference.

2.5.3. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy of the nanofibers

The infrared spectrum of the nanofibers and its constituents (soluble potato starch and carvacrol) was obtained by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometer equipped with an attenuated total reflection (ATR) accessory (IR-affinity, Shimadzu, Japan). The analysis was performed at a spectral resolution of 4 cm^{-1} , with 120 scans, with the wavenumber range of $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.5.4. X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimeter analysis (DSC) of the nanofibers

The relative crystallinity (RC) of the nanofibers was obtained through the measurements of XRD (RC_1) and DSC (RC_2). For XRD analysis the nanofibers were placed in a sample holder and evaluated by diffractometer X-ray (D8 Advance Bruker, Germany), with a scan range of 5 to $60^\circ (2\theta)$, 30 kV voltage and 30 mA current. The RC_1 was calculated using the Eq. (2), where A_c is the area of the crystalline signals and A_a is the area of the amorphous signal in the X-ray diffractogram.

$$\text{RC}_1(\%) = \frac{A_c}{A_c + A_a} \times 100 \quad (2)$$

DSC analysis was performed in a differential scanning calorimetry (TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japan). Approximately 2.5 mg of the nanofibers were weighed directly in an aluminum pan which was hermetically sealed. The sample pans were then heated from 30 to 200°C at a rate of $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. An empty pan was used as control. The RC_2 was calculated by Eq. (3) where ΔH_m indicates the melting enthalpy of the nanofibers calculated from DSC thermogram and ΔH_m^0 represents the

melting enthalpy for 100% crystalline starch ($469.60 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$) calculated by extrapolation.

$$\text{RC}_2(\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100 \quad (3)$$

2.5.5. Thickness and mechanical properties of the electrospun nonwovens

The electrospun nonwovens thickness was determined by a digital micrometer (Gauge Stainless Micrometer, Digital Caliper, USA), to the nearest 0.001 mm, at five random positions. The mechanical properties of the electrospun nonwovens were conducted by tensile tests using a Texture Analyzer (TA.XTplus, Stable Micro Systems, USA) based on the ASTM D-882-91 [18]. Were measured the tensile strength (TS), percentage of elongation at break (E) and the elastic modulus using the average thickness in the calculations.

2.5.6. Antioxidant activity of the nanofibers

The antioxidant activity of the nanofibers was evaluated according to Freitas et al. [19], with modifications, by the ABTS• + radical elimination method. The ABTS• + radical formation was prepared by a stock solution of ABTS• + 5 mL (7.4 mM) and 88 mL of sodium persulfate (140 mM) which was left in the dark for 16 h. The stock solution was diluted with distilled water until achieve $0.70 \pm 0.05 \text{ nm}$ at 734 nm. The nanofibers (30 μL) was added in 15 mL falcon tubes, with 3.0 mL of the recently prepared ABTS• + radical and it was mixed in vortexed for 30 s and then left 6 min in the dark at room temperature. The reading was performed at 734 nm and for the control distilled water was used. The results were calculated by Eq. (4) and presented as percentage of inhibition, where $\text{ABS}_{\text{fibers}}$ is the absorbance measured for the nanofibers and $\text{ABS}_{\text{carvacrol}}$ is the absorbance measured for the pure carvacrol.

$$\text{Inhibition}(\%) = \left(\frac{\text{ABS}_{\text{fibers}} - \text{ABS}_{\text{carvacrol}}}{\text{ABS}_{\text{fibers}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

2.6. Antimicrobial analysis

2.6.1. Antibacterial activity of carvacrol by micro-atmosphere assay

The methodology for carvacrol evaluation was performed following Ghabraie et al. [20], with modifications. *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *E. coli* O:157H:7 (NCTC 12900) or *S. aureus* (ATCC 25933) (10^6 CFU mL^{-1}) were inoculated on trypticase soy agar (TSA, K25-610052, KASVI, Italy). Then, 20 μL of carvacrol (concentrations of 0, 10, 20, 30 and 40%) was inoculated upon sterile disc, which was placed in the middle of the lid of plates (headspace of 44.5 cm^3). The plates were inverted, sealed with parafilm, and incubated at 37°C for 24 h. The antimicrobial activity was expressed in millimeters of inhibition zone (mm).

2.6.2. Antibacterial activity of the electrospun nonwovens loaded whit carvacrol by micro-atmosphere assay

The electrospun nonwovens were analyzed for antimicrobial activity shortly after their production. The carvacrol concentration (30% v/v) in electrospun nonwovens was selected according to the results obtained in Section 2.6.1. This method was performed according to Dannenberg et al. [21], with some modifications. Initially, the cultures of *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* and *S. aureus*, (10^3 CFU mL^{-1}) were inoculated on TSA and the electrospun nonwovens (4.0 cm^2) were positioned in the middle of the lid of plates (headspace of 44.5 cm^3). The plates were inverted, sealed with parafilm, and incubated at 37°C for 24 h. The results were expressed as the inhibition percentage calculated by the differences between the viable cell counts of the treatments and control (electrospun nonwovens without carvacrol, 0%).

A regression model was applied to the data to better understand the biological behavior of *S. aureus* in micro-atmosphere against antimicrobial nonwoven loaded with different concentrations (0, 20, 30 and 40%) of carvacrol. The micro-atmosphere analysis was performed as previously cited in this Section. The model selection was based on a low p value and a high coefficient of determination (R^2).

The antimicrobial activities of the electrospun nonwovens, stored at ambient temperature ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) in a disector for 7, 15 and 30 days, were evaluated against *S. aureus*. The antimicrobial activity was expressed as millimeters of inhibition zone (mm).

2.7. Statistical analysis

Rheological parameters, thickness, mechanical properties, and antioxidant activity were performed at least in triplicate. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test was applied to compare the means at statistical significance level of $p = 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Rheological measurements of the fiber-forming solutions

The rheological parameters of the potato starch solutions with different carvacrol concentrations are presented in Table 1. The power law model fitted to the data (R^2 close to unity) and showed flow behavior index (n) of approximately one, indicating of Newtonian behavior for the solutions. For fiber formation, a reduced n value is an indicative of the polymer chain entanglement, which is important during the electrospinning process [22]. In general, to produce fibers, the starch concentration must exceed the entanglement concentration [11]. The chain entanglement is important for electrospinning to prevent the break-up of polymer jet into droplets [23].

Throughout the shear rate range analyzed (50 s^{-1}), the apparent viscosity (η_{ap}) for the solution with 40% (v/v) of carvacrol was higher ($4.07 \text{ Pa} \cdot \text{s}$, Table 1) than the other solutions with 0 to 30% (v/v) ($2.40 \text{ Pa} \cdot \text{s}$) that differences in η_{ap} values were not significant ($p \leq$

Table 1

Rheological parameters of soluble potato starch fiber-forming solutions; mechanical properties of starch electrospun nonwovens and DSC measurements of the nanofibers loaded with carvacrol (0%, 20%, 30% and 40%, v/v).

Carvacrol (%)	Solution rheological parameters ¹				Electrospun nonwovens mechanical properties			DSC measurements ²		
	n (unitless)	κ ($\text{Pa} \cdot \text{s})^n$ ($\dot{\gamma} = 0\text{--}100 \text{ s}^{-1}$)	r^2	η_{ap} ($\text{Pa} \cdot \text{s}$) ($\dot{\gamma} = 55 \text{ s}^{-1}$)	Thickness (mm)	Tensile strength (MPa)	Elongation (%)	Elastic modulus (MPa)	ΔH_m ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	RC_2 (%)
0	1.12 ± 0.02^a	3.39 ± 0.01^b	0.9994	2.32 ± 0.01^b	0.32 ± 0.01^a	–	–	–	191.11	40.69
20	1.08 ± 0.00^b	2.87 ± 0.26^b	0.9992	2.40 ± 0.04^b	0.32 ± 0.01^a	0.12 ± 0.02^a	14.4 ± 1.9^a	21.8 ± 1.1^a	144.61	30.79
30	1.13 ± 0.00^a	3.63 ± 0.23^a	0.9994	2.22 ± 0.00^b	0.35 ± 0.01^a	0.14 ± 0.01^a	13.6 ± 0.4^a	19.8 ± 2.5^{ab}	213.95	45.56
40	0.99 ± 0.00^c	3.93 ± 0.02^a	0.9994	4.07 ± 0.00^a	0.35 ± 0.00^a	0.18 ± 0.06^a	15.5 ± 1.9^a	13.6 ± 2.6^b	228.31	48.61

Results are expressed as mean ($n = 3$) $\pm$ standard deviation.

a,b,c = Values with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

¹ κ = consistency coefficient, n = flow behavior index, η_{ap} = apparent viscosity.

