

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

Membranas de nanofibras de zeína e óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) com potencial antimicrobiano para aplicação em bandejas com carnes.

Eduarda Caetano Peixoto

Pelotas, março de 2022

Membranas de nanofibras de zeína e óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) com potencial antimicrobiano para aplicação em bandejas com carnes.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Comitê de orientação

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (orientador)

Profa. Dra. Elessandrada Rosa Zavareze (co-orientadora)

Dra. Laura Martins Fonseca (co-orientadora)

Pelotas, março de 2022

Eduarda Caetano Peixoto

Membranas de nanofibras de zeína e óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) com potencial antimicrobiano para aplicação em bandejas com carnes.

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós Graduação Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28/03/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (Orientador). Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof.(a) Dr.(a) Elessandra da Rosa Zavareze. Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal de Rio Grande.

Prof.(a) Dr.(a) Jozi Fagundes de Mello. Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dra. Laura Martins Fonseca. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Dra. Marjana Radünz. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho aos meus pais, Cleber e Talita, e ao meu irmão, Arthur.

Agradecimentos

A Deus, por sempre me dar forças a seguir nesta jornada e não me deixar desistir;

Aos meus pais, por todo apoio e incentivo diário desde a minha graduação. Vocês são meu porto seguro, obrigada por não deixarem de acreditar em mim;

Ao meu irmão, Arthur Caetano Peixoto, pelo apoio durante o período de desenvolvimento deste trabalho;

As minhas colegas de mestrado: Sabrina, Larissa e Laura, por toda amizade e companheirismo neste período;

A todas as pessoas que de alguma forma auxiliaram nas análises e na elaboração deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos por todo conhecimento compartilhado;

Ao meu orientador professor Eliezer Gandra por estar presente ao longo destes anos, por toda ajuda do início ao fim, pela paciência e confiança em mim depositada, gratidão pela oportunidade;

À minha co-orientadora professora Elessandra Zavareze, pelos ensinamentos e disposição em me ajudar sempre que necessário, sem medir esforços para que o trabalho fluísse com todo cuidado e segurança em meio à pandemia;

Meu eterno agradecimento, à minha co-orientadora Dra. Laura Fonseca, que se tornou uma grande amiga, sem ela a realização deste projeto não seria possível. Deixo aqui minha admiração pela pessoa e profissional exemplar que ela é, com certeza faz a diferença na vida das pessoas;

As estagiarias do Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular (LACABIM/UFPel), Fabiana e Rafaela, por estarem sempre à disposição e contribuir no trabalho;

Aos colegas e ao Laboratório de Biopolímeros e Nanotecnologia em Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/UFPel) pela possibilidade de realizar grande parte do estudo;

Aos membros da banca examinadora, Jozi e Marjana, agradeço em aceitar integrar a banca de exame desta dissertação;

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, pelo espaço e recursos disponibilizados;

E agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho tenha sido realizado;

Meu muito obrigada!

*“Mesmo que já tenha feito uma longa caminhada, sempre haverá mais um
caminho a percorrer”*

Santo Agostinho

RESUMO

A procura por alimentos com menos conservantes sintéticos tem crescido e a indústria de alimentos busca por estratégias para atender a esta demanda e ao mesmo tempo prolongar com segurança a vida útil dos alimentos. O uso de aditivos químicos sintéticos está associado com riscos à saúde quando consumidos em excesso. Nesse sentido, uma alternativa para controlar o crescimento microbiano é o uso de conservantes naturais, exemplo deste, são os óleos essenciais. Devido a sua composição química, os óleos essenciais podem apresentar propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Neste trabalho, objetivou-se desenvolver um sachê com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) encapsulado em nanofibras de zeína. Assim, foi desenvolvida uma embalagem ativa contendo um sachê de nanofibras a base de zeína a fim de avaliar o efeito antimicrobiano em cortes cárneos acondicionados em bandejas, produzido pela técnica de *electrospinning* com aplicação em corte cárneo. As nanofibras obtidas, apresentaram-se uniformes e contínuas, com diâmetro variando entre 61 e 77 nm. As nanofibras apresentaram superfície hidrofóbica, com um ângulo de contato com a água variando de 134 a 150° e elevada capacidade antioxidante (93% de inibição pelo método ABTS). Os sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho foram capazes de inibir o crescimento de coliformes termotolerantes (45°C), *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva sob refrigeração. Sendo assim, as nanofibras produzidas neste estudo apresentam características promissoras para elaboração de embalagens ativas para alimentos.

Palavras-chave: Embalagem ativa; *electrospinning*; atividade antimicrobiana; microrganismos patogênicos.

ABSTRACT

The search for food with less amount of synthetic preservatives has grown and the food industry searches for strategies to safely extend its shelf life. The use of chemical additives is associated with health risks when excessively consumed. In that regard, an alternative to control microbial growth is the use of natural preservatives, such as essential oils. Due to its chemical composition essential oils have antimicrobial and antioxidant properties. The aim of this study was to test the antimicrobial capacity of the thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) encapsulated in zein nanofibers. Therefore, an active packaging was developed containing a nanofiber sachet based on zein and thyme essential oil, produced by electrospinning technique with the application in meat products. The nanofibers obtained were uniform and continuous, with a diameter variation between 61 e 77 nm. They showed hydrophobic ability, with a water contact angle varying from 134 to 150° and elevated antioxidant capacity (93% of inhibition by the method ABTS). Zein nanofiber sachets with thyme essential oil were able to inhibit the growth of thermotolerant coliforms (45°C), *E. coli* and coagulase-positive *Staphylococcus* under refrigeration. Therefore, the nanofibers produced in this study show promising characteristics for the elaboration of active packaging for food.

Keywords: Active packaging; *electrospinning*; antimicrobial activity; pathogenic microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tomilho <i>in natura</i>	25
Figura 2: Representação esquemática do processo de <i>electrospinning</i>	30
Figura 3: Morfologia das nanofibras e respectiva distribuição de tamanho: zeína controle (a), zeína com 30% de óleo essencial de tomilho (b), zeína com 40% de óleo essencial de tomilho (c) e zeína com 60% de óleo essencial de tomilho (d). Amplitudes (1000x e 500x)	73
Figura 4: Ângulo de contato das nanofibras de zeína com 30% de óleo essencial de tomilho (a ₁ , a ₂), zeína com 40% de óleo essencial de tomilho (b ₁ , b ₂) e zeína com 60% de óleo essencial de tomilho (c ₁ , c ₂).....	77
Figura 5: Atividade antioxidante das nanofibras produzidas com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho (0, 30, 40 e 60%) pelos métodos de inibição dos radicais DPPH e ABTS. Letras diferentes indicam diferença significativa para cada radical avaliado (p<0,05).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos aplicados <i>in situ</i>	68
Tabela 2: Condutividade elétrica das soluções poliméricas de zeína em diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho.	71
Tabela 3: Espectros no infravermelho com Transformada de Fourier das nanofibras de zeína com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho produzidas por <i>electrospinning</i> e do óleo puro.	80
Tabela 4: Análise <i>in vitro</i> do efeito das nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho frente <i>S. aureus</i> ATCC (10838).	82
Tabela 5: Análise <i>in vitro</i> do efeito das nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho frente <i>Escherichia coli</i> ATCC (43895).	83
Tabela 6: Quantificação de coliformes termotolerantes em bandejas com carne com ou sem a presença de sachê de nanofibras adicionadas de óleo essencial de tomilho.	85
Tabela 7: Quantificação de <i>E. coli</i> em bandejas com carne com ou sem a presença de sachê de nanofibras adicionadas de óleo essencial de tomilho. .	85
Tabela 8: Quantificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em bandejas com carne com ou sem a presença de sachê de nanofibras adicionadas de óleo essencial de tomilho após 7 dias de armazenamento.	87

SUMÁRIO

1.	Introdução	14
2.	Objetivos	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
3.	Hipóteses	18
4.	Revisão Bibliográfica	19
4.1	Carnes.....	19
4.2	Microrganismos Presentes Na Carne	20
4.3	Óleos Essenciais	22
4.4	Óleo Essencial De Tomilho (<i>Thymus Vulgaris</i>).....	24
4.5	Aplicação De Óleos Essenciais Em Produtos Cárneos	27
4.6	Nanotecnologia	29
4.7	Embalagens Ativas	31
5.	PROJETO DE PESQUISA	33
6.	RELATÓRIO DE CAMPO	63
7.	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
7.1	Material	63
7.2	Métodos	64
7.2.1	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS FORMADORAS DE NANOFIBRAS	64
7.2.1.1	Condutividade Elétrica E Viscosidade Aparente Das Soluções Poliméricas.....	64
7.2.2	Produção De Nanofibras Pela Técnica De <i>Electrospinning</i>	64
7.2.3	Caracterização Das Nanofibras Produzidas Pela Técnica De <i>Electrospinning</i>	65
7.2.3.1	Morfologia E Distribuição De Tamanho Das Nanofibras	65
7.2.3.2	Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada De Fourier (Ftir).....	65

7.2.3.3 Análise Do Ângulo De Contato Com A Água.....	65
7.2.3.4 Atividade Antioxidante	66
7.2.4 Atividade Antimicrobiana.....	66
7.2.5 Avaliação <i>In Vitro</i> Do Efeito Antimicrobiano	67
7.2.6 Avaliação <i>In Situ</i> Do Efeito Antimicrobiano	67
7.2.7 Enumeração De <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva.....	69
7.2.8 Enumeração De Coliformes Totais, Termotolerantes E <i>Escherichia Coll</i>	69
7.2.9 Pesquisa De <i>Salmonella</i> SPP.....	69
7.2.10Análise Estatística.....	70
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
8.1 Caracterização Das Soluções Poliméricas Formadoras De Nanofibras	70
8.2 Morfologia E Distribuição De Tamanho Das Nanofibras.....	74
8.3 Ângulo De Contato Com A Água	75
8.4 Atividade Antioxidante	78
8.5 Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada De Fourier (FTIR).....	80
9. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	82
9.1 Atividade Antimicrobiana <i>In Vitro</i> Em Micro-Atmosfera	82
9.2 Atividade Antimicrobiana <i>In Situ</i>	85
10. CONCLUSÃO	89
Referências Bibliográficas.....	90

1. Introdução

O consumo de carne bovina, suína e de frango está em constante crescimento. Uma projeção realizada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2017, aponta maiores taxas de crescimento da produção no período até 2028. Segundo o estudo, a carne suína e a carne de frango aumentarão em 2,6% ao ano e a carne bovina tem um crescimento projetado de 1,9% ao ano. A projeção para o final da próxima década é produzir 34,2 milhões de toneladas de carne de frango, bovina e suína para comercialização (MAPA, 2018).

Desde que a pandemia de COVID-19 assola o mundo, por sua vez, diferente das projeções realizadas, o consumo de carne bovina despencou nos anos de 2020 e 2021. Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) apontam um consumo de em média, 26 quilos por habitante em 2021, sendo que nos anos anteriores o consumo foi de 45 quilos ou mais ao ano. Devido ao aumento de preços dos insumos, o valor de venda da carne também aumentou, fazendo com que os consumidores diminuíssem a compra. Porém a projeção demonstra que ao final da pandemia os números tendem a retornar ou até mesmo aumentar.

A carne, por ser um alimento muito perecível, é suscetível ao ataque de diversos microrganismos, sendo este um dos grandes problemas que a indústria de alimentos enfrenta, a deterioração rápida de carnes. A carne *in natura*, devido a sua composição química, juntamente com fatores intrínsecos como atividade de água e pH, se torna um meio propício para o crescimento e multiplicação de diferentes tipos de microrganismos (ORDÓÑHEZ, 2005). Estes são classificados em dois grupos, os deteriorantes e os patogênicos. Os deteriorantes são causadores de alterações químicas, físicas e sensoriais, sendo prejudiciais ao aspecto do alimento, como por exemplo, modificação da cor, do odor, da textura e do sabor (MORAES, 2010). Os principais microrganismos envolvidos na deterioração de alimentos, são *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Shewanellaputrefaciens*, *Brochotrixthermosphacta*, *Lactobacillus*, algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, e ainda as leveduras e os bolores (ALCANTRA et al., 2012).

O grupo de microrganismos patogênicos também pode estar presente na carne *in natura*, responsável pelas doenças transmitidas por alimentos (DTA). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as DTAs são aquelas de natureza infecciosa ou tóxica, causadas pela ingestão de alimentos ou água, contaminados por agentes biológicos, químicos e físicos, representando um grave risco à saúde. Segundo Melo et al. (2018), DTAs representam um importante problema de saúde pública, por acometerem milhões de pessoas em todo o mundo. Tratando-se de carne, as principais bactérias patogênicas encontradas são: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Clostridium perfringens* (ESTEVES, 2006).

A Legislação Brasileira através da Instrução Normativa N° 60, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), preconiza para cortes cárneos a análise de microrganismos mesófilos aeróbios, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (BRASIL, 2019). Perante o cenário apresentado, visa-se o aumento da vida útil e a comercialização de alimentos seguros, a partir do uso de aditivos químicos para conservação de produtos alimentícios. A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, conforme a Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997, define aditivos químicos como substâncias que, quando incorporadas ao alimento, irão manter ou melhorar as propriedades químicas, físicas, sensoriais e nutricionais, bem como inibir o desenvolvimento e multiplicação microbiana.