² DSC measurements in the nanofibers: ΔH_m = melting enthalpy of the nanofibers, RC_2 = relative crystallinity.

0.05). On the other hand, the consistence coefficient (κ), representative of the overall solution apparent viscosity, varied from 2.87 to 3.93 ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)ⁿ as the carvacrol concentration increased from 20 to 30% (v/v). Przetaczk-Rożnowska [24] evaluated the rheological properties of potato starch solutions (5% in water, w/v) through Herschel–Bulkley model and found similar κ value of 3.95 ± 0.13 ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)ⁿ.

Homayouni et al. [25] incorporated carvacrol in solutions of gelatinized and non-gelatinized tapioca starch and reported that the carvacrol addition increased the viscosity in all the shear rates applied. The authors attributed this behavior to an increase in physical interaction between carvacrol and starch, which increases the interfacial and contact area of the particles, thereby increasing the viscosity. In a previously study, we evaluated the rheological parameters of fiber-forming solutions from soluble potato starch (40% w/v), which exhibited a Newtonian behavior. In this study, the solutions presented higher apparent viscosity (in a range of 2.40 to 4.07 $\text{Pa}\cdot\text{s}$) than the previous study, which reported apparent viscosity values ranging from 0.15 to 0.25 $\text{Pa}\cdot\text{s}$ [17]. In general, low viscosities tend to form more beads due to reduced chain entanglement and increased influence of surface tension.

3.2. Soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol characterization

3.2.1. Morphology and size distribution of the nanofibers

The morphology and size distribution of the nanofibers are shown in Fig. 1. The nanofibers without carvacrol (Fig. 1a) showed a ribbon-shaped and a fused morphology. This can be attributed to the low stretching of the solution during the electrospinning process. On the other hand, nanofibers with carvacrol (Fig. 1b, c and d) were homogeneous, cylindrical, and randomly oriented, suggesting that the addition of carvacrol increased the volatilization of the solvent.

In general, fiber-forming solutions of high concentration required a long tip-to-collector distance and high voltage to promote starch molecules alignment in the jet [26]. In the present study, we applied a relatively high starch concentration (50% w/v), although the solution did not result in high viscosity in formic acid solvent (Table 1). Moreover, the addition of carvacrol rendered the starch solution more electrospinnable than the neat starch solution. In our previously study, ultrafine fibers were produced from soluble potato starch, with beaded-fiber morphologies with an average diameter range of 128–143 nm [17]. Aiming at obtaining fibers with reduced diameter and less beaded fibers, the parameters of the solutions and the electrospinning process conditions were altered in the present study, producing bead-less nanofibers of 73 to 95 nm in diameter. These nanofibers may be useful carriers for controlled release of carvacrol for antimicrobial and antioxidant food packaging applications.

3.2.2. Thermal stability of the nanofibers

The thermal stability of the nanofibers was evaluated using thermogravimetric (TG) analysis. The weight loss and first derivative thermograms are present in Fig. 2a and Fig. 2b, respectively. The nanofibers without carvacrol (0%) had a similar behavior as the pure soluble potato starch with two-stage weight loss. The first stage at approximately 100 °C can be attributed to moisture evaporation, and the second stage around 250–300 °C due to the starch decomposition. These observations are in accordance with those obtained in our previously study [17]. The free carvacrol showed one-step weight loss peaked at around 160 °C which was lower than the boiling point (around 240 °C) of carvacrol. As shown, the nanofibers with carvacrol (20, 30 and 40%) showed three-step weight losses; the first stage occurred is at approximately 100 °C, which can be attributed to moisture evaporation. The second stage at around 200–250 °C was likely due to the decomposition of carvacrol degradation. The third stage at 250–300 °C was related to starch decomposition. These results showed that carvacrol has been successfully encapsulated in the starch fibers, and that the nanofibers

loaded with carvacrol had higher thermal stability than the free counterpart. Similar results were obtained by Keawchaon and Yoksan [27], who evaluated the thermal properties of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles and found similar results for carvacrol with one-step weight loss starting at 183.8 °C. These authors pointed out the carvacrol loading into chitosan particles according with the higher decomposition temperature that the nanoparticles presented than free carvacrol. The carvacrol incorporation influences the nanofibers decomposition temperatures as well as its' weight loss.

3.2.3. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy analysis of the nanofibers

The FT-IR spectra of the nanofibers and constituents are presented in Fig. 3. The soluble potato starch had characteristics bands at 3346 cm^{-1} which can be attributed to the stretching vibration related to free inter- and intra-molecular bound hydroxyl groups [28]. The band in 2941 cm^{-1} is due to the C—H stretching and in 1641 cm^{-1} is due to water in the starch [28,29]. The band at 1351 cm^{-1} is related to C—O—H bending or CH_2 deformation [30]. According to Fang et al. [29], the bands at 1153 and 1020 cm^{-1} are attributed to C—O bond stretching. Pelissari et al. [31] reported that for starch, the band around 920 cm^{-1} is attributed to its glycosidic bonds.

The signature bands for carvacrol are located at 3346 cm^{-1} (OH) and 2941 cm^{-1} (CH stretching) from the methyl and isopropyl functional groups on the phenolic rings. The bands at 1423 and 1357 cm^{-1} are related to CH deformation, while bands in 862 and 806 cm^{-1} are typical of carvacrol aromatic ring [27,32]. The bands between 1620 and 1420 cm^{-1} are attributed to C—C stretching of aromatic rings from the carvacrol molecule. The C—O stretching in C—OH band was observed in 1252 cm^{-1} [3].

Regarding the spectra of the nanofibers, in Fig. 3 can be seen that regardless of the carvacrol incorporation no new bands were found. The same was reported by Altan et al. [3], who produced electrospun fibrous films from zein and poly (lactic acid), Wu et al. [33], who produced nanoparticles for thymol and carvacrol encapsulation, Keawchaon and Yoksan [27], who produced carvacrol-loaded chitosan nanoparticles in different concentrations. These authors emphasize that the constituents of these materials were mixed together physically without any chemical reaction. The nanofibers presented a strong band in 1708 cm^{-1} that could be representative of the C=O group from the formic acid used as solvent in the fiber forming solution [34,35]. This carbonyl group band can be attributed to the possible starch hydrolysis that occur when the solution is been formed for the electrospinning process [14].

3.2.4. X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimeter analysis (DSC) of the nanofibers

The relative crystallinity (RC) of the nanofibers was measured using XRD and DSC analysis. X-ray diffraction patterns and relative crystallinity (RC_1) results are shown in Fig. 4. The soluble potato starch exhibited diffraction peaks representative of B-type crystallinity pattern with peaks at 2θ diffraction angles at 5.5 , 15.0 , 17.0 , 19.5 , 22.1 and 23.9° (Fig. 4). This result is in accordance with the literature for X-ray diffractograms from other tubers [36,37].

The X-ray diffractogram did not showed differences between the peaks of the nanofibers (0, 20, 30 and 40% of carvacrol (v/v)) which presented only two peaks around 12.0° and 19.7° . These, along with the RC_1 calculated by XRD that varied from 40.2 to 51.8% and the RC_2 by DSC that varied from 30.7 to 48.6%, indicates that the nanofibers still present a crystallinity even after the starch gelatinization in formic acid and after the electrospinning process. Both RC of the nanofibers increased (with exception of the nanofibers with 20% CRV in the DSC measurement) with the increase of the carvacrol concentration and the increase in the ΔH_m . The differences between the RC_1 and RC_2 values for the same nanofibers can be attributed to the different methods used.