Diferentes tipos de aditivos alimentares são permitidos pela legislação brasileira para a fabricação de diversos produtos de origem animal, entretanto, se observa que muitos podem ser a causa de problemas de saúde, relacionados ao seu uso inadequado, sendo muitos associados a alergias e até mesmo ao desenvolvimento de células cancerígenas (POLÔNIO e PERES, 2009).

Dessa forma, existe uma preocupação muito grande e uma demanda, principalmente por parte do consumidor, por alimentos que não contenham aditivos químicos sintéticos em sua composição. Neste contexto, o uso de óleos essenciais derivados de plantas aromáticas torna-se alternativa viável e natural em substituição a estes aditivos. Por serem formados por diferentes compostos químicos, os óleos essenciais, em grande maioria, apresentam alta

bioatividade, como por exemplo, a capacidade de inibir bactérias, além de apresentarem atividades antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória (PEREIRA, 2006; SILVA et al., 2019).

Nos últimos anos, é gradativo o aumento do número de pesquisas realizadas com o intuito de obterem-se novos métodos para conservação de alimentos. Estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos de origem clínica e alimentar têm sido realizados, principalmente *in vitro* (SANTOS et al., 2017).

Para verificar o efeito antibacteriano de uma substância como óleos essenciais é fundamental avaliar a sua ação frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, devido a sua ação, na maioria dos casos, ocorrer na parede celular do microrganismo, afetando a integridade da membrana celular (SILVEIRA et al., 2012), sendo as bactérias mais utilizadas como modelos *Staphylococcus aureus* (Gram +) e *Escherichia coli* (Gram -) (RADUNZ, 2017). É válido ressaltar que o uso de óleos essenciais com efeito antimicrobiano em contato direto com o alimento apresenta limitações, havendo pesquisas que demonstram o impacto negativo nas características sensoriais do produto alimentício (MENDONÇA, 2018), porém, existem outras possibilidades para que estes óleos essenciais desenvolvam a função de conservação, sem contato direto com o alimento. Exemplo disto é o estudo que Oliveira (2017) realizou com cobertura de quitosana contendo óleo essencial de Sálvia (*Salvia officinalis* L.) em morangos, com o propósito de amenizar interferências sensoriais. Uma pesquisa realizada por Rutz et al. (2017) destacou a eficiência do óleo de palma (*Elaeis guineensis*) contendo alto teor de carotenóides, encapsulado com quitosana e xantana, apontando um perfil de liberação satisfatório de carotenóides.

Uma alternativa promissora para aplicação desses óleos essenciais de forma indireta ou com liberação gradativa em alimentos, evitando interferências sensoriais, é a encapsulação em matrizes com escala nanométrica, como nanofibras. Esta alternativa é promissora devido a sua alta área superficial em relação ao volume e possibilidade de uma liberação controlada e específica dos compostos dos óleos essenciais. A nanotecnologia representa uma área de pesquisa muito ampla, com grande potencial para implementação de inovações na indústria de alimentos, desde a produção até o armazenamento, com foco

no desenvolvimento de novos produtos para fins específicos (LA ROCHA, 2014). A nanotecnologia é uma tendência atual na ciência do século XXI que pode ser aplicada em diversas áreas da indústria de alimentos, permitindo o desenvolvimento de novos materiais para produção de embalagens, além de ser um método que melhora a segurança dos alimentos (GOMES et al., 2015).

Como exemplo pode-se citar as nanofibras de celulose, que já foram utilizadas como reforço, para aprimorar o desempenho e propriedades de embalagens (ASSIS et al., 2012). Em um trabalho desenvolvido por Kuntzler (2017) foi realizada a produção de nanofibras poliméricas incorporadas com compostos fenólicos obtidos da microalga *Spirulina* que apresentem propriedade antimicrobiana, para aplicação de embalagem ativa. Outros estudos foram encontrados relatando a encapsulação de óleos essenciais, como Radunz et al. (2017) que encapsularam óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) com o objetivo de testar a atividade bactericida frente a diferentes tipos de microrganismos patogênicos. O óleo essencial encapsulado apresentou forte atividade antimicrobiana com potencial para controle microbiológico. Neste contexto, levando em consideração a escassez de pesquisas sobre o assunto, este estudo visa o desenvolvimento de um sachê de nanofibras de zeína incorporados de óleo essencial de tomilho buscando verificar se o mesmo é capaz de inibir *in vitro* o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e inibir *in situ*, em cortes cárneos acondicionados em bandejas de poliestireno, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de sachês de nanofibras de zeína incorporadas com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) na inibição *in vitro* de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e *in situ* de *Salmonella* spp., *Staphylococcus coagulase* positiva, coliformes termotolerantes (45°C) e *Escherichia coli* em cortes cárneos (carne moída) acondicionados em bandejas sob temperatura de refrigeração.

2.2 Objetivos Específicos

Desenvolver sachês de nanofibras de zeína incorporadas de óleo essencial de tomilho pela técnica de *electrospinning*;

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho em sachês de nanofibras de zeína em avaliação *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;

Avaliar a atividade antimicrobiana *in situ* do óleo essencial de tomilho frente aos microrganismos *Staphylococcus coagulase* positiva, Coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em cortes cárneos (carne moída) acondicionados em uma embalagem ativa formada por uma bandeja de polipropileno incorporada de saches de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho sob temperatura de refrigeração.

3. Hipóteses

Sachês de nanofibras de zeína incorporadas com óleo essencial de tomilho inibem *in vitro* os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Embalagens ativas com adição do sachê de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho são capazes de inibir microrganismos *Staphylococcus coagulase* positiva, Coliformes termotolerantes, *Escherichia*

coli e *Salmonella* spp. em cortes cárneos (carne moída) acondicionados em bandejas sob temperatura de refrigeração.

4. Revisão Bibliográfica

4.1 Carnes

O Brasil tem o maior rebanho bovino do mundo, o qual em 2020, representou 14,3% do rebanho mundial, seguido da Índia. Além de ser o maior produtor de bovinos, o país ocupa a terceira posição mundial no mercado internacional, devido a produção de aves e suínos, contabilizando 29 milhões de toneladas, ficando atrás apenas da China e Estados Unidos. Em relação à quantidade de carnes exportadas, no ano de 2020, o Brasil ocupou o segundo lugar, com 7,4 milhões de toneladas, representando 13,4% do total mundial (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, 2021).

A estrutura da carne é constituída por três tecidos: o tecido muscular no qual encontram-se miofilamentos, miofibrilas, fibras e feixe de fibras; o tecido conjuntivo formado por colágeno e elastina e, o tecido adiposo (FEIJÓ, 1999). A carne é considerada um alimento completo devido a sua composição química, possuindo grande quantidade de aminoácidos, vitaminas e alto teor de ferro (SOARES et al., 2017). Além disso, é fonte de proteínas com alto valor biológico devido a sua biodisponibilidade no organismo. Os lipídeos também estão presentes na composição química da carne, e variam de acordo com alguns fatores, como raça, sexo e alimentação do animal. Em relação as vitaminas, são encontradas as lipossolúveis (A, D, E e K), as hidrossolúveis do complexo B (tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina, ácido pantotênico, ácido fólico, niacina, cobalamina e biotina) e em menor quantidade a vitamina C. Ferro, fósforo, potássio, sódio, magnésio e zinco são os minerais presentes na carne. Cabe ressaltar o ferro, sendo fonte expressiva deste mineral, onde 40 a 60% é altamente absorvido pelo organismo (RAMOS & GOMIDE, 2012).

A carne é um alimento de elevada perecibilidade, devido principalmente à sua composição química. Além de possuir muitas substâncias orgânicas e inorgânicas o teor de água presente na carne é de aproximadamente 70% (SABADINI et al., 2001). As alterações da carne são em grande parte por ação

dos microrganismos e, posteriormente, precedem outras formas de deterioração (ALCANTARA et al., 2012). A conservação da carne envolve a aplicação de medidas que diminuem ou previnem as alterações microbiológicas, enzimáticas, químicas e físicas (THOMAS et al., 2008).

4.2 Microrganismos presentes na carne

Os microrganismos presentes na carne bovina estão diretamente ligados aos processos de deterioração, infecção e intoxicação alimentar. A contaminação pode ocorrer por diferentes fatores, como por exemplo, o contato da carne com o conteúdo gastrointestinal, bem como a falta de higiene apropriada nos equipamentos utilizados para industrialização da carne, desde os usados para o abate até o armazenamento e a água de lavagem da carcaça. Sendo assim, a contaminação pode ocorrer durante todas estas etapas da cadeia produtiva (BARROS & VIOLANTE, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as DTAs são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por agentes biológicos, químicos e físicos, representando risco à saúde (BRASIL, 2010). Em 2017 foram notificados mais de 12 mil surtos de DTAs no Brasil, onde 92% foram de origem bacteriana. As regiões Sudeste e Sul apresentaram os maiores índices de DTAs no país (BRASIL, 2018) e os principais agentes envolvidos nestes, segundo o Ministério da Saúde, são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. A vigilância epidemiológica, segundo dados do Sistema de informação de Agravos de Notificação (Sinan) registrou mais de 700 surtos de DTAs em 2020 e 2021, com envolvimento de 13 mil doentes e 10 óbitos (BRASIL, 2021). *Staphylococcus aureus* são microrganismos pertencentes à família *Micrococcaceae*, são cocos Gram-positivos e anaeróbios facultativos, que por produzirem catalase tem maior crescimento sob condições aeróbias (LOPES et al., 2006). Em humanos, *Staphylococcus aureus* é um microrganismo encontrado na pele e cavidades nasais, e sua presença em algumas condições causam uma ampla variedade de infecções (SALES & SILVA, 2012).

Para causar uma intoxicação, a quantidade de *Staphylococcus aureus* deve apresentar-se próxima a 10^6 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama (g) de alimento ingerido (RODRIGUES et al., 2004). Uma pesquisa realizada por Pereira et al. (2016), teve como objetivo analisar amostras de churrasquinho de carne bovina, para verificar o crescimento bacteriano. O estudo apontou que 15% das amostras estavam contaminadas por *Staphylococcus aureus* e a presença deste pode estar relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos. Muitos manipuladores de alimentos não fazem uso de equipamentos de proteção individual (EPI), indo contra as Boas Práticas de Manipulação. A ausência destes equipamentos contribui para o aumento da proliferação de diversos microrganismos, inclusive *Staphylococcus aureus*. Outros fatores que podem estar relacionados com o aumento da contagem bacteriana nos alimentos são as características destes, como por exemplo, umidade, pH, atividade de água, bem como a temperatura de armazenamento e a embalagem em que o mesmo está acondicionado (ANDRADE et al., 2019). Outro patógeno comumente encontrado em alimentos é *Escherichiacoli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram-negativos não esporulados, móveis ou não e são anaeróbios facultativos (FORSYTHE, 2013). As cepas de *Escherichia coli* possuem grande capacidade de adaptação, sendo assim, possuem potencial para provocar um amplo espectro de doenças (MADIGAN et al., 2016).

Em um estudo realizado por Adwan et al. (2015) na Palestina, foram analisadas 40 amostras de carne fresca e congelada, e os resultados do estudo indicaram presença de diversos microrganismos, sendo *Escherichiacoli* presente em 95% das amostras testadas. Brusa et al. (2013) avaliaram 450 amostras de carne bovina moída, comercializada em supermercados na Argentina, onde 30% das amostras foram positivas para *Escherichia coli*. Ambas pesquisas apontam a importância deste microrganismo em questão, pois, como mencionado anteriormente, *Escherichia coli* é responsável pela maior parte de DTAs que acometem diversos indivíduos a nível mundial.

Assim como os demais microrganismos citados, *Salmonella* spp. é um agente veiculador de DTAs. Estes patógenos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, fazem parte da família *Enterobacteriaceae*, que abrange diversas espécies (SANTURIO et al., 2007).

A Salmonelose é uma doença de grandetranstorno à saúde pública mundial, trata-se de uma infecção alimentar, podendo levar ao óbito o indivíduo que consumir o alimento contaminado (FILHO et al., 2014).

Dentre os alimentos com maior incidência em casos de Salmonelose estão os ovos, leite, carnes de aves e bovina (MENDONÇA, 2016). Barcelos et al. (2016) realizaram um estudo em saladas contendo maionese comercializada em restaurantes. Do total das amostras, 30% apresentaram presença de *Salmonella* spp. Outro estudo realizado por Bergamo et al. (2020), avaliaram a presença de *Salmonella* spp. em 89 amostras de produtos cárneos comercializados na região Sul do Rio Grande do Sul, onde foi constatada a presença de *Salmonella* spp. em 19,1% das amostras avaliadas.

Um questionário aplicado por Rodrigues (2015) questiona os participantes do estudo sobre o conhecimento do meio de transmissão de doenças por meio de alimentos. Como resultado, a maior parte dos entrevistados diz desconhecer os meios de contaminação de alimentos. Este resultado indica a falta de debate do assunto ou até mesmo instruções de maneira que visem evitar possíveis surtos de DTAs. Uma possível alternativa de conservação de alimentos visando minimizar possíveis surtos alimentares, é o uso de substâncias antimicrobianas, dentre estas destacam-se as substâncias naturais como os óleos essenciais, tendo potencial para propiciar um aumento de vida útil, substituindo os aditivos químicos sintéticos utilizados pelas indústrias alimentícias. Os óleos essenciais são efetivos para retardar o crescimento de microrganismos causadores de doenças e da deterioração de alimentos.

4.3 Óleos Essenciais

O homem utiliza desde a antiguidade, plantas aromáticas, tanto na alimentação, usadas como temperos, para realçar o sabor de diversos alimentos, como no tratamento de determinadas doenças (ANDRADE, 2010). As plantas aromáticas são usadas como temperos, para realçar o sabor de diversos alimentos (CUTRIM et al., 2019). Dentre as substâncias obtidas do metabolismo secundário das plantas aromáticas estão os óleos essenciais, formados por diferentes compostos químicos, na sua maioria com alta

bioatividade, como por exemplo, a capacidade de inibir microrganismos, sendo muitos óleos essenciais considerados agentes antimicrobianos presentes em plantas. Os óleos essenciais também podem apresentar atividades antioxidante e anti-inflamatória, dentre outras (PEREIRA, 2006). Os óleos essenciais são constituídos por elementos voláteis contidos em vários órgãos das plantas e, assim, são denominados devido à sua composição lipofílica. Podem ainda receber outras denominações como essências, óleos etéreos ou ainda óleos voláteis, tendo em vista algumas características físico-químicas e sua pureza (MATTOS et al., 2007).

Quimicamente, os óleos essenciais, em sua maioria, são constituídos por uma mistura de substâncias terpênicas, como os hidrocarbonetos e eventualmente de derivados do fenol, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta (ALINKINA et al., 2013). O isopreno é a unidade básica dos terpenos, o qual é formado por uma molécula com cinco átomos de carbono. Devido às ligações químicas o isopreno forma diferentes estruturas de terpenos, como por exemplo, os monoterpenos que são formados pela ligação de duas moléculas de isopreno. Outro exemplo são os sesquiterpenos, os quais são obtidos por meio da ligação de três moléculas de isopreno. Essas são as principais estruturas presentes em óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

Muitos fatores podem influenciar no conteúdo do óleo essencial, sendo a espécie da planta o fator mais considerável. Além deste, as condições ambientais como temperatura, umidade relativa, exposição solar e tipo de solo também modificam as características, assim como o ciclo vegetativo em que a planta se encontra, e a presença de micronutrientes, os quais também influenciam na atividade biológica do óleo (MATTOS et al., 2007).

O método de extração também pode influenciar no conteúdo do óleo essencial. Existem diferentes metodologias para sua obtenção. O mais indicado é definido conforme a localização do óleo essencial na planta e com a proposta da sua utilização (SIMÕES et al., 2010). Dentre eles estão incluídos os processos convencionais, como a extração com solvente orgânico, destilação a vapor d'água, hidrodestilação, hidrofusão, bem como o uso de outras tecnologias, como a extração com solvente e alta pressão, fluido

supercrítico com gás carbônico (CO₂), extração ultrassônica e extração por micro-ondas sem solventes (COSTA et al., 2006).

Embora os processos de extração de óleos essenciais tenham avançado com a ajuda da tecnologia, a escolha da técnica para a extração destes é um fator determinante para obtenção do maior rendimento do material extraído (AMARNI et al., 2010). Como já mencionado, os óleos essenciais atuam na inibição do crescimento bacteriano, visto que afetam a integridade da membrana celular por possuírem constituintes lipofílicos, os quais são responsáveis por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (SILVEIRA et al., 2012). Dentre os óleos essenciais que tem demonstrado promissora atividade antimicrobiana, encontra-se o óleo essencial extraído do tomilho.

4.4 Óleo essencial de tomilho (*Thymus Vulgaris*)

Thymus vulgaris é uma planta aromática da qual se utiliza as folhas e os ramos na culinária, como condimento e erva aromática (SANTORO, 2007). Originária da Europa e cultivada no Sul e Sudeste do Brasil é conhecida popularmente por tomilho, pertence à família Lamiaceae, a qual possui cerca de 150 gêneros e quase 3 mil espécies distribuídas pelo mundo que diferenciam-se em características morfológicas e na composição de óleos essenciais, além de um odor forte e penetrante e, por vezes, um sabor muito pronunciado balsâmico e picante (CORTICCHIATO et al., 1998; PORTE & GODOY, 2001). A planta tomilho possui em média de 20 a 30 cm de altura, com ramos e folhas verdes escuras (NASCIMENTO et al., 2000), conforme demonstrado na Figura 1.

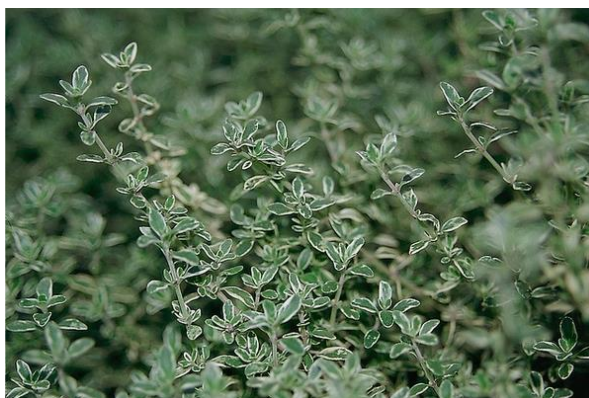


Figura 1: Tomilho *in natura*

Fonte: Castro (2018).

Os principais constituintes químicos do óleo essencial de tomilho são carvacrol e o timol. Estes componentes são os responsáveis pela atividade antimicrobiana que o óleo essencial apresenta (DAFERERA et al., 2000). Diversos pesquisadores descrevem o potencial antimicrobiano deste óleo essencial, bem como sua potencial aplicação em produtos alimentícios, com o objetivo de conservá-los por maior tempo. Dorman e Deans (2000) realizaram um experimento com óleo essencial de tomilho contra 25 bactérias, (sendo 9 Gram-positivas e 16 Gram-negativas) e relataram por meio do teste de disco difusão maior atividade inibitória frente a bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus*.

Chalfoun et al. (2004) avaliaram o efeito *in vitro* de óleos essenciais, dentre estes o de tomilho em diferentes concentrações. Nas concentrações mais altas, de 1500 mg.mL⁻¹ e 2000 mg.mL⁻¹, foi possível observar a inibição do desenvolvimento de diferentes tipos de fungos. Pereira et al. (2008) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar se o óleo essencial de tomilho diminuiria a germinação de *Cercosporacoffeicola*, uma doença que afeta as lavouras cafeeiras. O resultado foi positivo, pois inibiu a germinação e o crescimento micelial contra *Cercos coffeicola*. Silva e Rangel (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* dos componentes do extrato etanólico de tomilho. No estudo, os autores analisaram os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e foi observada uma melhor atividade antimicrobiana sobre as cepas Gram-positivas, tendo uma melhor ação contra *Staphylococcus aureus*. Dentre as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli*, não apresentou formação de halo de inibição, o que sugere o avanço no estudo deste grupo de

microrganismos, tendo em vista que este grupo é responsável por grande parte de DTAs.

Cabe ressaltar que ambos os microrganismos (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) são classificados como principais patógenos de origem alimentar. Pozzo et al. (2011), ao analisarem o potencial de óleos essenciais de tomilho e orégano (*Origanum vulgare*) sobre 33 isolados de *Staphylococcus*, observaram maior efeito antimicrobiano para o óleo de tomilho, sendo este possivelmente relacionado ao conteúdo de carvacrol e timol. Em estudo realizado por Ramos et al. (2012), foi relatado considerável atividade antimicrobiana de óleo essencial de tomilho frente à *Xanthomonas albilinea*. Utilizando a técnica de disco difusão Cruz et al. (2020) avaliaram o potencial antibacteriano de óleo essencial de tomilho branco frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo o resultado da análise por medição dos halos de inibição. O óleo essencial apresentou capacidade inibitória para ambos microrganismos avaliados, sendo mais efetivo na concentração 100%.

Muitos estudos comprovam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho, como Lesnik et al. (2017) que observaram a inibição de *Salmonella* spp. em amostras de alface as quais foram contaminadas com o patógeno. Outra pesquisa, também com o objetivo de avaliar a eficiência do óleo de tomilho, foi realizada por Araújo et al. (2018) na qual os pesquisadores comparam diferentes tipos de óleos essenciais, dentre eles, tomilho (*Thymus vulgaris*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*), cravo botão (*Eugenia caryophyllus*) e funcho doce (*Foeniculum vulgare dulce*) na inibição do crescimento *in vitro* de *Escherichia coli*. Dentre os óleos essenciais estudados, o de tomilho foi o que apresentou maior eficácia no controle de *Escherichia coli*.

Diante de todos os estudos expostos até aqui, é possível considerar que os principais constituintes do óleo essencial de tomilho atuam na inibição de microrganismos, principalmente os patogênicos, sendo promissora sua aplicação em alimentos.

4.5 Aplicação de óleos essenciais em produtos cárneos

Os consumidores de um modo geral têm questionado o uso dos métodos convencionais de conservação de alimentos, principalmente os relacionados a conservantes químicos sintéticos, devido à grande mudança no estilo de vida dos últimos anos, com o maior acesso à informação e o desenvolvimento de novas tecnologias. Com a crescente busca por produtos mais nutritivos e naturais, óleos essenciais são alternativas para redução do uso de aditivos sintéticos. Os óleos essenciais bem como seus componentes isolados são agentes antimicrobianos naturais presentes na maioria das plantas (COWAN, 1999). Estes compostos são substâncias que podem eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos (RAMOS et al., 2007). Na literatura é possível encontrar estudos que indicam que a utilização de óleos essenciais é viável em cortes e produtos cárneos contra bactérias e outros tipos de microrganismos causadores de doenças alimentares, bem como os que deterioram a integridade do alimento. Dias (2015) produziu mortadelas com redução de nitrato de sódio e adição de óleos essenciais de orégano (*Origanumvulgaris*), tomilho (*Thymusvulgaris*), cubeba (*Litseaecubeda*). Além da substituição do nitrato de sódio o estudo também buscou de determinar a concentração mínima bactericida dos diferentes óleos essenciais sobre *Clostridium difficile*, bactéria associada à ingestão de alimentos contaminados, e também foram avaliados alguns aspectos sensoriais. O atributo sabor foi o mais afetado, o que pode implicar em baixa aceitação do produto, pois este é um fator determinante de compra. Em relação ao efeito bactericida, todas as combinações de óleos essenciais apresentaram eficiência em baixas concentrações.

A carne, por ser um alimento muito perecível, é suscetível ao ataque de diversos microrganismos, sendo este um dos grandes problemas que a indústria de alimentos enfrenta, a deterioração rápida de carnes. Neste sentido, Santurio (2015) avaliou como forma natural antimicrobiana óleo essencial de tomilho (*Thymusvulgaris*) e o componente timol; óleo essencial de canela (*Cinnamomumverum*) e o componente cinamaldeído; óleo essencial de orégano (*Origanumvulgaris*) e o componente carvacrol. O autor realizou testes *in vitro*, frente a coliformes totais e coliformes termotolerantes. Como resultado,

foi observada redução na contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes com a adição dos óleos essenciais. Os óleos essenciais de tomilho e de canela mostraram resultados positivos na concentração de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; já o óleo essencial de orégano foi eficiente na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjerona (*Origanum majorana*) também foi constatada quando aplicada em linguiça frescal, confirmando um efeito bacteriostático sobre *Escherichia coli*, além de uma redução na contagem total de microrganismos (BUSATTA et al., 2008).

Vivian et al. (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e manjericão (*Ocimum basilicum* L), aplicados a um produto cárneo para o controle de *Salmonella entérica* do soro tipos Typhimurium e Enteritidis, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. A análise foi realizada com diferentes concentrações de óleos essenciais e em quatro tempos distintos. O óleo essencial mais eficaz foi o *Origanum vulgare*, seguido da mistura dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Ocimum basilicum*.

Angioletti et al. (2018) avaliaram o efeito antimicrobiano e antioxidante de óleos essenciais em material para revestimento de carne bovina refrigerada. As pesquisas mostraram que óleo essencial de manjericão (*Ocimum basilicum*), alho (*Allium sativum*), gengibre (*Zingiber officinale*), sálvia (*Salvia officinalis*), alecrim (*Salvia tosmarinus*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) são capazes de reduzir a oxidação lipídica em carne bovina, armazenada a 4 °C. Os óleos essenciais de orégano, manjericão e alho diminuem também a oxidação proteica, e óleo essencial de tomilho e alho reduzem a oxidação dos pigmentos. Os óleos essenciais apresentam grande potencial para serem inseridos em embalagens de produtos cárneos, tendo em vista a evidente capacidade antimicrobiana e antioxidante que os mesmos possuem, além de serem opções naturais de conservação de alimentos.

Devido aos fatores externos como ar atmosférico, luminosidade e temperatura, os óleos essenciais apresentam alta taxa de degradação. Além disso, mesmo sendo compostos de origem natural, podem apresentar toxicidade alta. Ainda, as características sensoriais, como odor e sabor são bastante expressivas. Devido ao exposto, sua encapsulação torna a aplicação

efetiva em alimentos, visando a minimização desses problemas. A nanotecnologia oferece uma gama de possibilidades para encapsulação de óleos essenciais e aplicação de nanomateriais com propriedades antimicrobianas, por exemplo, na formação de embalagens ativas para alimentos.