Formic acid can solubilize the starch and cause a possible hydrolyses, disrupting the starch structure and leading to a possible decrease in its

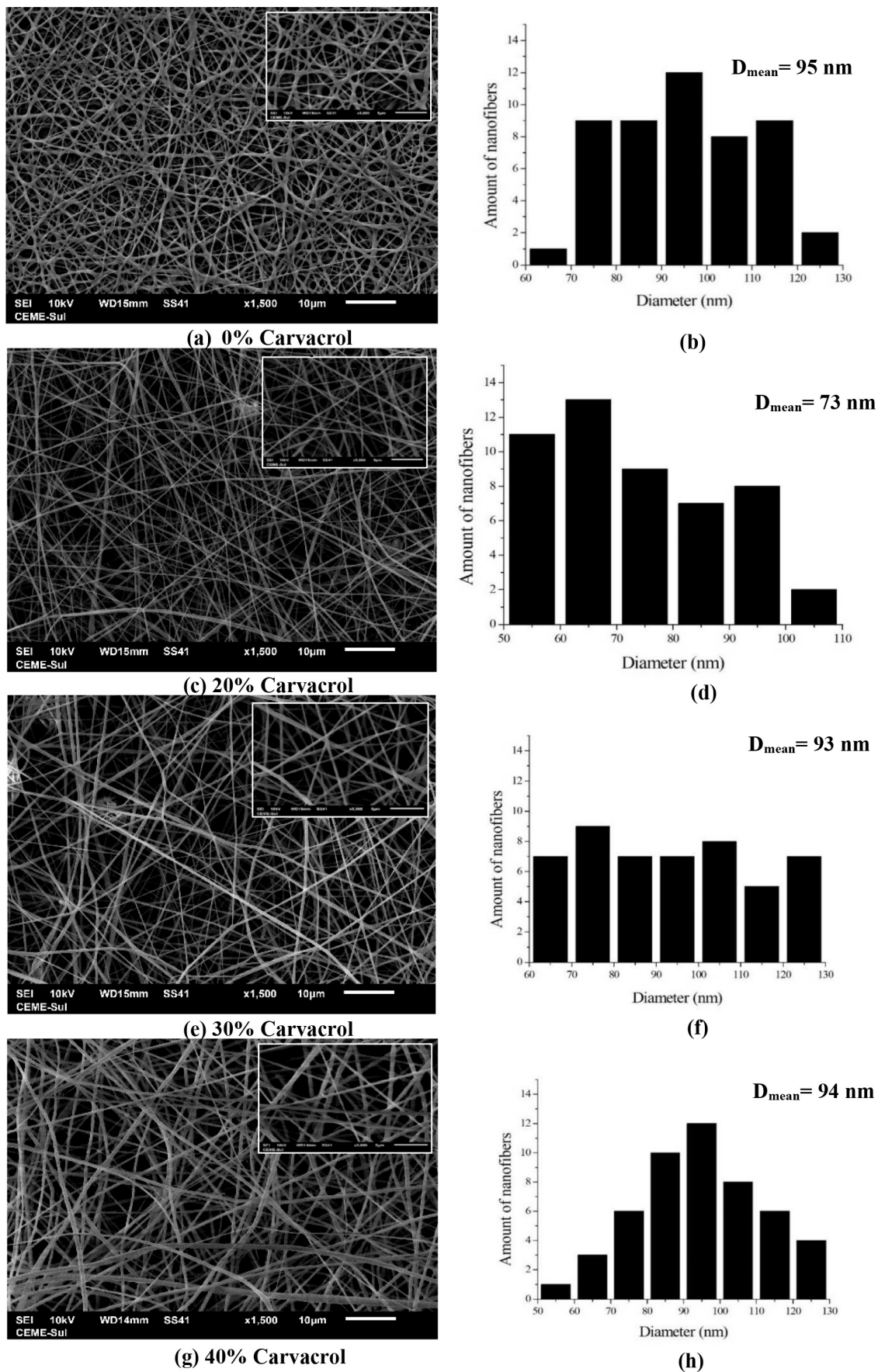


Fig. 1. Morphology and size distribution of soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol 0% (a), 20% (b), 30% (c) and 40% v/v (d).

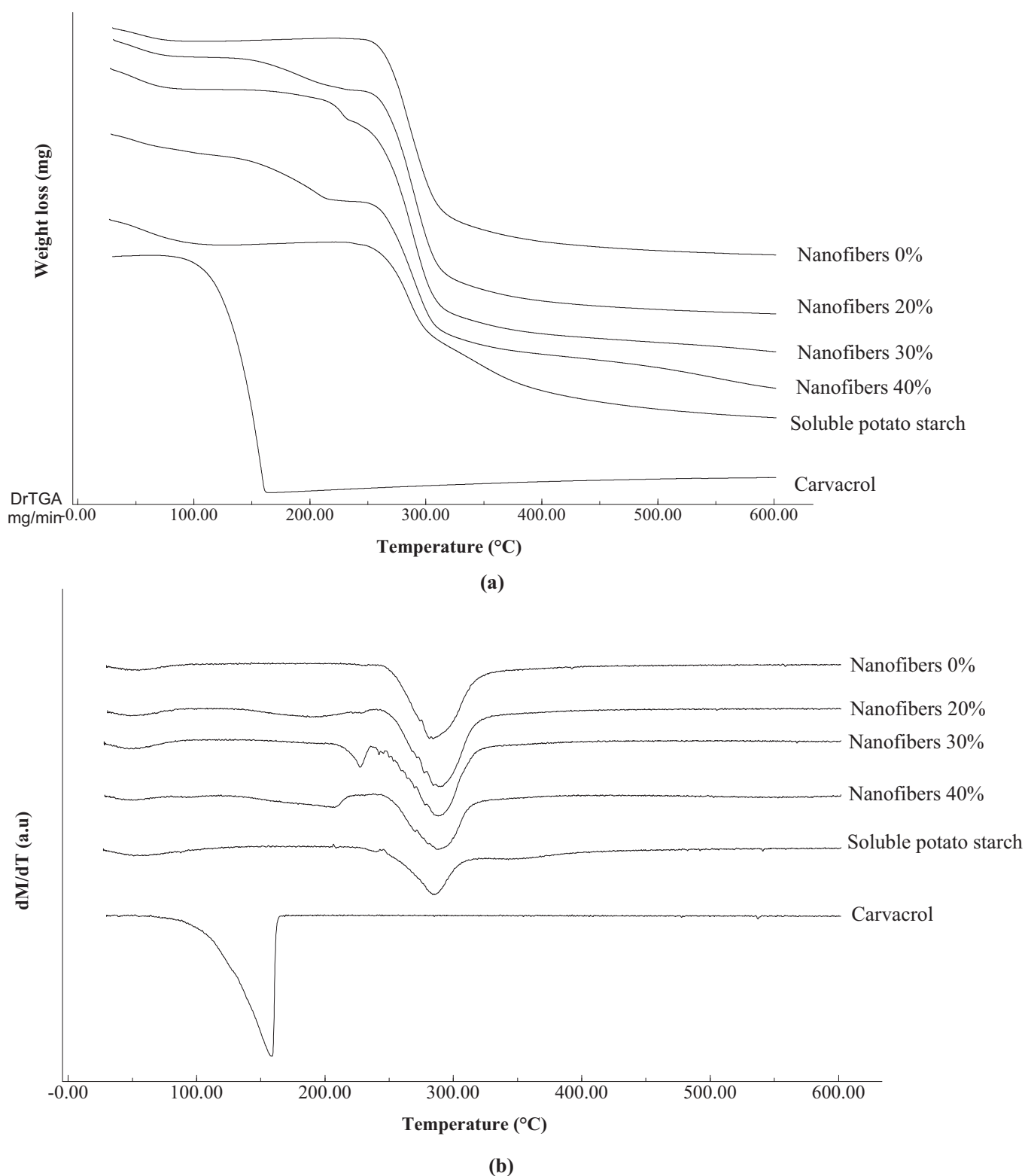


Fig. 2. Thermogravimetric analysis (TGA) (a) and its first derivatives (DTG) (b) of soluble potato starch, carvacrol and starch nanofibers loaded with carvacrol (0%, 20%, 30% and 40%, v/v).

crystallinity, playing a crucial role in the electrospinning process [14,38]. Alvani et al. [36] evaluated the X-diffraction patterns of different types of potato starches and reported RC values of approximately 30%. Yusuph et al. [39] also evaluated the X-ray diffraction of different potato starches and found RC in a range of 24 to 32%. These authors emphasized that in literature values for starch crystallinity vary from 15% to 45%, depending not only on the origin and the hydration of starch, but

also on the technique used to process the starch. In the present study, the RC found for soluble potato starch was 40.2%, which is in accordance with the values reported in these studies.

3.2.5. Thickness and mechanical properties of the electrospun nonwovens

During electrospinning process the polymer is stretched into fiber being laid down on the collector to form a nonwoven [40]. The

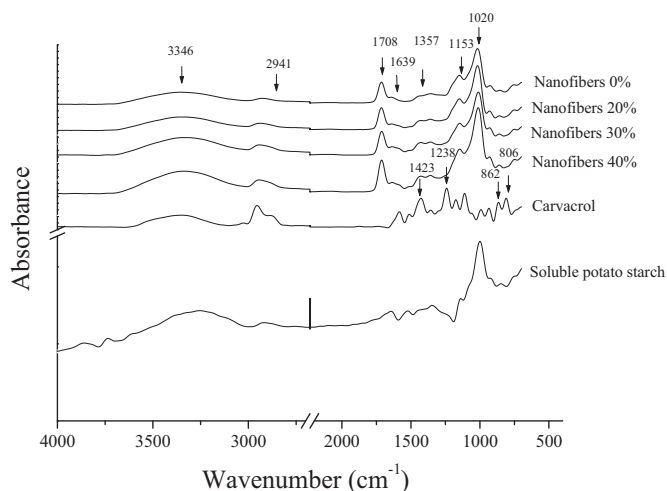


Fig. 3. FT-IR spectra of soluble potato starch, carvacrol and starch nanofibers loaded with carvacrol (0%, 20%, 30% and 40%, v/v).

thicknesses were measured for nonwovens prepared from 4 mL of the fiber-forming solutions (Table 1), which did not show significant differences regardless the carvacrol concentration used ($p \leq 0.05$). Samples without carvacrol (0%) were fragile and hence mechanical analysis was not feasible. Both *TS* and *E* did not show significant differences among the different carvacrol concentration ($p \leq 0.05$). Overall, the low *TS* values showed that starch electrospun nonwovens are not suitable for applications where high structural integrity and strength are needed.

The elastic modulus of the starch nonwovens presented low values ranging from 13.6 ± 2.6 to 21.8 ± 1.1 MPa decreasing according with the increase in the carvacrol concentration ($p \leq 0.05$). The elastic modulus represents the material stiffness, being the higher elastic modulus the more rigid the material [37]. Each type of package requires desired mechanical properties, not being needed high tensile strength (*TS*) but high elongation (*E*) for achieve great flexibility; or the opposite, high *TS* and low *E*, to ensure structure integrity [41]. Starch can be used as polymer matrix for biodegradable films production or electrospun fibers. To overcome its lack in mechanical strength the starch could be combined with other polymer or compound in the matrix' solution or a post-treatment in the fibers could be performed.

3.2.6. Antioxidant activity of the nanofibers

The antioxidant activity of the nanofibers is presented in Fig. 5 varying from 18.9 to 83.1% ($p \leq 0.05$), as carvacrol concentrations increased

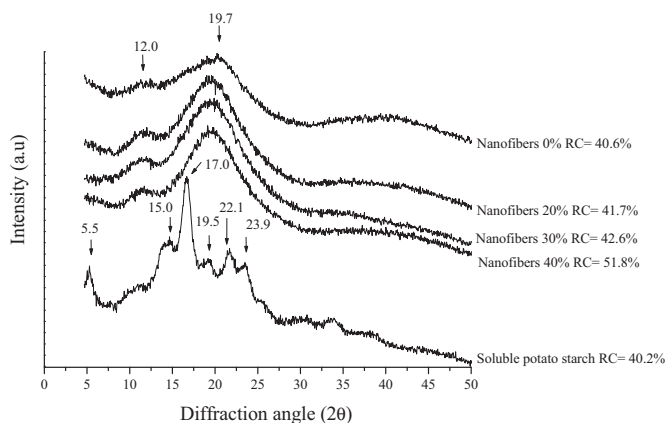


Fig. 4. X-ray diffraction (XRD) of soluble potato starch and starch nanofibers loaded with carvacrol (0%, 20% and 30%, v/v).

from 0 to 40% (v/v). The free carvacrol had the highest antioxidant activity at 92.9% of inhibition of oxidation which is in accordance with result reported in the literature [42]. Homayouni et al. [25] evaluated the antioxidant properties of dispersions made from tapioca and gelatinized tapioca starch incorporated with carvacrol and also reported that the carvacrol addition increase the antioxidant activity. The same authors assert that the radical scavenging capacity of the $ABTS^{\bullet+}$ indicates the carvacrol hydrogen atoms presence and the capacity of donate electrons to $ABTS^{\bullet+}$ [25,33].

The starch electrospun nanofibers loaded with 30 and 40% (v/v) carvacrol had high antioxidant activity with 76.2 and 83.1% of inhibition of oxidation. Problems like lipid oxidation and microbial growth are primarily responsible for the deterioration of foods [43]. The addition of antioxidants in the industry aims to avoid thermal degradation of polymers during processing; however, synthetic antioxidants are the most used in food products [4]. A plausible solution to these problems would be the use of natural antioxidants there are not detrimental to human health. Therefore, from the results of antioxidant activity it is possible to suggest that the starch nanofibers loaded with carvacrol produced in the present study presented great potential for use in food packaging, especially in active packages.

3.3. Antimicrobial activity

3.3.1. Antibacterial activity of carvacrol by micro-atmosphere assay

The carvacrol displayed antibacterial activity against the four foodborne pathogens tested (Table 2). A gradual increase in the diameter of the zone of inhibition was found due to the increase in carvacrol concentration from 10 to 40% (v/v). The lowest carvacrol concentration capable of generating clear zones against the four bacteria was 30% (v/v). For this reason, 30% carvacrol concentration was chosen for antimicrobial activity study. At this concentration level, zones of inhibition of 15.5 to 25.0 mm diameter was observed. *E. coli* and *S. aureus* presented greater inhibition zones when compared with *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium*.

Carvacrol is a lipophilic compound which is well known for its antimicrobial activity by the presence of phenolic compounds that interact with the microorganisms' cell membrane causing changes in the structure of the membrane [27,44]. The carvacrol contains hydroxyl groups on benzene rings in its chemical structure, which was proven by the FT-IR analysis (Fig. 3), there are responsible for the antimicrobial activity since they are capable to break the equilibrium of inorganic ions and pH homeostasis in the cytoplasm of bacteria [33]. Finding from this section suggest that carvacrol may be useful as a naturally-occurring ingredient for food preservation. However, the antimicrobial will need to be

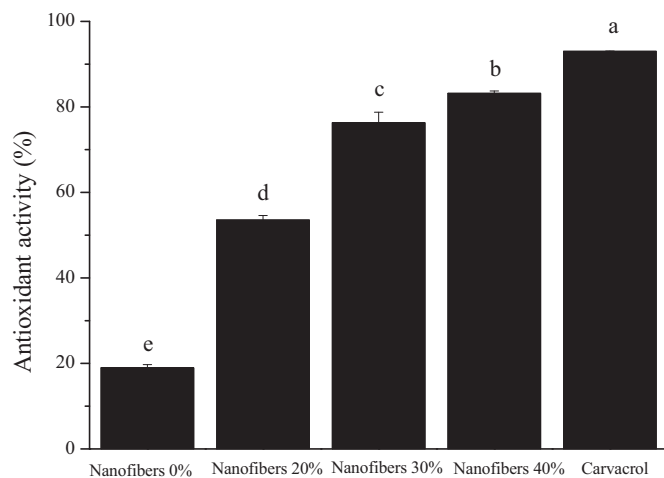


Fig. 5. Antioxidant activity of carvacrol and soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol (0%, 20%, 30% and 40%, v/v).

Table 2
Antimicrobial activity by micro-atmosphere assay against foodborne pathogen of carvacrol in different concentrations and of starch electrospun nonwovens loaded with 30% (v/v) of carvacrol.

	<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 7644)	<i>S. aureus</i> (ATCC 7644)	<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	<i>E. coli</i> O:157H:7 (NCTC 12900)
Carvacrol (%) ^a	Inhibition zone diameters (mm)			
10	–	–	–	17.5 ± 2.5
20	–	21.5 ± 2.5	16.8 ± 6.5	20.5 ± 0.5
30	15.5 ± 0.5	22.5 ± 2.5	20.0 ± 0.0	25.0 ± 2.0
40	19.0 ± 1.0	24.5 ± 0.5	21.5 ± 0.5	28.0 ± 2.0
Electrospun nonwovens loaded with CRV (%) ^b	Bacteria growth reduction (%)			
30	89.0 ± 8.6	49.0 ± 0.8	68.0 ± 6.6	62.0 ± 4.0

Results are expressed as mean ($n = 3$) ± standard deviation.

^a Carvacrol concentration for antimicrobial activity by micro-atmosphere assay.

^b Carvacrol concentration in the starch electrospun nonwovens (30%, v/v) for antimicrobial activity by micro-atmosphere assay.

protected in a carrier matrix, such as starch fiber, to avoid direct contact with food and reduce the impact on sensory characteristics.

3.3.2. Antibacterial activity by micro-atmosphere of the starch electrospun nonwoven loaded with carvacrol

The antibacterial activity of the soluble potato starch electrospun nonwoven loaded with 30% (v/v) of carvacrol is shown in Table 2. To the best of our knowledge, this is the first report on the efficacy of carvacrol loaded into electrospun starch nanofibers. The nanofibers present high surface area-to-volume ratio, which can promote a gradual release of antimicrobial agents, such as carvacrol, to prevent the proliferation of spoilage bacteria in food. The carvacrol-loaded electrospun nonwovens exhibited antibacterial activity against the four foodborne pathogens tested, by reduction the growth by 89.0% for *L. monocytogenes*, 68.0% for *S. Typhimurium*, 62.0% for *E. coli* and 49.0% for *S. aureus*.