4.6 Nanotecnologia

A nanotecnologia envolve a fabricação, manipulação e caracterização de estruturas, dispositivos ou materiais em uma escala que pode variar ao tamanho de um átomo a moléculas de até 999 nanômetros. A manipulação de materiais na escala nanométrica pode modificar propriedades como cor, condutividade, reatividade, ponto de fusão, entre outras, criando novas aplicações para os materiais, sendo assim considerada uma ciência multidisciplinar com aplicações em distintos setores. A indústria alimentícia busca alternativas para aumentar a vida útil dos alimentos utilizando diferentes métodos, priorizando o uso de novas tecnologias que conservem os alimentos sem que seja necessário o uso de conservantes químicos (BRIDLE, 2014).

A nanotecnologia tem sido estudada para várias aplicações, sendo crescente trabalhos na área de alimentos. Exemplo disso é a encapsulação de compostos bioativos para elaboração de embalagens e suplementos nutricionais (DUNCAN, 2011). Nanoestruturas estão sendo desenvolvidas para diferentes finalidades, principalmente visando aumentar a vida útil dos alimentos, sendo possível devido aos novos materiais aplicados na elaboração de embalagens de alimentos, por exemplo (CHAUDHRY et al., 2008).

Para a elaboração de nanomateriais existem diferentes técnicas, dentre estas está a de *electrospinning*. Por meio desta técnica são elaboradas nanofibras, onde no processo são necessários três componentes essenciais, como mostrado na Figura 2: uma fonte de alta tensão; um tubo capilar (contendo a solução polimérica) com uma agulha de pequeno diâmetro e, uma placa condutora aterrada ao coletor (SALLES, 2013). A solução polimérica contida na seringa é eletricamente carregada, por alta voltagem (por meio de uma fonte de alta tensão), formando um jato que sai da agulha da seringa em direção ao coletor. Durante essa trajetória, o solvente evapora e o polímero

precipita, originando uma manta de fibras de diâmetros micro ou nanométricos (SCHUEREN et al., 2010; JÚNIOR et al., 2013).



Figura 2: Representação esquemática do processo de *electrospinning*

Fonte: Bhushani e Anandharamakrishan (2014).

Segundo Fonseca et al. (2019) os parâmetros reológicos, bem como a avaliação do comportamento de cada solução polimérica utilizada na elaboração das nanofibras influenciam diretamente nas características das nanofibras formadas. Para elaboração destas, podem ser utilizados diferentes tipos de polímeros, sendo eles sintéticos, naturais, ou até mesmo a mistura dos dois.

Os polímeros naturais como quitosana, zeína, gelatina, celulose e colágeno, são alguns exemplos que demonstram eficiência no processo de elaboração de nanofibras naturais (BHARDWAJ & KUNDU, 2010). Por ser conhecida devido a sua alta resistência térmica e grande propriedade de barreira ao oxigênio, a zeína, proteína do milho, apresenta várias vantagens de biocompatibilidade e biodegradabilidade (YANG et al., 2017; NEO et al., 2016). Esses materiais podem ser utilizados para a produção de estruturas avançadas para aplicações na elaboração de embalagens ativas e inteligentes (MIHINDUKULASURIYA & LIM, 2014). Kringel et al. (2019) avaliaram o efeito de cápsulas de zeína e complexo de inclusão entre β -ciclodextrina e óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* L) visando a inibição do crescimento de *Aspergillus* spp. em bolos. Como resultado foi observado que o óleo essencial retardou efetivamente a deterioração microbiológica dos bolos de 30 para 150 dias, sendo assim, seria

uma alternativa de aumentar a estabilidade microbiológica, e consequentemente, a vida-útil de bolos.

Fonseca et al. (2020) produziram nanofibras de amido de batata e carvacrol pela técnica *electrospinning*. As nanofibras apresentaram alta atividade antioxidante frente ao radical 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) e atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *Listeriamonocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichiacoli* e *Staphylococcusaureus*. Antunes et al. (2016) produziram fibras ultrafinas de zeína incorporadas com complexo de inclusão de β -ciclodextrina e óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptuscitriodora*). As membranas formadas apresentaram capacidade antimicrobiana, onde foi observada redução no crescimento de *Staphylococcusaureus* e *Listeriamonocytogenes*. Com isso a implementação da nanotecnologia com o objetivo antimicrobiano na indústria de alimentos tem grande potencial para garantir a segurança dos produtos ofertados à população (SRIVIDYA et al., 2017). Ademais, o uso da nanotecnologia para elaboração de nanomateriais com atividade antimicrobiana é promissor na elaboração de embalagens ativas para produtos alimentícios.

4.7 Embalagens ativas

As embalagens de alimentos possuem uma importância muito grande, uma das principais funções é a proteção contra o meio externo. Elas são responsáveis pela conservação e também informam o consumidor sobre o produto embalado (SILVA, et al 2018). Existem vários tipos de embalagens para alimentos, um exemplo são as embalagens ativas e inteligentes. As embalagens ativas, as quais são produzidas utilizando compostos bioativos, possuem o objetivo de aumentar a vida útil ou ainda aprimorar as características do alimento ali acondicionado. Elas possuem efeito diretamente no alimento e, através dos compostos, ocorre a liberação ou absorção de substâncias, garantindo benefícios que podem ser utilizados em diferentes formas de aplicabilidade. A embalagem ativa interage de maneira intencional com o alimento, aumentando sua vida útil pela prevenção à oxidação, deterioração e multiplicação de microrganismos patogênicos.

As pesquisas sobre embalagens ativas vêm sendo crescentes, dentre as mais estudadas está a proteção frente aos microrganismos, evitando deterioração por microrganismos, através de ação antibacteriana (BITTENCOURT et al, 2020). Com o objetivo de manter a qualidade e nutrientes em vegetais Marin et al. (2010) avaliaram o uso de antimicrobianos, em embalagens de polipropileno contendo sachês com 1-metilciclopropeno selados com filme biodegradável de amido e armazenados a 4 °C por 12 dias. O tratamento foi eficiente para o controle microbiano, garantindo uma vida útil de 5 dias para alfaces minimamente processadas, quando armazenadas em temperatura de refrigeração.

Para obtenção de uma embalagem ativa podem ser utilizadas técnicas de nanoencapsulação ou, microencapsulação de materiais, bem como a adição de agentes que atuem na matriz do material da embalagem como, por exemplo, o uso de óleos essenciais que visam proporcionar a garantia de alimentos seguros (JILDEH; MATOUQ, 2020). Ainda, as embalagens ativas são caracterizadas em sua maioria por serem biodegradáveis, sendo assim uma alternativa para atender as exigências ambientais e também dos consumidores, que estão optando cada vez mais por produtos deste seguimento.

5. PROJETO DE PESQUISA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS**



Projeto de Pesquisa

**Desenvolvimento de sachê de nanofibras e óleo essencial de tomilho
(*Thymus vulgaris*) com potencial antimicrobiano para aplicação em
bandejas com carnes.**

Eduarda Caetano Peixoto

Pelotas, outubro de 2020.

EDUARDA CAETANO PEIXOTO

Desenvolvimento de sachê de nanofibras e óleo essencial de tomilho (*ThymusVulgaris*) com potencial antimicrobiano para aplicação em bandejas utilizadas com carnes.

Projeto de qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Comitê de orientação

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (orientador)

Prof. (a). Dra. Elessandrada Rosa Zavarese (co-orientadora)

Dra. Laura Martins Fonseca (co-orientadora)

Pelotas, Outubro de 2020

RESUMO

PEIXOTO, Eduarda Caetano. **Desenvolvimento de sachê de nanofibras e óleo essencial de tomilho (*Thymus Vulgaris*) com potencial antimicrobiano para aplicação em bandejas utilizadas com carnes.** Universidade Federal de Pelotas. 2020.

A conservação de alimentos é um tema muito importante e segue atual. A busca por alimentos que possuem um menor percentual de conservantes químicos sintéticos têm aumentado exponencialmente. Neste sentido, tem-se buscado alternativas para substituir conservantes sintéticos por substâncias naturais, a exemplo, os óleos essenciais, produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas, os quais possuem ação antimicrobiana e antifúngica, podendo ser utilizados como conservantes naturais em alimentos. A carne em função de suas características intrínsecas como elevada atividade de água, pH próximo a neutralidade e grande disponibilidade de nutrientes, pode sofrer rápida deterioração microbiana. Este produto pode inclusive ser carreador de microrganismos patogênicos, quando não são seguidas as boas práticas para a sua obtenção, processamento e comercialização. Desta forma, é fundamental buscar formas de prolongar a vida útil de cortes cárneos. Neste contexto, este estudo tem como objetivo desenvolver e avaliar o potencial antimicrobiano de sachê de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) adicionado em bandejas de poliestireno com cortes cárneos. O sachê será avaliado quanto a sua capacidade em inibir o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in vitro* e inibir *in situ* microrganismos mesófilos aeróbios, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em cortes cárneos acondicionados em bandejas, em teste preliminares será avaliado a forma de como o sachê será acondicionado na bandeja de poliestireno. As fibras serão elaboradas pelo método de *electrospinning*, adicionadas de óleo essencial de tomilho para posterior aplicação em bandejas com cortes cárneos, onde se espera assim, aumentar a vida útil deste alimento.

Palavras chave: Substâncias naturais, Nanofibras, Microrganismos patogênicos; Conservação de alimentos.

SUMÁRIO

1. Introdução	9
2. Revisão bibliográfica	12
2.1. Produtos cárneos	12
2.2. Microrganismos patogênicos presentes em carne	13
2.3. Óleos essenciais.....	15
2.4. Óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	17
2.5. Aplicação de óleos essenciais em produtos cárneos.....	19
2.6. Nanotecnologia e nanofibras.....	21
3. Objetivos	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. Hipóteses	23
5. Material e métodos	24
5.1. Material	24
5.2. Produção e caracterização das soluções poliméricas formadoras de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho	24
5.2.1. Produção das nanofibras	25
5.2.2. Caracterização das nanofibras com óleo essencial de tomilho.	25
5.3. Avaliação <i>in vitro</i> do efeito antimicrobiano de sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho	26
5.3.1. Reativação dos microrganismos	27
5.3.2. Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera ou em fase a	

vapor	27
5.4. Avaliação <i>in situ</i> do efeito antimicrobianos de sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho em cortes cárneos acondicionados em bandejas	27
5.4.1. Preparação do corte cárneo em bandeja com sachê de nanofibras adicionados de óleo essencial de tomilho	27
5.4.2. Análises microbiológicas	28
5.4.2.1. Contagem de bactérias mesófilas aeróbias	29
5.4.2.2. Enumeração de <i>Escherichia Coli</i>	29
5.4.2.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	29
5.5. Análise sensorial	30
5.5.1. Aspectos éticos.....	31
5.5.2. Análise estatística	31
6. Resultados e impactos esperados	31
7. Cronograma	32
8. Orçamento	33
9. Referências	34

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1		33
Quadro 1		34

Lista de Figuras

Figura 1	17
-----------------	-----------

1. Introdução

O consumo de carne bovina, suína e de frango está em constante crescimento. Uma projeção realizada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2017, aponta maiores taxas de crescimento da produção no período até 2028. Segundo o estudo, a carne suína e a carne de frango aumentarão em 2,6% ao ano e a carne bovina tem um crescimento projetado de 1,9% ao ano. A projeção para o final da próxima década é produzir 34,2 milhões de toneladas de carne de frango, bovina e suína (MAPA, 2018).

A carne *in natura*, devido a sua composição química, juntamente com fatores intrínsecos como atividade de água e pH, se torna um meio propício para o crescimento e multiplicação de diferentes tipos de microrganismos (ORDONHEZ, 2005). Estes são classificados em dois grupos, os deteriorantes e os patogênicos. Os deteriorantes são causadores de alterações químicas, físicas e sensoriais, sendo prejudiciais ao aspecto do alimento, como por exemplo, modificação de cor, do odor, da textura e do sabor (MORAES, 2010). Os principais microrganismos envolvidos na deterioração de alimentos são *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Shewanellaputrefaciens*, *Brochotrixthermosphacta*, *Lactobacillus*, algumas espécies da Família *Enterobacteriaceae*, e ainda as leveduras e os bolores (ALCANTRA et al., 2012). O grupo de microrganismos patogênicos também pode estar presente na carne *in natura*, responsável pelas doenças transmitidas por alimentos (DTA). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as DTA são aquelas de natureza infecciosa ou tóxica, causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados por agentes biológicos, químicos e físicos, representando um grave risco à saúde.

Segundo Melo et al. (2018), DTA representam um importante problema de saúde pública, por acometerem milhões de pessoas em todo o mundo. Tratando-se de carne, as principais bactérias patogênicas encontradas são: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonellaspp.*, *Yersiniaenterocolítica* e *Clostridium perfringens* (ESTEVES, 2006). Perante o cenário apresentado, visa-se o aumento da vida útil e a comercialização de alimentos seguros, a partir do uso de aditivos químicos para conservação de produtos alimentícios.

A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, conforme a Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997, define aditivos químicos como substâncias que quando incorporadas ao alimento, irão manter ou melhorar as propriedades químicas, físicas, sensoriais e nutricionais, bem como inibir o desenvolvimento e multiplicação microbiana. Diferentes tipos de aditivos alimentares são permitidos pela legislação brasileira para a fabricação de diversos produtos de origem animal, entretanto, se observa que muitos podem ser a causa de problemas de saúde, relacionados ao seu uso, sendo muitos associados a alergias e até mesmo ao desenvolvimento de células cancerígenas (POLÔNIO e PERES, 2009).