The antimicrobial behavior of *S. aureus* was further investigated by fitting a non-linear regression model to the data, with a R^2 value of 89%.

$$y = -0.565 + 1.406.x + 0.005.x^2$$

Based on the regression model was observed that would be necessary 32.6% (v/v) of carvacrol loaded in the nanofibers to eliminate 50% of the *S. aureus* population in an application of the electrospun nonwoven as bioactive food packaging. It was also verified that to eliminate 1 and 3 Log CFU g^{-1} (90.0% e 99.9%) would be necessary 54.0 and 59.0% (v/v) of carvacrol loaded into the nanofibers, respectively. *S. aureus* was chosen because it is an important causative agent of food poisoning that may be present in foods with very manipulation. Thus, in the perspective of using the electrospun nonwovens loaded with carvacrol as active packaging, it would be interesting a control of the growth of this pathogen, since it is estimated that the production of enterotoxins occurs only in concentrations higher than 10^3 CFU g^{-1} [45]. This outcome is contributing to enrich the literature data by exploring the activity of carvacrol against *S. aureus* and can improve the application of the starch electrospun nonwovens loaded with carvacrol, which will be performed for a next study.

The antibacterial activity of the electrospun nonwovens was evaluated on 7, 15 and 30 days after its production during storage at ambient temperature (25 ± 2 °C, in a dissector) against *S. aureus*, based on inhibition zone analysis. The electrospun nonwovens presented the same antimicrobial activity of the 1st day to the 7th and 15th day with clear zones of inhibition with of 25 mm in diameter reducing to 19 mm of diameter in the 30th day. These results showed that the starch nanofibers can contribute to an increase in carvacrol stability. The results showed that the electrospun nonwovens are still releasing the encapsulated carvacrol up to 30 days of storage, which can ensure safe of food products. The results generated in the present study can be useful during the development of carvacrol-based antimicrobial food-packaging.

4. Conclusion

The soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol were successfully electrospun. The nanofibers of neat soluble potato starch presented fused morphology, but those loaded with carvacrol showed homogeneous morphology of average diameters ranging from 73 to 95 nm. The effects of carvacrol in the starch nanofibers were evaluated using TGA, FT-IR, XRD and DSC analyses. The mechanical properties of starch electrospun nonwovens from pure starch are poor, which could be overcome by the addition of carvacrol to enhance the electrospinning process and improve the fiber morphologies. The mechanical properties of TS and E did not show significant differences among the different carvacrol concentration ($p \leq 0.05$). The electrospun starch nonwovens presented low elastic modulus in a range of 13.6 ± 2.6 to 21.8 ± 1.1 MPa.

The antioxidant activity of the nanofibers increased with the carvacrol concentration, up to 83% with nanofiber loaded with 40% (v/v) of carvacrol. Free carvacrol exhibited antibacterial activity against the four foodborne pathogens tested. Electrospun nonwovens with 30% (v/v) of carvacrol reduced the growth of *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* and *S. aureus*, by 89.0, 68.0, 62.0 and 49.0%, respectively. The electrospun nonwovens maintained their antibacterial activity against *S. aureus* maintained for up to 30 days.

The starch nanofibers loaded with carvacrol presented in this study exhibited great antioxidant and antimicrobial activities, which may be useful in applications such as active food packaging systems to extend the shelf life and ensure the safety of food products. These results are also promising for technological applications of materials with specific properties as electrospun starch nanofibers loaded with other bioactive compounds.

Acknowledgements

This study was financed by CAPES (Finance Code 001), CNPQ (448800/2014-4) and FAPERGS (16/2551-0000250-9). We would like to thank CEME-SUL.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.096>.

References

- [1] J.A. Bhushani, C. Anandharamakrishnan, Electrospinning and electrospraying techniques: potential food based applications, Trends Food Sci. Technol. 38 (2014) 21–33.
- [2] P. Wen, D.-H. Zhu, H. Wu, M.-H. Zong, Y.-R. Jing, S.-Y. Han, Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging, Food Control 59 (2016) 366–376.
- [3] A. Altan, Z. Aytac, T. Uyar, Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly(lactic acid) for active food packaging, Food Hydrocoll. 81 (2018) 48–59.

- [4] J. Gómez-Estaca, C. López-de-Dicastillo, P. Hernández-Muñoz, R. Catalá, R. Gavara, Advances in antioxidant active food packaging, *Trends Food Sci. Technol.* 35 (2014) 42–51.
- [5] M.D. Antunes, et al., Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex, *Int. J. Biol. Macromol.* 104 (2017) 874–882.
- [6] F.T. da Silva, et al., Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 107–115.
- [7] Y.P. Neo, S. Swift, S. Ray, M. Gizdavic-Nikolaidis, J. Jin, C.O. Perera, Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials, *Food Chem.* 141 (2013) 3192–3200.
- [8] Y.P. Neo, et al., Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: a physicochemical study based on zein-gallic acid system, *Food Chem.* 136 (2013) 1013–1021.
- [9] K. Moomand, L.-T. Lim, Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres, *Food Res. Int.* 62 (2014) 523–532.
- [10] P. Wen, et al., Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging, *Food Chem.* 196 (2016) 996–1004.
- [11] L. Kong, G.R. Ziegler, Role of molecular entanglements in starch fiber formation by electrospinning, *Biomacromolecules* 13 (2012) 2247–2253.
- [12] R.M. Daudt, L.C. Küllamp-guerreiro, F. Cladera-olivera, R.C.S. Thys, L.D.F. Marczak, Determination of properties of pinhão starch: analysis of its applicability as pharmaceutical excipient, *Ind. Crop. Prod.* 52 (2014) 420–429.
- [13] L. Kong, G.R. Ziegler, Fabrication of pure starch fibers by electrospinning, *Food Hydrocoll.* 36 (2014) 20–25.
- [14] A. Lancuški, G. Vasilyev, J.-L. Putaux, E. Zussman, Rheological properties and Electrospinnability of high-amylose starch in formic acid, *Biomacromolecules* 16 (2015) 2529–2536.
- [15] W. Wang, et al., Effect of vapor-phase glutaraldehyde crosslinking on electrospun starch fibers, *Carbohydr. Polym.* 140 (2016) 356–361.
- [16] L.M. Fonseca, J.P. Oliveira, P.D. Oliveira, E. da R. Zavareze, A.R.G. Dias, L.T. Lim, Electrospinning of native and anionic corn starch fibers with different amylose contents, *Food Res. Int.* 116 (2019) 1318–1326.
- [17] L.M. Fonseca, F.T. Silva, M.D. Antunes, S.L.M. El Halal, L. Lim, A.R.G. Dias, Aging time of soluble potato starch solutions for ultrafine fibers formation by electrospinning, *Starch - Stärke* 71 (2019) 1–7.
- [18] ASTM D-882-91, American Society for Testing and Materials (ASTM), Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, Standards. Annual Book of ASTM, Philadelphia, 1995.
- [19] T.B. de Freitas, et al., Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films, *Food Packag. Shelf Life* 15 (2018) 28–34.
- [20] M. Ghabraie, K.D. Vu, L. Tata, S. Salmieri, M. Lacroix, Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat, *LWT - Food Sci. Technol.* 66 (2016) 332–339.
- [21] G. da S. Dannenberg, G.D. Funck, C.E. dos S. Cruzen, J. de L. Marques, W.P. da Silva, Â. M. Fiorentini, Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: potential for application as active packaging for sliced cheese, *LWT - Food Sci. Technol.* 81 (2017) 314–318.
- [22] C. Kriegel, K.M. Kit, D.J. McClements, J. Weiss, Electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions, *Polymer (Guildf)* 50 (2009) 189–200.
- [23] O.S. Yördem, M. Papila, Y.Z. Menceloğlu, Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: an investigation by response surface methodology, *Mater. Des.* 29 (2008) 34–44.
- [24] I. Przetaczek-Rożnowska, Physicochemical properties of starches isolated from pumpkin compared with potato and corn starches, *Int. J. Biol. Macromol.* 101 (2017) 536–542.
- [25] H. Homayouni, G. Kavousi, S.M. Nassiri, Physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of dispersion made from tapioca and gelatinized tapioca starch incorporated with carvacrol, *LWT - Food Sci. Technol.* 77 (2017) 503–509.
- [26] L. Kong, G.R. Ziegler, Quantitative relationship between electrospinning parameters and starch fiber diameter, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 1416–1422.
- [27] L. Keawchaon, R. Yoksan, Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 84 (2011) 163–171.
- [28] J. Hong, R. Chen, X.-A. Zeng, Z. Han, Effect of pulsed electric fields assisted acetylation on morphological, structural and functional characteristics of potato starch, *Food Chem.* 192 (2016) 15–24.
- [29] J.M. Fang, P.A. Fowler, J. Tomkinson, C.A.S. Hill, The preparation and characterisation of a series of chemically modified potato starches, *Carbohydr. Polym.* 47 (2002) 245–252.
- [30] R. Kizil, J. Irudayaraj, K. Seetharaman, Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3912–3918.
- [31] F.M. Pelissari, M.M. Andrade-mahecha, P.J. do A. Sobral, F.C. Menegalli, Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*), *Food Hydrocoll.* 30 (2013) 681–690.
- [32] R. Scaffaro, F. Lopresti, Processing, structure, property relationships and release kinetics of electrospun PLA/Carvacrol membranes, *Eur. Polym. J.* 100 (2017) 165–171.
- [33] Y. Wu, Y. Luo, Q. Wang, Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method, *LWT - Food Sci. Technol.* 48 (2012) 283–290.
- [34] N. Wang, Y. Si, J. Yu, H. Fong, B. Ding, Nanofiber/net structured PVA membrane: effects of formic acid as solvent and crosslinking agent on solution properties and membrane morphological structures, *Mater. Des.* 120 (2017) 135–143.
- [35] S. Wongsasulak, M. Patapeejumrongsong, J. Weiss, P. Supaphol, T. Yoovidhya, Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends, *J. Food Eng.* 98 (2010) 370–376.
- [36] K. Alvani, X. Qi, R.F. Tester, C.E. Snape, Physico-chemical properties of potato starches, *Food Chem.* 125 (2011) 958–965.
- [37] L.M. Fonseca, et al., Fabrication and characterization of native and oxidized potato starch biodegradable films, *Food Biophys* 13 (2018) 163–174.
- [38] G. Liu, Z. Gu, Y. Hong, L. Cheng, C. Li, Electrospun starch nano fibers: recent advances, challenges, and strategies for potential pharmaceutical applications, *J. Control. Release* 252 (2017) 95–107.
- [39] M. Yusuph, R.F. Tester, R. Ansell, C.E. Snape, Composition and properties of starches extracted from tubers of different potato varieties grown under the same environmental conditions, *Food Chem.* 82 (2003) 283–289.
- [40] L.-T. Lim, A.C. Mendes, I.S. Chronakis, Electrospinning and Electrospraying Technologies for Food Applications, 1st ed. Elsevier Inc., 2019.
- [41] S.L.M. El Halal, et al., The properties of potato and cassava starch films combined with cellulose fibers and/or nanoclay, *Starch/Stärke* 70 (2018) 1–10.
- [42] M. Ramos, A. Beltrán, M. Peltzer, A.J.M. Valente, M. del C. Garrigós, Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films, *LWT - Food Sci. Technol.* 58 (2014) 470–477.
- [43] L.H. Madsen, G. Bertelsen, Spices as antioxidants, *Trends Food Sci. Technol.* 6 (1995) 271–277.
- [44] D.O. Castro, N. Tabary, B. Martel, A. Gandini, N. Belgacem, J. Bras, Effect of different carboxylic acids in cyclodextrin functionalization of cellulose nanocrystals for prolonged release of carvacrol, *Mater. Sci. Eng. C* 69 (2016) 1018–1025.
- [45] A. Medved'ová, A. Havlíková, Ľ.V. Valík, *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in relation to environmental factors, *Intech Open*, 2017, Chapter 9.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nanofibras de amido foram produzidas pela técnica de *electrospinning*. Estas foram utilizadas para a encapsulação de carvacrol, formando um nanomaterial com propriedades antimicrobiana e antioxidante. No primeiro estudo foram obtidas nanofibras de amidos de milho de diferentes teores de amilose, nativo e modificado, com diâmetros médios variando entre 70 a 264 nm e com distintas morfologias.

No segundo estudo foram produzidas nanofibras de amido de batata, sendo avaliado o tempo de repouso da solução polimérica. Foi observado que esse parâmetro influencia nas propriedades reológicas das soluções poliméricas e consequentemente nas características das nanofibras. As nanofibras mostraram-se homogêneas, com *beads* e diâmetros médios variando entre 128 a 143 nm, apresentando potencial para aplicação como material de parede e formação de embalagens ativas para alimentos. Assim, as nanofibras de amido de batata foram utilizadas para encapsulação de carvacrol (estudo três) e apresentaram diâmetros médios de 73 a 95 nm.

A adição de carvacrol nas membranas de nanofibras proporciona um aumento na resistência mecânica das mesmas. Além disso, a adição de carvacrol melhora a morfologia das nanofibras, as quais são mais cilíndricas e uniformes, em relação às nanofibras sem carvacrol. A atividade antioxidante frente ao radical ABTS foi de 83% para as nanofibras com maior concentração de carvacrol. As membranas de nanofibras proporcionam redução no crescimento das bactérias *L. monocytogenes* de 89,0%, *S. Typhimurium* de 68,0%, *E. coli* de 62,0% e *S. aureus* de 49,0%, mantendo sua atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* por 30 dias.

Este estudo fornece dados quantitativos e qualitativos para a aplicação dos nanomateriais que, além de serem biocompatíveis e biodegradáveis, são efetivos agentes antioxidantes e antimicrobianos. As nanofibras de amido/carvacrol são materiais com alto potencial para liberação controlada de

carvacrol na conservação de alimentos. Além disso, os resultados obtidos podem auxiliar em estudos futuros na área de embalagens para alimentos.

REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, K. O., AFOLABI, T. A., OLU-OWOLABI, B. I. Functional, physicochemical and retrogradation properties of sword bean (*Canavalia gladiata*) acetylated and oxidized starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 93–101, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.032>
- ADILAH, Z. A. M., HANANI, Z. A. N. Active packaging of fish gelatin films with *Morinda citrifolia* oil. **Food Bioscience**, v. 16, p. 66–71, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.10.002>
- AIT-OUAZZOU, A., ESPINA, L., GARCÍA-GONZALO, D., PAGÁN, R. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. **Food Control**, v. 32, p. 159–167, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.036>
- AL-NAAMANI, L., DOBRETISOV, S., DUTTA, J. Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 38, p. 231–237, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.010>
- ALBORZI, S., LIM, L., KAKUDA, Y. Encapsulation of folic acid and its stability in sodium alginate- pectin-poly (ethylene oxide) electrospun fibres. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, p. 64–71, 2013. <https://doi.org/10.3109/02652048.2012.696153>
- ALMEIDA, A. C. S., FRANCO, E. A. N., PEIXOTO, F. M., PESSANHA, K. L. F., MELO, N. R. Application of nanotechnology in food packaging. **Polímeros**, 25, 89–97, 201. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.2069>
- ALMEIDA, E. C. **Amido modificado de Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott): Propriedades Funcionais**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.
- ANTUNES, M. D., DANNENBERG, G. S., FIORENTINI, A. M., PINTO, V. Z., LIM, L., ZAVAREZE, E. R., DIAS, A. R. G. Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin

inclusion complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 874–882, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.095>

ARAUJO, M. M., LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Pharmacology, Arq. Inst. Biol.**, v. 83, p. 1–7, 2016. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000702014>

AZEREDO, G. A., STAMFORD, T. L. M., NUNES, P. C., GOMES NETO, N. J., OLIVEIRA, M. E. G., SOUZA, E. L. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541–1548, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.012>

BABAPOOR, A., KARIMI, G., KHORRAM, M. Fabrication and characterization of nanofiber-nanoparticle-composites with phase change materials by electrospinning. **Applied Thermal Engineering**, v. 99, p. 1225–1235, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2016.02.026>

BATISTA, W. P., MENDES, C. E., CONCEI, M. Propriedades químicas e de pasta dos amidos de trigo e milho fosforilados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008.