Dessa forma, existe uma preocupação muito grande, principalmente por parte do consumidor, por alimentos não contenham aditivos químicos em sua composição. Neste contexto, o uso de óleos essenciais derivados de plantas aromáticas torna-se alternativa viável e natural em substituição a estes aditivos. Por serem formados por diferentes compostos químicos, os óleos essenciais, em grande maioria, apresentam alta bioatividade, como por exemplo, a capacidade de inibir microrganismos, além de apresentarem atividade antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória (PEREIRA, 2006; SILVA et al., 2019).

Nos últimos anos, é gradativo o número de pesquisas realizadas com o intuito de obterem-se novos métodos para conservação de alimentos. Estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos de origem clínica e alimentar têm sido realizados, principalmente *in vitro* (SANTOS et al., 2017). É válido ressaltar que o uso de óleos essenciais com efeito antimicrobiano em contato direto com o alimento apresenta limitações, havendo pesquisas que demonstram o impacto negativo nas características sensoriais do produto alimentício (MENDONÇA, 2018), porém existem possibilidades para que estes óleos essenciais desenvolvam a função de conservação, sem contato direto com o alimento. Exemplo disto é o estudo que Oliveira (2017) realizou com cobertura de quitosana contendo óleo essencial de Sálvia (*Salvia officinalis* L.) em morangos, com o propósito de amenizar interferências sensoriais. Fonseca et al. (2020) também realizaram um estudo, onde avaliaram a atividade antioxidante de extrato da casca de pinhão encapsulado em fibras de amido e os resultados indicaram que o material apresentou

potencial antioxidante. Outra pesquisa realizada em 2017 por Rutz et al. destacou a eficiência do óleo de palma contendo alto teor de carotenóides, encapsulado com quitosana e xantana, apontando um perfil de liberação satisfatório de carotenóides.

No que tange a encapsulação desses óleos essenciais em matrizes com escala nanométrica, como nanofibras, esta é promissora devido a sua alta área superficial em relação ao volume e possibilidade de uma liberação controlada e específica dos compostos dos óleos essenciais. A nanotecnologia apresenta uma área de pesquisa muito ampla, com grande potencial para implementação de inovações na indústria de alimentos, desde a produção até o processamento, armazenamento e desenvolvimento de novos produtos para fins específicos (LA ROCHA, 2014). A nanotecnologia é uma tendência atual na ciência do século XXI que pode ser aplicada em diversas áreas indústria de alimentos, permitindo o desenvolvimento de novos materiais para produção de embalagens, além de ser um método que melhora a segurança alimentar (GOMES et al., 2015). As nanofibras de celulose, também têm sido utilizadas para aprimorar o desempenho e propriedades de embalagens (ASSIS et al., 2012).

Em um trabalho de Kuntzler (2017) foi realizada a produção de nanofibras poliméricas incorporadas com compostos fenólicos obtidos da microalga *Spirulina* com potencial propriedade antimicrobiana. Outros estudos foram encontrados relatando a encapsulação de óleos essenciais. Radunz (2017) encapsulou óleo essencial de cravo-da-índia com o objetivo de testar a atividade bactericida em diferentes tipos de microrganismos patogênicos. O óleo essencial encapsulado apresentou forte atividade antimicrobiana com potencial para controle microbiológico. Entretanto, são poucos os estudos focados na produção de um nanomaterial com atividade antimicrobiana aplicado à conservação de cortes cárneos.

Levando em consideração a escassez de pesquisas sobre o assunto, este estudo visa o desenvolvimento de um sachê de nanofibras de zeína incorporados de óleo essencial de tomilho buscando verificar se o mesmo é capaz de inibir *in vitro* desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e inibir *in situ*, em cortes cárneos acondicionados em bandejas

de poliestireno, microrganismos mesófilos aeróbios, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Produtos cárneos

A industrialização da carne consiste na transformação destas em produtos cárneos. Antigamente o único objetivo deste processo era apenas a conservação, entretanto, além de conservar, outra finalidade é diversificar o mercado (PELEGRINI, 2008). Os embutidos cárneos são exemplos clássicos da industrialização, pois são constituídos a base de carne triturada e condimentada, embutidos sob pressão em um recipiente ou envoltório de origem orgânica ou inorgânica, que seja destinado para este fim. Podem ser classificados em curados (salgados), de massa grossa, fermentado ou não, de massa fina ou em pedaços (MAPA, 2018).

Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal RIISPOA (2017), embutidos são produtos cárneos elaborados com carne ou órgãos comestíveis, curados ou não, condimentados, cozidos ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório a tripa, bexiga ou outra membrana animal, ou envoltórios artificiais.

A estrutura da carne é constituída por três tecidos: o tecido muscular no qual encontram-se miofilamentos, miofibrilas, miofibras e feixe de fibras; o tecido conjuntivo formado por colágeno e elastina e, o tecido adiposo (FEIJÓ, 1999). A carne é considerada um alimento completo devido a sua composição química, possuindo grande quantidade de aminoácidos, vitaminas e alto teor de ferro (SOARES et al., 2017). Além disso, é fonte de proteínas com alto valor biológico devido a sua biodisponibilidade no organismo. Os lipídeos também estão presentes na composição química da carne, e variam de acordo com alguns fatores, como raça, sexo e alimentação do animal. Em relação às vitaminas, são encontradas as lipossolúveis (A, D, E e K), as hidrossolúveis do complexo B (tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina, ácido pantotênico, ácido fólico, niacina, cobalamina e biotina) e em menor quantidade a vitamina C. Ferro, fósforo, potássio, sódio, magnésio e zinco são os minerais presentes

na carne. Cabe ressaltar o ferro, sendo fonte expressiva deste mineral, onde 40% a 60% é altamente absorvido pelo organismo (RAMOS & GOMIDE, 2012).

Como comentado anteriormente, a carne é um alimento de alto nível de perecibilidade, devido a sua composição química. Além de possuir muitas substâncias orgânicas e inorgânicas o teor de água presente na carne é de aproximadamente 70% (SABADINI et al., 2001). As alterações da carne são em grande parte por ação dos microrganismos e, posteriormente, precedem outras formas de deterioração (IBARRA, 1983). A conservação da carne envolve a aplicação de medidas que diminuem ou previnem as alterações microbiológicas, enzimáticas e químicas/físicas (THOMAS et al., 2008).

2.2 Microrganismos patogênicos presentes em carne

Os microrganismos presentes na carne bovina estão diretamente ligados aos processos de deterioração, infecção e intoxicação alimentar. A contaminação pode ocorrer por diferentes fatores, como por exemplo, o contato da carne com o conteúdo gastrointestinal, bem como a falta de higiene apropriada nos equipamentos utilizados para industrialização da carne, desde os usados para o abate até o armazenamento; a água de lavagem da carcaça. Sendo assim, a contaminação pode ocorrer durante todas estas etapas (BARROS & VIOLANTE, 2014). Segundo a OMS as DTA são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por agentes biológicos, químicos e físicos, representando risco à saúde (BRASIL, 2010). Em 2017 foram notificados mais de 12 mil surtos de DTAs no Brasil, onde 92% foram de origem bacteriana. As regiões Sudeste e Sul apresentaram os maiores índices de DTA no país (BRASIL, 2018) e os principais agentes envolvidos nestes, segundo o Ministério da Saúde, são *Escherichiacoli*, *Staphylococcusaureus* e *Salmonella* spp.

Staphylococcus aureus são microrganismos pertencentes à família Micrococcaceae, são cocos Gram-positivos e anaeróbios facultativos, que por produzirem catalase tem maior crescimento sob condições aeróbias (LOPES et al., 2006). Em humanos, *Staphylococcus aureus* é encontrado na pele e cavidades nasais, e sua presença em algumas condições causam uma ampla variedade de infecções (SALES & SILVA, 2012).

Para causar uma intoxicação, a quantidade de *Staphylococcus aureus* deve apresentar-se próxima a 10^6 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama (g) de alimento ingerido (RODRIGUES et al., 2004).

Uma pesquisa realizada por Pereira et al. (2016), teve como objetivo analisar amostras de churrasquinho de carne bovina, para verificar o crescimento bacteriano. O estudo apontou que 15% das amostras estavam contaminadas por *Staphylococcus aureus* e a presença deste pode estar relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos. Muitos manipuladores de alimentos não fazem uso de equipamentos de proteção individual (EPI), indo contra as Boas Práticas de Manipulação. A ausência destes equipamentos contribui para o aumento da proliferação de diversos microrganismos. Outros fatores que podem estar relacionados com o aumento da contagem bacteriana nos alimentos são as características destes, como por exemplo, umidade, pH, atividade de água, bem como a temperatura de armazenamento e a embalagem em que o mesmo está acondicionado (ANDRADE et al., 2019).

Outro patógeno comumente encontrado em alimentos é a *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram-negativos não esporulados, móveis ou não e são anaeróbios facultativos (FORSYTHE, 2013). As cepas de *Escherichia coli* possuem grande capacidade de adaptação, sendo assim, possuem potencial para provocar um amplo espectro de doenças (MADIGAN et al., 2016). Estudo realizado por Adwan et al. (2015) na Palestina, analisaram 40 amostras de carne fresca e congelada, e os resultados do estudo indicou presença de diversos microrganismos, sendo *Escherichia coli* presente em 95% das amostras testadas. Brusa et al. (2013) avaliaram 450 amostras de carne bovina moída, comercializada em supermercados na Argentina, onde 30% das amostras foram positivas para *Escherichia coli*. Ambas pesquisas apontam a importância deste microrganismo em questão, pois como mencionado anteriormente *Escherichia coli* é responsável pela maior parte de DTA que acometem diversos indivíduos a nível mundial.

Assim como os demais microrganismos citados, *Salmonella* spp. é um agente veiculador de DTA. Este patógeno de características Gram-negativas, não esporuladas, anaeróbios facultativos, fazem parte da família Enterobacteriaceae, que abrange diversas espécies (SANTURIO et al.,

2007). A salmonelose é uma doença de grande transtorno à saúde pública mundial, devido à capacidade de causar toxi-infecção alimentar, podendo levar ao óbito o indivíduo que consumir o alimento contaminado (FILHO et al., 2014). Dentre os alimentos com maior incidência em casos de salmonelose estão os ovos, leite, carnes de aves e bovina (MENDONÇA, 2016). Barcelos et al. (2016) realizaram um estudo em saladas contendo maionese comercializada em restaurantes. Do total das amostras, 30% apresentaram presença de *Salmonella* spp. Outro estudo realizado por Bergamo et al. (2020), avaliaram a presença de *Salmonella* spp. em 89 amostras de produtos cárneos comercializados na região Sul do Rio Grande do Sul. Foi constatada a presença de *Salmonella* spp. em 19,1% das amostras avaliadas.

Um questionário aplicado por Rodrigues (2015) questiona os participantes do estudo sobre o conhecimento do meio de transmissão de doenças por meio de alimentos. Como resultado, a maior parte dos entrevistados diz desconhecer os meios de contaminação de alimentos. Este resultado indica a falta de debate do assunto ou até mesmo instruções de maneira que visem evitar possíveis surtos de DTA. Uma possível alternativa de conservação de alimentos visando minimizar possíveis surtos alimentares, é o uso de óleos essenciais como aditivos, propiciando um aumento de vida útil, substituindo os aditivos químicos sintéticos utilizados pelas indústrias alimentícias. Os óleos essenciais são efetivos para retardar o crescimento de microrganismos causadores de doenças e da deterioração de alimentos.

2.3 Óleos essenciais

As plantas aromáticas são usadas como temperos, para realçar o sabor de diversos alimentos (CUTRIM et al., 2019). O homem utiliza desde a antiguidade, plantas aromáticas, tanto na alimentação, usadas como temperos, para realçar o sabor de diversos alimentos, como no tratamento de determinadas doenças (ANDRADE, 2010). Dentre as substâncias obtidas do metabolismo secundário das plantas aromáticas estão os óleos essenciais, formados por diferentes compostos químicos, na sua maioria com alta bioatividade, como por exemplo, a capacidade de inibir microrganismos, sendo muitos óleos essenciais considerados agentes antimicrobianos presentes em

plantas. Os óleos essenciais também podem apresentar atividade antioxidante e anti-inflamatória, dentre outras (PEREIRA, 2006).

Os óleos essenciais são constituídos por elementos voláteis contidos em vários órgãos das plantas e, assim, são denominados devido à sua composição lipofílica. Podem ainda receber outras denominações como essências, óleos etéreos ou ainda óleos voláteis, tendo em vista algumas características físico-químicas (MATTOS et al., 2007). Quimicamente, os óleos essenciais em sua maioria, são constituídos por uma mistura de substâncias terpênicas, como os hidrocarbonetos e eventualmente de derivados do fenol, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta (ALINKINA et al., 2013). O isopreno é a unidade básica dos terpenos, o qual é formado por uma molécula com cinco átomos de carbono. Devido às ligações químicas o isopreno forma diferentes estruturas de terpenos, como por exemplo, os monoterpenos que são formados pela ligação de duas moléculas de isopreno. Outro exemplo, são os sesquiterpenos, os quais são obtidos por meio da ligação de três moléculas de isopreno. Essas são as principais estruturas presentes em óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008). Muitos fatores podem influenciar no conteúdo do óleo essencial, sendo a espécie da planta o fator mais considerável. Além deste, as condições ambientais como temperatura, umidade relativa, exposição solar e tipo de solo também modificam as características, assim como o ciclo vegetativo em que a planta se encontra, e a presença de micronutrientes, os quais também influenciam na atividade biológica do óleo (MATTOS et al., 2007). O método de extração também pode influenciar no conteúdo do óleo essencial. Existem diferentes metodologias para sua obtenção. O mais indicado é definido conforme a localização do óleo essencial na planta e com a proposta da sua utilização (SIMÕES et al., 2010).