BEL HAAJ, S., THIELEMANS, W., MAGNIN, A., BOUFI, S. Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: A comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 310–317, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.061>

BELDA-GALBIS, C. M., LEUFVÉN, A., MARTÍNEZ, A., RODRIGUES, D. Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. **Journal of Food Engineering**, v. 141, p. 37–43, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.05.013>

BHARDWAJ, N., KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325–347, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>

BHUSHANI, J. A., ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, p. 21–33, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.004>

- BRUNI, G. P., OLIVEIRA, J. P., GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G., FABRA, M. J., MARTINS, V. G., ZAVAREZE, E. R., LÓPEZ-RUBIO, A. Electrospun β -carotene-loaded SPI:PVA fiber mats produced by emulsion-electrospinning as bioactive coatings for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100426>
- CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A., RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- CHEN, Q., YU, H., WANG, L., ABDIN, Z., CHEN, Y., WANG, J., CHEN, X. Recent progress in chemical modification of starch and its applications. **Royal Society of Chemistry**, v. 83, p. 67459–67474, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5RA10849G>
- CHENG, M., WANG, J., ZHANG, R., KONG, R., LU, W., WANG, X. Characterization and application of the microencapsulated carvacrol / sodium alginate films as food packaging materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 259–267, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.215>
- ČÍŽOVÁ, A., NEŠČÁKOVÁ, Z., MALOVÍKOVÁ, A., BYSTRICKÝ, S. Preparation and characterization of cationic and amphoteric mannans from *Candida albicans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 1–7, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.083>
- DAUDT, R. M., KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C., CLADERA-OLIVERA, F., THYS, R. C. S., MARCZAK, L. D. F. (2014). Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 420–429, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.052>
- DIAS, A. R. G., ZAVAREZE, E. D. R., ELIAS, M. C., HELBIG, E., DA SILVA, D. O., CIACCO, C. F. Pasting, expansion and textural properties of fermented cassava starch oxidised with sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 268–275, 2011a. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.033>
- DIAS, A. R. G., ZAVAREZE, E. D. R., ELIAS, M. C., HELBIG, E., SILVA, D. O., CIACCO, C. F. Pasting, expansion and textural properties of fermented cassava starch oxidised with sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 268–275, 2011b. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.033>

- DONSÌ, F., FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106–120, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>
- ESFANJANI, A. F., JAFARI, S. M. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 532–543, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.053>
- ESPITIA, P. J. P., SOARES, N. DE F. F., BOTTI, L. C. M., MELO, N. R. DE, PEREIRA, O. L., SILVA, W. A. Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 307–316, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000027>
- Evangelista, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.
- Fellows, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e práticas** (2ª ed.). Porto Alegre: Artmed, 2006.
- FONSECA, L. M., SILVA, F. T., ANTUNES, M. D., HALAL, S. L. M., LOONG-TAK, L., DIAS, A. R. G. Aging time of soluble potato starch solutions for ultrafine fibers formation by electrospinning. **Starch - Stärke**, v. 71, p. 1–7, 2019a. <https://doi.org/10.1002/star.201800089>
- FONSECA, L. M., OLIVEIRA, J. P., OLIVEIRA, P. D., ZAVAREZE, E. R., DIAS, A. R. G., LIM, L. T. Electrospinning of native and anionic corn starch fibers with different amylose contents. **Food Research International**, v. 116, p. 1318–1326, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.021>
- FONSECA, L. M., CRUXEN, C. E. S., BRUNI, G. P., FIORENTINI, A. M., ZAVAREZE, E. R., LOONG-TAK, L., DIAS, A. R. G. Development of antimicrobial and antioxidant electrospun soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 1182–1190, 2019c.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.096>
- FORMOLO, F. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de distintos quimiotipos de *Lippia alba* (Mill)**. N. E. Brown. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2009.
- FRANCO, C. M. L., OGAWA, C., RABACHINI, T., ROCHA, T. DE S., CEREDA, M. P., JANE, J. Effect of Lactic Acid and UV Irradiation on the Cassava and Corn Starches. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p.

443–454, 2010.

FRATINI, F., MANCINI, S., TURCHI, B., FRISCIA, E., PISTELLI, L., GIUSTI, G., CERRI, D. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. **Microbiological Research**, v. 195, p. 11–17, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.005>

FUH, Y., WU, Y., HE, Z., HUANG, Z., HU, W. The control of cell orientation using biodegradable alginate fibers fabricated by near-field electrospinning. **Materials Science & Engineering C**, v. 62, p. 879–887., 2016 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.028>

GARCÍA-TEJEDA, Y. V., LÓPEZ-GONZÁLEZ, C., PÉREZ-OROZCO, J. P., RENDÓN-VILLALOBOS, R., JIMÉNEZ-PÉREZ, A., FLORES-HUICOCHEA, E., BASTIDA, C. A. Physicochemical and mechanical properties of extruded laminates from native and oxidized banana starch during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 447–455, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.041>

GAVA, A. J., SILVA, C. A. B., FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GHABRAIE, M., VU, K. D., TATA, L., SALMIERI, S., LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 332–339, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.055>

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G., SANCHEZ, G., LÓPEZ-RUBIO, A. Impact of molecular weight on the formation of electrosprayed chitosan microcapsules as delivery vehicles for bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 121–130, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.012>

GONÇALVES, N. D. PENA, F. L., SARTORATTO, A., DERLAMELINA, C., DUARTE, M. C. T., ANTUNES, A. E. C., PRATA, A. S. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, v. 96, p. 154–160, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.006>

GÖNEN, S. Ö., EROL TAYGUN, M., KÜÇÜKBAYRAK, S. Evaluation of the factors influencing the resultant diameter of the electrospun gelatin/sodium

alginate nanofibers via Box-Behnken design. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 58, p. 709–723, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.024>

GONZÁLEZ, A., ALVAREZ IGARZABAL, C. I. Nanocrystal-reinforced soy protein films and their application as active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 777–784, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.008>

GUIMARÃES, A. G., OLIVEIRA, M. A., ALVES, R. S., MENEZES, P. P., SERAFINI, M. R., ARAÚJO, ADRIANO A. S. BEZERRA, D. P., QUINTANS, L. J. J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.020>

GUO, J., ZHOU, H., AKRAM, M. Y., MU, X., NIE, J., MA, G. Characterization and application of chondroitin sulfate/polyvinyl alcohol nanofibres prepared by electrospinning. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 239–245, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.013>

GURSUL, S., KARABULUT, I., DURMAZ, G. Antioxidant efficacy of thymol and carvacrol in microencapsulated walnut oil triacylglycerols. **Food Chemistry**, v. 278, p. 805–810, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.134>

HALAL, S. L. M., COLUSSI, R., DEON, V. G., PINTO, V. Z., VILLANOVA, F. A. CARREÑO, N. L. V., ZAVAREZE, E. R. Films based on oxidized starch and cellulose from barley. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 644–653, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.024>

HE, X., WANG, H.-M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 16, p. 1–10, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.001>

HENRIQUE, C. M., CEREDA, M. P., SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231–240, 2008.

HUANG, Z., LU, J., LI, X., TONG, Z. Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 128–135, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.07.017>

- HUI, R., QI-HE, C., MING-LIANG, F., QIONG, X., GUO-QING, H. Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. **Food Chemistry**, v. 114, p. 81–86, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.019>
- KHOSHAKHLAGH, K., KOOCHKEI, A., MOHEBBI, M., ALLAFCHIAN, A. Development and characterization of electrosprayed Alyssum homolocarpum seed gum nanoparticles for encapsulation of D-limonene. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 16, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.067>
- KIM, H.-S., HUBER, K. C. Reaction patterns of wheat starch granules substituted with an anionic propylene oxide analog (POA) revealed by confocal microscopy and 3D anaglyph imaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 492–500, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.023>
- KIM, I. G., LEE, J., UNNITHAN, A. R., PARK, C., KIM, C. S. A comprehensive electric field analysis of cylinder-type multi-nozzle electrospinning system for mass production of nanofibers. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 251–256, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.06.033>
- KONG, L. **Electrospinning of starch fibers**. Tese (Doutorado em Filosofia) - Pennsylvania State University, 2012.
- KONG, L., ZIEGLER, G. R. Role of molecular entanglements in starch fiber formation by electrospinning. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 2247–2253, 2012. <https://doi.org/10.1021/bm300396j>
- KONG, L., ZIEGLER, G. R. Quantitative relationship between electrospinning parameters and starch fiber diameter. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1416–1422, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.026>
- KONG, L., ZIEGLER, G. R. Fabrication of pure starch fibers by electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 20–25, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.021>
- KUO, W.-Y., LAI, H.-M. Changes of property and morphology of cationic corn starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 544–553, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.012>
- LAFARGE, C., BOU-MAROUN, E., PONTOIRE, B., CAYOT, N., LE BAIL, P.

Distribution and competition between carvacrol and propylene glycol for trapping by amylose in aqueous suspensions based on potato starch and konjac glucomannan. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 145–154, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.038>

LANCUŠKI, A., VASILYEV, G., PUTAUX, J.-L., ZUSSMAN, E. Rheological Properties and Electrospinnability of High-Amylose Starch in Formic Acid. **Biomacromolecules**, v. 16, p. 2529–2536, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00817>

LAURICELLA, M., PONTRELLI, G., COLUZZA, I., PISIGNANO, D., SUCCI, S. Jetspin: A specific-purpose open-source software for simulations of nanofiber electrospinning. **Computer Physics Communications**, v. 197, p. 227–238, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2015.08.013>

LI, J., SHIN, G. H., LEE, I. W., CHEN, X., PARK, H. J. Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 41–49, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.024>

LI, X., CHEN, H., YANG, B. Centrifugally spun starch-based fibers from amylopectin rich starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 459–465, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.079>

LIM, L.-T., MENDES, A. C., CHRONAKIS, I. S. Electrospinning and electrospraying technologies for food applications. In **Advances in Food and Nutrition Research** (1st ed.), 2019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.005>

LIMBERGER, V. M., SILVA, L. P., EMANUELLI, T., COMARELA, C. G., DALPIEVE, L. Modificação química e física do amido de quirera de arroz para aproveitamento na indústria de alimentos. **Quim. Nova**, v. 31, p. 84–88, 2008.