Dentre eles estão incluídos os processos convencionais, como a extração com solvente orgânico, destilação a vapor d'água, hidrodestilação, hidrofusão, bem como o uso de outras tecnologias, como a extração com solvente e alta pressão, fluido supercrítico com gás carbônico (CO₂), extração ultra-sônica e extração por micro-ondas sem solventes (COSTA et al., 2006). Embora os processos de extração de óleos essenciais tenham avançado com a ajuda da tecnologia, a escolha da técnica para a extração destes é um fator

determinante para obtenção do maior rendimento do material extraído (AMARNI et al., 2010). Como já mencionado, os óleos essenciais atuam na inibição do crescimento bacteriano, visto que afetam a integridade da membrana celular por possuírem constituintes lipofílicos, os quais são responsáveis por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (SILVEIRA et al., 2012). Entre os óleos essenciais que tem demonstrado promissora atividade antimicrobiana, encontra-se o óleo essencial extraído do tomilho.

2.4 Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Thymus vulgaris é uma planta aromática da qual se utiliza as folhas e os ramos na culinária, como condimento e erva aromática (SANTORO, 2007). Originária da Europa e cultivada no Sul e Sudeste do Brasil é conhecida popularmente por Tomilho, pertence à família Lamiaceae, a qual possui cerca de 150 gêneros e quase 3 mil espécies distribuídas pelo mundo que diferenciam-se em características morfológicas e na composição de óleos essenciais, além de um odor forte e penetrante e, por vezes, um sabor muito pronunciado balsâmico e picante (CORTICCHIATO et al., 1998; PORTE & GODOY, 2001). O tomilho possui em média de 20 a 30 cm de altura, com ramos e folhas verdes escuras (NASCIMENTO et al., 2000), conforme demonstrado na Figura 1.



Figura 1: Tomilho *Thymus vulgaris* in natura.

Os principais constituintes químicos do óleo essencial de tomilho são carvacrol e o timol. Estes componentes são os responsáveis pela atividade antimicrobiana que o óleo essencial apresenta (DAFERERA et al., 2000). Há muito tempo se estuda o efeito antimicrobiano do óleo essencial de tomilho. Diversos pesquisadores descrevem o potencial antimicrobiano deste óleo essencial, bem como a sua aplicação em produtos alimentícios, com o objetivo de conservá-lo por maior tempo. Dorman; Deans(2000) realizaram um experimento com óleo essencial de tomilho em 25 bactérias, (sendo 9 Gram-positivas e 16 Gram-negativas) e relataram por meio do teste de halo de inibição maior atividade inibitória frente a bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus*.

Chalfoun et al. (2004) avaliaram o efeito *in vitro* de óleos essenciais, dentre estes o de tomilho em diferentes concentrações. Nas concentrações mais altas, de 1500 mg/mL e 2000 mg/mL, foi possível observar a inibição do desenvolvimento de diferentes tipos de fungos. Pereira et al. (2008) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar se o óleo essencial de tomilho diminuiria a germinação de *Cercosporacoffeicola*, uma doença que afeta as lavouras cafeeiras. O resultado foi positivo, pois inibiu a germinação e o crescimento micelial contra *Cercosporacoffeicola*. Silva; Rangel (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* dos componentes do extrato etanólico de tomilho. Os microrganismos analisados foram *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo observada uma melhor atividade antimicrobiana sobre as cepas Gram-positivas, tendo uma maior ação em *Staphylococcus aureus*. Entre as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli*, apresentou inatividade total do extrato etanólico. Cabe ressaltar que ambos os microrganismos são classificados como principais patógenos de origem alimentar. Resultado semelhante foi encontrado por Pozzo et al. (2011), que analisaram o potencial de óleos essenciais de tomilho e orégano sobre 33 isolados de *Staphylococcus* spp., observaram maior efeito antimicrobiano para o óleo de tomilho, sendo este possivelmente relacionado ao conteúdo de carvacrol e timol.

Em estudo realizado por Ramos et al. (2012) foi relatado considerável atividade antimicrobiana de óleo essencial de tomilho frente à *Xanthomonas albilinea*, Utilizando a técnica de disco-difusão Cruz et al.

(2020) avaliaram o potencial antibacteriano de óleo essencial de tomilho branco frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O resultado da análise foi por medição dos halos de inibição que, por sua vez, o óleo essencial apresentou capacidade antimicrobiana para ambos microrganismos avaliados, sendo mais efetivo na concentração 100%.

Muitos estudos comprovam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho, como Lesnik et al. (2017) que observaram diminuição de *Salmonella* spp. em amostras de alface que foram contaminadas com o patógeno. Outra pesquisa, também com o objetivo de avaliar a eficiência do óleo de tomilho, foi realizada por Araújo et al. (2018) na qual os pesquisadores compararam diferentes tipos de óleos essenciais, dentre eles, *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Eugenia caryophyllus* (cravo botão) e *Foeniculum vulgare dulce* (funcho doce), na inibição do crescimento *in vitro* de *Escherichia coli*. Entre os óleos essenciais estudados, o de tomilho foi o que apresentou maior eficácia no controle de *Escherichia coli*. Diante de todos os estudos expostos até aqui, é possível considerar que os principais constituintes do óleo essencial de tomilho atuam na eliminação de microrganismos, principalmente os patogênicos, sendo promissora sua aplicação em alimentos.

2.5 Aplicação de óleos essenciais em produtos cárneos

Os consumidores de um modo geral têm questionado o uso dos métodos convencionais de conservação de alimentos, devido à grande mudança no estilo de vida dos últimos anos, como o acesso à informação e o desenvolvimento de novas tecnologias. Com a crescente busca por produtos mais nutritivos e naturais, óleos essenciais são possibilidades para redução de aditivos sintéticos. Os óleos essenciais bem como seus componentes isolados são agentes antimicrobianos naturais presentes na maioria das plantas (COWAN, 1999). Estes compostos são substâncias que podem eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos (RAMOS et al., 2007).

Na literatura é possível encontrar estudos que indicam que a utilização de óleos essenciais é viável em cortes e produtos cárneos contra bactérias e outros tipos de microrganismos causadores de doenças alimentares, bem como os que deterioram a integridade do alimento. Dias (2015) produziu mortadelas com redução de nitrato de sódio e adição de óleos essenciais de

orégano(*Origanum vulgare*), tomilho(*Thymus vulgaris*), cubeba(*Litsea cubeba*), com o objetivo de determinar a concentração mínima bactericida dos diferentes óleos essenciais sobre *Clostridium difficile*, bactéria associada à ingestão de alimentos contaminados e alguns aspectos sensoriais. O atributo sabor foi o mais afetado, o que pode implicar em baixa aceitação do produto, pois este é um fator determinante de compra. Em relação ao efeito bactericida, todas as combinações de óleos essenciais apresentaram eficiência em baixas concentrações.

A carne, por ser um alimento muito perecível, é suscetível ao ataque de diversos microrganismos, tornando-se um dos grandes problemas que a indústria de alimentos enfrenta, a deterioração de carnes. Neste sentido, Santurio (2015) avaliou óleo essencial de tomilho e o componente timol; óleo essencial de canela e o componente cinamaldeído; óleo essencial de orégano e o componente carvacrol, como forma natural antimicrobiana. O autor realizou testes *in vitro*, frente a 20 espécies de *Escherichia coli*. Como resultado, foi observada redução na contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes com a adição dos óleos essenciais. Os óleos essenciais de tomilho e de canela mostraram resultados positivos na concentração de 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$; já o óleo essencial de orégano foi eficiente na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjerona também foi constatada quando aplicada em linguiça frescal, confirmando um efeito bacteriostático sobre *Escherichia coli*, além de uma redução na contagem total de microrganismos (BUSATTA et al., 2008).

Vivian et al. (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e manjerição (*Ocimum basilicum* L), aplicados a um produto cárneo para o controle de *Salmonella enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. A análise foi realizada com diferentes concentrações de óleos essenciais e em quatro tempos distintos. O óleo essencial mais eficaz foi o *Origanum vulgare*, seguido da mistura dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Ocimum basilicum*. Chouliara et al. (2010) estudaram o efeito da adição de óleo essencial de orégano em peito de frango, armazenado a 4°C, e relataram que a aplicação do óleo, na concentração de 0,1%, resultou

em um aumento de 3-4 dias na vida de prateleira do produto avaliado sensorialmente.

Angioletti et al. (2018) avaliaram o efeito antimicrobiano e antioxidante de óleos essenciais em material para revestimento de carne bovina refrigerada. As pesquisas mostram que óleo essencial de manjerição, alho, gengibre, sálvia, alecrim e tomilho são capazes de reduzir a oxidação lipídica em carne bovina, armazenada a 4 °C. Os óleos essenciais de orégano, manjerição e alho diminuem também a oxidação proteica, e óleo essencial de tomilho e alho reduzem a oxidação dos pigmentos.

Os óleos essenciais apresentam grande potencial para serem inseridos em embalagens de produtos cárneos, tendo em vista a evidente capacidade antimicrobiana e antioxidante que os mesmos possuem, além de serem opções naturais de conservação de alimentos.

2.6 Nanotecnologia e nanofibras

A indústria alimentícia busca alternativas para aumentar a vida útil dos alimentos utilizando diferentes métodos, priorizando o uso de novas tecnologias que conservem os alimentos sem que seja necessário o uso de conservantes químicos. A nanotecnologia envolve a fabricação, manipulação e caracterização de estruturas, dispositivos ou materiais em uma escala que pode variar ao tamanho de um átomo a moléculas de até 999 nanômetros (BRIDLE, 2014). A nanotecnologia tem sido estudada para várias aplicações, sendo crescente na área de alimentos. Exemplo disso, temos encapsulamento de compostos bioativos para elaboração de embalagens e suplementos nutricionais (DUNCAN, 2011). Nanoestruturas estão sendo desenvolvidas para diferentes finalidades, principalmente visando aumentar a vida útil dos alimentos, sendo possível devido aos novos materiais de embalagens de alimentos (CHAUDHRY et al., 2008). O *electrospinning* é uma técnica de elaboração das nanofibras. No processo são necessários três componentes essenciais: uma fonte de alta tensão; um tubo capilar com uma agulha de pequeno diâmetro e, uma placa condutora aterrada (SALLES, 2013). A solução polimérica contida na seringa é eletricamente carregada, por alta voltagem, formando um jato que sai da agulha da seringa em direção ao coletor. Durante essa trajetória, o solvente evapora e o polímero precipita, originando uma manta de fibras de diâmetros

micro ou nanométricos (SCHUEREN et al., 2010; JÚNIOR et al., 2013). Segundo Fonseca et al. (2019) os parâmetros reológicos, bem como a avaliação do comportamento de cada solução utilizada na elaboração das nanofibras influenciam diretamente nas características das nanofibras formadas. Para elaboração destas podem ser utilizados diferentes tipos de polímeros, sendo eles sintéticos, naturais, ou até mesmo a mistura dos dois. Os polímeros naturais como quitosana, proteínas (zeína e gelatina), celulose e colágeno, são alguns exemplos que demonstram eficiência no processo de elaboração de nanofibras naturais (BHARDWAJ & KUNDU, 2010).

Por ser conhecida por alta resistência térmica e grande propriedade de barreira ao oxigênio, a zeína, proteína do milho, apresenta várias vantagens de biocompatibilidade e biodegradabilidade (YANG et al., 2017; NEO et al., 2016). Esses materiais podem ser utilizados para a produção de estruturas avançadas para aplicações na elaboração de embalagens ativas e inteligentes (MIHINDUKULASURIYA & LIM, 2014).

Kringel (2019) avaliou o efeito de cápsulas de zeína e complexo de inclusão entre β -ciclodextrina e óleo essencial de laranja visando a inibição do crescimento de *Aspergillus* spp. em bolos. Como resultado foi observado que o óleo essencial retardou efetivamente a deterioração microbiológica dos bolos de 30 para 150 dias, sendo assim, seria uma alternativa de aumentar a estabilidade microbiológica, e consequentemente, a vida-útil de bolos. Fonseca (2020) produziu nanofibras de amido e carvacrol pela técnica *electrospinning*. As nanofibras apresentaram alta atividade antioxidante frente ao radical ABTS e atividade antimicrobiana, reduzindo o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Diante disso, este estudo propõe disto uma alternativa de prolongar a vida útil de alimentos pela formação de embalagem ativa. Antunes (2016) produziu fibras ultrafinas de zeína incorporadas com complexo de inclusão de β -ciclodextrina e óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). As membranas formadas apresentaram capacidade antimicrobiana, onde foi observada redução no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. A implementação da nanotecnologia com o objetivo antimicrobiano na indústria de alimentos tem grande potencial para garantir a segurança dos produtos ofertados à população (SRIVIDYA et al., 2017).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de sachês de nanofibras de zeína incorporadas com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) na inibição *in vitro* de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e *in situ* de microrganismos mesófilos aeróbios, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em cortes cárneos.