LÓPEZ-RUBIO, A., SANCHEZ, E., WILKANOWICZ, S., SANZ, Y., LAGARON, J. M. Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 159–167, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.008>

LÓPEZ, O. V., ZARITZKY, N. E., GARCÍA, M. A. Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 160–168, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.041>

- MACHADO, T. F., BORGES, M. DE F., BRUNO, L. M. Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos. **Documento Técnico/ Embrapa Agroindústria Tropical**, ISSN 2179-(145), 32, 2011.
- MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187–195, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00447-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00447-0)
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B., AMODIO, M. L., COLELLI, G. Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles maintain quality of fresh-cut carrots. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 56–63, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.02.005>
- MUCCILLO, R. C. S. T. **Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão Mediante Provas Funcionais e Térmicas**. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- NEO, Y. P., SWIFT, S., RAY, S., GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M., JIN, J., PERERA, C. O. Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3192–3200, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.018>
- NGUYEN, D.-N., HWANG, Y., MOON, W. Electrospinning of well-aligned fiber bundles using an End-point Control Assembly method. **European Polymer Journal**, v. 77, p. 54–64, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.02.017>
- ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnologia de Alimentos* Vol. 1. Porto Alegre: ARTMED, 2005.
- PENG, H., ZHONG, S., LIN, Q., YAO, X., LIANG, Z., YANG, M., HE, H. Removal of both cationic and anionic contaminants by amphoteric starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 210–214, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.064>
- PITAKSUTEEPONG, T. Nanotechnology: Effective topical delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 16–17. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.10.012>
- QIAO, D., YU, L., LIU, H., ZOU, W., XIE, F., SIMON, G., CHEN, L. Insights into

the hierarchical structure and digestion rate of alkali-modulated starches with different amylose contents. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 271–281, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.064>

RAMOS, M., BELTRÁN, A., PELTZER, M., VALENTE, A. J. M., GARRIGÓS, M. C. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, p. 470–477, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.019>

RAMOS, M., BELTRAN, A., VALDES, A., PELTZER, M. A., JIMENEZ, A., GARRIGOS, M. C., ZAIKOV, G. E. **Carvacrol and Thymol for Fresh Food Packaging Bioequivalence & Bioavailability**, v. 5, p. 154-160, 2013. <https://doi.org/10.4172/jbb.1000151>

REALINI, C. E., MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, p. 404–419, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.031>

REZAEI, A., TAVANAI, H., NASIRPOUR, A. Fabrication of electrospun almond gum/PVA nanofibers as a thermostable delivery system for vanillin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 536–543, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.005>

RIBEIRO, E. P., SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos** (2ª ed.). São Paulo: Edgard Blucher, 2007.

ROCHA, T. S., DEMIATE, I. M., FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 620–628, 2008.

SADEGH-HASSANI, F., MOHAMMADI NAFCHI, A. Preparation and characterization of bionanocomposite films based on potato starch/halloysite nanoclay. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 458–462, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.009>

SAIDI, T., ZEISS, R. Investigating promises of nanotechnology for development: A case study of the travelling of smart nano water filter in Zimbabwe. **Technology in Society**, v. 46, p. 40–48, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2016.05.003>

SALLES, T. H. C. **Eletrofiação de nanofibras de blendas de gelatina /PVP (poli (vinil pirrolidona)) a partir de soluções de água e ácido acético.**

Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

- SCAFFARO, R., LOPRESTI, F. Processing, structure, property relationships and release kinetics of electrospun PLA/Carvacrol membranes. **European Polymer Journal**, v. 100, p. 165–171, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.01.035>
- SEVERO, M. G., MORAES, K. DE, RUIZ, W. A. Modificação Enzimática da Farinha de Arroz Visando a Produção de AMido Resistente. **Quim. Nova**, v. 33, p. 345–350, 2010.
- SILVA, F. T., CUNHA, K. F., FONSECA, L. M., ANTUNES, M. D., HALAL, S. L. M., FIORENTINI, A. M. ZAVAREZE, E. R., DIAS, A. R. G. Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control *in situ*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 107–115, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.079>
- SILVA, G. DE O., TAKIZAWA, F. F., PEDROSO, R. A., FRANCO, C. M. L., LEONEL, M., SARMENTO, S. B. S., DEMIATE, I. M. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 188–197, 2006.
- SUNTHORNVARABHAS, J., CHATAKANONDA, P., PIYACHOMKWAN, K., SRIROTH, K. Electrospun polylactic acid and cassava starch fiber by conjugated solvent technique. **Materials Letters**, v. 65, p. 985–987, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2010.12.038>
- SUNTHORNVARABHAS, J., THUMANU, K., LIMPIRAT, W., KIM, H.-J., PIYACHOMKWAN, K., SRIROTH, K. Assessment of material blending distribution for electrospun nanofiber membrane by Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy and image cluster analysis. **Infrared Physics & Technology**, v. 66, p. 141–145, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.infrared.2014.06.004>
- TAMPAU, A., GONZÁLEZ-MARTINEZ, C., CHIRALT, A. Carvacrol encapsulation in starch or PCL based matrices by electrospinning. **Journal of Food Engineering**, v. 214, p. 245–256, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.005>
- TAMPAU, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHIRALT, A. Release kinetics and antimicrobial properties of carvacrol encapsulated in electrospun poly-(ϵ -caprolactone) nanofibres. Application in starch multilayer films. **Food**

- Hydrocolloids**, v. 79, p. 158–169, 2018a.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.021>
- TAMPAU, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHIRALT, A. Release kinetics and antimicrobial properties of carvacrol encapsulated in electrospun poly-(ϵ -aprolactone) nanofibres. Application in starch multilayer films. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 158–169, 2018b.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.021>
- TAN, A., CHAWLA, R., G, N., MAHDIBEIRAGHDAR, S., JEYARAJ, R., RAJADAS, J., SEIFALIAN, A. M. Nanotechnology and regenerative therapeutics in plastic surgery: The next frontier. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surger: JPRAS**, v. 69, p. 1–13, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.bjps.2015.08.028>
- TAS, B. A., SEHIT, E., TAS, C. E., UNAL, S., CEBECI, F. C., MENCELOGLU, Y. Z., UNAL, H. Carvacrol loaded halloysite coatings for antimicrobial food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 20, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.004>
- VANIER, N. L., ZAVAREZE, E. R., PINTO, V. Z., KLEIN, B., BOTELHO, F. T., DIAS, A. R. G., ELIAS, M. C. Physicochemical, crystallinity, pasting and morphological properties of bean starch oxidised by different concentrations of sodium hypochlorite. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1255–1262, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.114>
- VASCONCELOS, D. C. L., BRANDÃO, F. G., NUNES, E. H. M., CALDEIRA, L., HOUMARD, M., MUSSE, A. P., VASCONCELOS, W. L. Synthesis and structural characterization of potato starch sponges. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 358, p. 2663–2666, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2012.06.019>
- VEGA-LUGO, A.-C., LIM, L.-T. Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. **Food Research International**, v. 42, p. 933–940, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.005>
- WANG, W., JIN, X., ZHU, Y., ZHU, C., YANG, J., WANG, H., LIN, T. Effect of vapor-phase glutaraldehyde crosslinking on electrospun starch fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 356–361, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.061>
- WEN, P., ZHU, D.-H., FENG, K., LIU, F.-J., LOU, W.-Y., LI, N., WU, H. Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. **Food Chemistry**, v. 196, p. 996–1004, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.043>

XIE, S. X., LIU, Q., CUI, S. W. **Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications**. Taylor & Francis, 2005.

YANG, Z., SWEDLUND, P., HEMAR, Y., MO, G., WEI, Y., LI, Z., WU, Z. Effect of high hydrostatic pressure on the supramolecular structure of corn starch with different amylose contents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 604–614, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.018>

YÖRDEM, O. S., PAPILA, M., MENCELOĞLU, Y. Z. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology. **Materials & Design**, v. 29, p. 34–44, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2006.12.013>

YU, J., QIU, Y., ZHA, X., YU, M., YU, J., RAFIQUE, J., YIN, J. Production of aligned helical polymer nanofibers by electrospinning. **European Polymer Journal**, 44, 2838–2844, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.05.020>

ZHANG, X., TANG, K., ZHENG, X. Electrospinning and Crosslinking of COL/PVA Nanofiber-microsphere Containing Salicylic Acid for Drug Delivery. **Journal of Bionic Engineering**, v. 13, p.143–149, 2016.
[https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(14\)60168-2](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(14)60168-2)