3.2 Objetivos específicos

Desenvolver sachês de nanofibras de zeína incorporadas de óleo essencial de tomilho pela técnica de *electrospinning*;

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho em sachês de nanofibras de zeína em avaliação *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho em sachês de nanofibras de zeína em avaliação *in situ* da carne acondicionada em bandeja de poliestireno frente a microrganismos mesófilos aeróbios, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

Monitorar a evolução da contaminação microbiana do produto cárneo acondicionado em embalagens ativas elaboradas com sachê de nanofibras incorporadas com óleo essencial de tomilho durante o armazenamento a 7°C;

Avaliar a aceitabilidade pela análise sensorial dos produtos embalados na presença dos sachês.

4. Hipóteses

Sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho inibem *in vitro* microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Embalagens ativas com adição do sachê de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho para acondicionamento de cortes cárneos são capazes de inibir microrganismos mesófilos aeróbios, *Salmonella* e *Escherichia coli*.

O corte cárneo acondicionado em bandejas de poliestireno com sachê de nanofibras de zeína incorporado com óleo essencial de tomilho apresenta boa aceitação sensorial.

5. Material e métodos

5.1 Material

Será utilizado o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), obtido comercialmente da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais da cidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, acondicionado em frasco âmbar, lacrados, com volume de total de 100 mL e zeína comercial obtida da empresa Sigma-Aldrich, Brasil (97 % pureza, CAS 9010-66-6).

5.2 Produção e caracterização das soluções poliméricas formadoras de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho

As soluções poliméricas serão preparadas usando zeína em duas concentrações diferentes. Para o processo de nanofibras será utilizado 10% peso/volume de zeína. Inicialmente, a zeína será dissolvida em solução aquosa de etanol a 70% sob agitação. Será definido em testes preliminares as concentrações de óleo essencial de tomilho (p/p, óleo essencial de tomilho OEA/zeína), o qual será adicionado às soluções de polímero e agitado durante 15 min no escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Para a avaliação reológica das soluções poliméricas será utilizada a metodologia descrita por Fonseca (2020). Uma amostra de aproximadamente 0,5 mL das soluções formadoras de fibras, serão colocadas em um recipiente de aço inoxidável, o qual será acoplado a um reomêtro programável (Brookfield RS-CPS + Rheometer, EUA). A análise será realizada usando um fuso C50⁻¹ (cone 50 mm) e taxa de cisalhamento. Os dados serão analisados em software Rheo 3000 v1 2. Para condutividade elétrica, serão necessários 10 mL da solução formadora de fibras para posterior análise em um medidor portátil de condutividade (MS TECNOPON, modelo mCA 150P, Brasil). Os resultados serão expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. As soluções poliméricas serão submetidas ao processo de *electrospinning* para a produção das nanofibras.

5.2.1 Produção das nanofibras

Por meio da técnica de *electrospinning* ou eletrospiação serão produzidas as nanofibras. Adaptado de Fonseca (2016) após o preparo das soluções poliméricas formadoras de fibras, a amostra será injetada em uma seringa plástica com concentração a ser definida, acoplada diretamente em uma agulha metálica. A solução será bombeada com uma fonte de alta tensão (5 – 50 kV) e baixa corrente (0,5 – 1 μ A). 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.

5.2.2 Caracterização das nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho

A morfologia das nanofibras de zeína será avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MET), utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6610LV, EUA). As amostras serão colocadas em um suporte de aço inoxidável (“*stub*”), revestido por pulverização catódica (pulverização catódica, Denton Vacuum, Desk V, EUA). A análise será realizada com uma aceleração da tensão de 10 kV.

A distribuição do tamanho e o diâmetro médio das nanofibras de zeína serão medidas por meio de micrografias das fibras que serão selecionadas aleatoriamente, utilizando o software ImageJ (versão 2015, EUA).

Para analisar a composição química das nanofibras de zeína será utilizada a espectrometria infravermelha com transformada de Fourier (FT-IR) em equipamento com acessório de reflexão atenuada (ATR) (Afinidade IR, Shimadzu, Japão). A resolução espectral será de 4 cm^{-1} com 120 varreduras e um comprimento de onda entre 4000-5000 cm^{-1} a temperatura ambiente.

A análise termogravimétrica das nanofibras de zeína será realizada com auxílio de um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão), com uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ em uma faixa de 30–600 $^{\circ}\text{C}$ e fluxo de nitrogênio de 50 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$. Uma amostra de 5 mg será aquecida em cápsulas de platina. Será utilizada uma cápsula de platina como referência.

O ângulo de contato com a água será avaliado de acordo com metodologia utilizada por Bohmer-Maas (2020). As medições serão realizadas com base no ângulo de contato por meio de tensiômetro óptico (Theta Lite Modelo TL100; BiolinScientific, Suécia) a temperatura ambiente, e após, será feita a leitura em software *OneAttension* (BiolinScientific, Suécia). As nanofibras serão depositadas em uma folha de vidro, onde uma gota de água destilada (3,0 µL) será gotejada na superfície da membrana de nanofibras. O ângulo de contato com água e o tempo para a absorção da mesma serão captados por uma câmera digital.

A eficiência de encapsulação será realizada segundo Fonseca (2020) por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa, para a medição dos principais compostos fenólicos. Serão pesadas 15mg de nanofibras, as quais serão homogeneizadas em 0,5mL de água e agitado em vórtice, sendo posteriormente centrifugado por 2 minutos a 1500x *g*. Em seguida será adicionado 30 µl de hexano, e agitado novamente no vórtice. A fração polar da solução será injetada no cromatógrafo (GCMS QP2010 Ultra, Shimadzu TM, Kyoto, Japão) equipado com injetor automático AOC-20i e NIST 2011 acoplado ao espectro de massa dentro de uma coluna capilar OV-5MS (Agilent J & W DB-Wax, EUA, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). A temperatura de injeção será fixada em 200°C no modo Split (1:50), onde se utilizará gás hélio com fluxo de 1mL por min. Os parâmetros da análise serão desenvolvidos ao longo do estudo. Os resultados serão expressos em mg.g⁻¹ de óleo essencial de tomilho para os compostos fenólicos encapsulados nas nanofibras.

5.3 Avaliação *in vitro* do efeito antimicrobiano de sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho

A avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de tomilho será realizada pela atividade antimicrobiana em ensaios de micro-atmosfera. Serão testados os efeitos antimicrobianos do composto sobre as cepas padrão das espécies de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). A escolha destas espécies se deu pelo fato de possibilitar o teste do óleo essencial contra modelos de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*).

5.3.2 Reativação dos microrganismos

Os microrganismos utilizados no experimento serão mantidos sob congelamento em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias será transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) ou BHI e incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Após, uma alçada desse crescimento será estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *Escherichia coli* e ágar Baird-Parker para *Staphylococcus aureus*, e incubadas por 24 h a 37°C, para o isolamento das colônias. Após este período, será extraída uma colônia e re-suspendida em solução salina (NaCl) 0,85%, a qual será padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

5.3.3 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera ou em fase de vapor

A atividade antimicrobiana em micro-atmosfera será avaliada pela técnica proposta por Ghabraie et al. (2016) com pequenas modificações. Alíquotas de 0,1 mL de suspensões celulares dos microrganismos serão inoculados na superfície de placas com ágar BHI, TSA ou Muller-Hilton (MH) (15 mL/ camada de 6 mm). Na tampa de cada placa de petri serão posicionados discos de papel estéreis nos quais serão adicionadas diferentes quantidades do sachê contendo diferentes volumes de óleo essencial (100; 50; 25 e 12,5 µL). Posteriormente, as placas serão imediatamente fechadas de

modo invertido (tampa para baixo), e incubadas a 37°C por 24 h. A ação antimicrobiana será expressa pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos com a substância antimicrobiana comparados com um controle contendo água estéril. A concentração da substância antimicrobiana será expressa em função do volume de substância e do espaço livre na placa ($\pi \times r^2 \times h = 3,14 \times 4,52 \times 1,5 = 95 \text{ cm}^3$; $95 - 15 \text{ mL de ágar} = 80 \text{ cm}^3$ de espaço livre).

5.4 Avaliação *in situ* do efeito antimicrobiano de sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho em cortes cárneos acondicionados em bandejas de poliestireno

Preparação do corte cárneo em bandeja de poliestireno com sachê de nanofibras adicionadas de óleo essencial de tomilho

Serão preparados três tratamentos, conforme descrito a seguir:

Tratamento 1: produto cárneo com adição de sachê sem adição de óleo essencial.

Tratamento 2: produto cárneo com adição de óleo essencial

Tratamento 3: produto cárneo sem o sachê, usado para controle.

5.4.2 Análises microbiológicas

Os produtos após serem embalados de acordo com os tratamentos serão mantidos em temperatura de refrigeração (<7°C) por até 10 dias. A partir de cada um dos produtos será retirada uma amostra de 25g em quatro tempos, logo após a elaboração do produto: um, três, sete e dez dias após a elaboração. Estas amostras serão submetidas às análises descritas a seguir. As análises serão selecionadas de acordo com a Instrução Normativa nº 60 (BRASIL, 2019) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, para carnes cruas, maturadas ou não, temperadas ou não, refrigeradas ou congeladas, embaladas a vácuo ou não, miúdos, toucinho e pele. As determinações microbiológicas, serão realizadas de acordo com as recomendações de Downes & Ito (2001) e Silva et al (2007). Serão coletadas 25g de cada um dos produtos cárneos, os quais serão homogeneizados com

225 mL de água peptonada estéril (para análise de *Escherichia coli*) e água peptonada tamponada (para pesquisa de *salmonella spp*).

6. Resultados e impactos esperados

Com este estudo, espera-se obter sachês de nanofibras de zeína contendo óleo essencial de tomilho com ação antimicrobiana *in vitro* frente aos microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) e que o corte cárneo acondicionado em bandejas de poliestileno com os sachês não apresentem contagens de microrganismos. Ainda, espera-se que o produto tenha boa aceitação sensorial, seja criada uma alternativa promissora para conservação de produtos cárneos, diminuindo riscos à saúde e atendendo as necessidades e expectativas dos consumidores.

7. Cronograma

No quadro 1 são descritas as etapas a serem desenvolvidas.

Quadro 1: Cronograma de execução do projeto

Atividades	Semestres		
	2020/2	2021/1	2021/2
Revisão de Literatura	X	X	X
Submissão visando a aprovação do Projeto no Comitê de Ética	X		
Desenvolvimento de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho	X		
Avaliação <i>in vitro</i> do efeito antimicrobiano de sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho	X	X	
Avaliação <i>in situ</i> do efeito antimicrobiano de sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho em cortes cárneos acondicionados em bandejas....		X	X
Análise Sensorial		X	X

Análise estatística		<u>X</u>	<u>X</u>
Elaboração de resumos, artigos e defesa da Dissertação			<u>X</u>

8. Orçamento

O projeto será realizado com recursos do PROAP-CAPES, e do comitê de orientação oriundo de outras fontes de financiamento. O orçamento pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1: Orçamento do projeto

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Cloreto de Sódio (NaCl)	500 g	8,20
Ágar Triptona de Soja (TSA)	500 g	207,70
Infusão Cérebro e Coração (BHI)	500 g	218,65
Caldo Triptona de Soja (TSB)	500 g	182,75
Etanol P. A.	2 L	31,25
Papel toalha	1 Pacote	14,50
Caixa porta ponteira de 200 microlitros	1	5,40
Microtubo 1,5 mL pacote com 1000 unidades	1 Pacotes	30,00
Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG)	500g	484,00
Glicerol P. A.	1 L	23,50
Swab estéril com 100	1 Caixa	14,00
Papel filtro 50x50	1 Caixa	61,30
Placas de Petri estéreis descartáveis 90x15 (com 10 unid.)	10 Pacotes	52,00
Ponteiras descartáveis brancas 1-20ul com 1000 unid.	1 Unidade	14,00
Tubos de Ensaio com rosca e tampa 16	50 Unidades	112,50

x150

Ponteira amarela 1-200 uL com 1000 unid.	1 Pacote	12,45
Ponteira azul 100-1000 ul com 1000 unid.	1 Pacote	26,80
TOTAL		1.499,00

6. RELATÓRIO DE CAMPO

Objetivou-se inicialmente com presente estudo produzir um sachê de nanofibras a partir de zeína, proteína do milho, e incorporá-las de óleo essencial de tomilho (*Thymus Vulgaris*) em diferentes concentrações a fim de adicionar o mesmo em embalagens de alimentos contendo carnes cortadas. São escassos os estudos que utilizam zeína e óleo essencial de tomilho como matéria-prima para formação de nanofibras por *electrospinning*. Além disso, não foram encontrados estudos que utilizem nanofibras de zeína e óleo essencial de tomilho para aplicação na elaboração de embalagem ativa de produtos cárneos. Foram necessárias algumas alterações do projeto devido à pandemia de COVID-19, sendo assim, não foi possível a realização da análise sensorial, que consta do projeto inicial e também não foram analisados todos os tempos de armazenamento sob refrigeração. Nesse sentido, foram feitas modificações no trabalho inicialmente proposto, porém manteve-se o objetivo principal de produzir nanofibras de zeína com três concentrações diferentes de óleo essencial de tomilho pela técnica de *electrospinning*, para obtenção de sachês com atividade antimicrobiana e aplicação em bandejas com carnes.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 MATERIAL

Os experimentos foram realizados no laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) e no Laboratório de Biopolímeros e Nanotecnologia em Alimentos (BioNano) do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), ambos da Universidade Federal de Pelotas. O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) utilizado foi obtido comercialmente da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de óleos Essenciais, acondicionado em frasco âmbar, com volume total de 100 mL (CAS 800-46-3 Sigma-Aldrich) com os principais compostos fenólicos: timol (43%), paracimeno (31%), linalol (10%) gama-terpinemo (9%) e carvacrol (4%), canfora (3%) (FONSECA et al., 2020). A zeína comercial foi obtida da empresa Sigma-Aldrich, Brasil (97% pureza,

CAS 9010-66-6). O etanol P.A foi adquirido da empresa Synth. Foram utilizadas as cepas padrão das espécies de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) e *Escherichia coli* (ATCC 43895).

7.2 MÉTODOS

7.2.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS FORMADORAS DE NANOFIBRAS

Foram produzidas fibras de zeína com óleo essencial de tomilho em diferentes concentrações, 30, 40 e 60%. Na concentração de 30%, foi usado 0,18µg de óleo essencial de tomilho; na concentração de 40% foi usado 0,36 µg de óleo essencial de tomilho; e na concentração de 60% de óleo essencial foi usado 0,54µg de óleo essencial de tomilho, incorporados na solução polimérica para produção das nanofibras pela técnica de *electrospinning*. Foi preparada solução polimérica com zeína 30% com (1,5g), pela dissolução do polímero em etanol 70% (5mL) sob agitação magnética de 30 min. Posteriormente, o óleo essencial de tomilho foi adicionado nas concentrações mencionadas acima, onde permaneceram em homogeneização no agitador magnético por 15 min no escuro.

7.2.1.1 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E VISCOSIDADE APARENTE DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

As soluções poliméricas foram caracterizadas quanto à condutividade elétrica e viscosidade aparente. A condutividade elétrica foi avaliada através de um condutivímetro (Simpla, Medidor EC150, China) e expressa em mS.cm⁻¹. A viscosidade aparente foi determinada em um viscosímetro digital Brookfield com spindle nº18 (Model DV-II, EUA). Aproximadamente 10 mL de amostra foram necessárias para cada análise, sendo estas análises realizadas em triplicata e à temperatura ambiente (25± 2°C).

7.2.2 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS PELA TÉCNICA DE ELECTROSPINNING

Para a produção de nanofibras as soluções poliméricas foram colocadas em uma seringa descartável 3 mL conectada a uma agulha com diâmetro de 0,8 mm, com uma distância de 20 cm entre a agulha e a parede coletora de

nanofibras. A solução polimérica foi bombeada em uma taxa de fluxo de 0,8 mL-h⁻¹ em uma bomba de infusão (KD Scientific, Modelo 100, Holliston, 33 Inglaterra), sob uma voltagem de 20 kV no sistema (Instor, INSES-HV30, Brasil). A parede coletora foi revestida com papel alumínio para facilitar a retirada das nanofibras após o término do processo de *electrospinning*, o qual foi conduzido sob temperatura controlada (20 ± 2 °C) e umidade relativa fixada em $45 \pm 2\%$, com o auxílio de um equipamento de ar condicionado e um desumidificador, respectivamente.

7.2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS PRODUZIDAS PELA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNING*

7.2.3.1 MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOFIBRAS

A morfologia das nanofibras foi avaliada através de microscópio eletrônico de varredura (MEV, Jeol, JSM – 6610LV, EUA). Em um suporte(*stub*) uma pequena quantidade de amostra foi fixada com uma fita e recoberta com ouro por meio de um metalizador (Sputtering Denton Vacuum Desk V, EUA). A análise foi feita com uma aceleração de 10 kV. A distribuição do tamanho das nanofibras, bem como o diâmetro médio, foram analisados a partir da medição aleatória de 100 nanofibras por meio do software ImageJ (versão 2015, EUA) pelas micrografias obtidas do MEV.

7.2.3.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os grupos funcionais do óleo essencial de tomilho, da zeína e das nanofibras nas diferentes concentrações de óleo essencial foram avaliados através de um espectrômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu IRAffinity, Japão). Realizou-se varreduras na faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹ feitas 100 leituras a uma resolução de 2 cm⁻¹.

7.2.3.3 ANÁLISE DO ÂNGULO DE CONTATO COM A ÁGUA

Para medição da hidrofiliicidade, as nanofibras foram coletadas por *electrospinnings* sendo depositadas sobre lâminas de vidro, coletando-se membranas de nanofibras. As nanofibras de zeína contendo óleo essencial de

tomilho foi avaliada pela medição do ângulo de contato, utilizando tensiômetro óptico (Theta lite modelo TL100; BiolinScientific, Suécia) em temperatura ambiente. Na análise, uma gota de água destilada de 3 µL foi gotejada sobre a amostra. O tempo de absorção da água foi registrado em câmera digital.

7.2.3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante das nanofibras foi avaliada pelo método de inibição do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS). Para o método DPPH foram pesadas 1mg de amostra e colocadas em tubos distintos e em seguida adicionou-se 3,9mL de DPPH previamente preparado e depois agitados em vórtex por 30 s e, posteriormente, mantido no escuro em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 2 h e 30 min. A absorbância das amostras foi medida em 515 nm (SpectraMaz 190, Leitor e Microplaca, EUA) e o resultado foi expresso em porcentagem de inibição, conforme Equação 1, onde $Abs_{amostra}$ é a absorbância do óleo essencial encapsulado e não encapsulado em nanofibras de zeína; Abs_{branco} é a absorbância das soluções e sem amostra.

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{branco}} \times 100 \quad \text{Eq 1.}$$

Para o radical ABTS, foram pesados 1 mg de cada amostra, após adicionou-se 3 mL da solução ABTS preparada previamente. A solução foi agitada em vórtex por 30 s e deixado no escuro por 30 min em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). A absorbância foi medida a 734 nm e os resultados apresentados em porcentagem de inibição seguindo Equação 1.

7.2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A reativação dos microrganismos utilizados nas análises foram mantidos sob congelamento em caldo BHI (Brain Heart Infusion, CAS) e glicerol (propano-1,2,3-triol, CAS) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB,

CAS) e incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Após uma alçada desse crescimento foi estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Baird-Paker para *S. aureus* e ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *Escherichia coli*, e incubadas por 24 h a 37 °C, para o isolamento de colônias com morfologia característica. A partir do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e ressuspensa em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

7.2.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO ANTIMICROBIANO

Para avaliação antimicrobiana das nanofibras com óleo essencial de tomilho, estas foram coletadas por *electrospinning* sendo depositadas sobre lâminas de vidro, coletando-se membranas de nanofibras formando um sachê. A atividade antimicrobiana em micro-atmosfera foi avaliada pela técnica proposta por Ghabraie et al., (2016) com pequenas modificações. Alíquotas de 0,1 mL de suspensões celulares das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) e *Escherichia coli* (ATCC 43895) separadamente foram inoculadas na superfície de placas com Agar Soja Trypticaseína (TSA, CAS) (15 mL – camada de 6 mm). No centro da tampa de cada placa foi posicionado o sachê com nanofibras de zeína com as diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho (0,27, 0,36, 0,54 µL), as placas foram imediatamente fechadas de modo invertido (tampa para baixo), e incubadas a 37 °C por 24h. A ação antimicrobiana foi expressa pelas diferenças significativas verificadas entre as contagens de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos tratamentos com sachê de nanofibras com óleo essencial de tomilho (30, 40 e 60%) comparados com tratamentos controles contendo nanofibras sem óleo essencial e sem nanofibras somente com solução salina (NaCl 0,1%). A análise foi realizada em triplicata.

7.2.6 AVALIAÇÃO *IN SITU* DO EFEITO ANTIMICROBIANO

Foram preparados quatro diferentes tipos de tratamentos, conforme a Tabela 1. No tratamento 1, em uma bandeja de polipropileno foi adicionado o corte cárneo coberto com filme flexível de policloreto de vinila (PVC) usado

para controle. No tratamento 2, o corte cárneo foi acondicionado na bandeja de polipropileno (PP) juntamente com nanofibras de zeína sem óleo essencial de tomilho e coberto com filme flexível de PVC. No tratamento 3, o corte cárneo acondicionado em bandeja de PP foi adicionado de nanofibras de zeína com 30% de óleo essencial de tomilho coberto com filme flexível de PVC. No tratamento 4, o corte cárneo foi acondicionado em bandeja de polipropileno e adicionado de nanofibras de zeína com 60% de óleo essencial de tomilho coberto com plástico flexível de PVC.

Tabela 1: Tratamentos aplicados *in situ*.

Tratamento	Descrição
T 1	Carne moída (controle)*
T 2	Bandeja carne moída + sachê de nanofibras de zeína sem óleo essencial de tomilho
T 3	Bandeja com carne moída + sachê de nanofibras de zeína contendo 30% de óleo essencial de tomilho
T 4	Bandeja com carne moída + sachê de nanofibras de zeína contendo 60% de óleo essencial de tomilho

*bandejas sem sachê de nanofibras

Após serem embaladas de acordo com os tratamentos, as amostras foram mantidas em temperatura de refrigeração (<7°C) por sete dias. A partir de cada um dos tratamentos foi retirada uma amostra de 25g para realização das análises de acordo com a Instrução Normativa N° 60 (BRASIL, 2019) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. As determinações microbiológicas foram realizadas seguindo metodologia de Downes & Ito (2001) e Silva et al.(2007). Onde 25g de cada amostra foi

homogeneizada em 225 mL de água peptonada tamponada para análises posteriores.

7.2.7 ENUMERAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA*

Após a diluição das amostras, foram retirados 0,1 mL da solução amostral e transferidas para placas de Petri contendo ágar Baird-Parker, espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas por até 48 h a 37°C em estufa (Eletrolab, modelo 121 FC) A contagem foi realizada de forma manual das colônias formadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias UFC.g⁻¹.

7.2.8 ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES, TERMOTOLERANTES E *ESCHERICHIA COLI*

Para enumeração de *Escherichia coli* foi inicialmente utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP). A análise presuntiva de coliformes foi realizada em Caldo Lauril Sulfato de Sódio (caldo LST), com incubação por 48 h a 35°C. Os coliformes totais foram enumerados em Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante, com incubação a 35°C por 24 à 48h. A quantificação de coliformes termotolerantes foi realizada em Caldo *Escherichia coli* com incubação a 45,5°C por 24h em estufa (Eletrolab, modelo 121 FC). Para identificação de *E. coli*, a partir dos tubos de caldo EC onde houvesse a formação de gás seriam inoculadas placas de ágar Eosina Azul de Metileno que seriam incubadas as 37°C por 24h e colônias com morfologia características seriam submetidas as provas do IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer, Citrato).

7.2.9 PESQUISA DE *SALMONELLA SPP.*

Para a etapa de pré-enriquecimento, foram pesadas 25 g de cada amostra e a elas foram acrescentados 225 mL de Diluente Água Peptonada Tamponada 0,1 % (APT), seguida de incubação a 37 °C por 20 h. Após este período, foram transferidos 100 µL da amostra para um tubo contendo 9,9 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis e 1 mL para tubos contendo 10 mL de Caldo Selenito Cistina (SC, CAS) e para 10 mL de Caldo Tetracionato para a etapa de enriquecimento seletivo. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 42°C

durante 24 h. A partir dos tubos contendo crescimento nos caldos de enriquecimento seletivo, foram semeadas placas de Ágar Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose e Ágar Xylose Lysine Deoxycholate Modified seguida de incubação a 37°C por 24 h. Após esse período, das placas que apresentaram crescimento com morfologia característica para *Salmonella* spp. foram selecionadas três colônias e semeadas em placas contendo ágar nutriente com posterior incubação a 37°C por 24 h. A partir das colônias obtidas em ágar nutriente realizou-se a identificação bioquímica em tubos com Caldo Uréia, Ágar Triple Sugar Iron e Ágar Lysine Iron Agar com incubação a 37°C por 24 h. As colônias que apresentaram reações características de *Salmonella* spp. nos ágar TSI, LIA e no caldo Uréia foram submetidas a teste sorológico de aglutinação rápida com soro polivalente anti-*Salmonella* somático “O” e flagelar “H”. Quando observada a aglutinação em até 3 min, a amostra foi considerada positiva para *Salmonella* spp.

7.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Fisher de Mínima Diferença Significativa (LSD test) para verificar se existiam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações utilizadas em relação à inibição microbiana. O software utilizado foi o programa Statistic 7.1.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS FORMADORAS DE NANOFIBRAS

A condutividade elétrica e a viscosidade aparente das soluções poliméricas de zeína com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho estão apresentadas na Tabela 2.

A condutividade elétrica das soluções poliméricas está relacionada com as concentrações utilizadas no preparo das soluções, seja de solvente ou o próprio polímero e outros compostos presentes na solução (BHARDWAJ & KUNDU, 2010). A condutividade elétrica pode ser ajustada a partir do solvente utilizado ou até mesmo pela adição de sais à solução (COSTA, 2011). Pode-se

observar na Tabela 2 que a adição do óleo essencial de tomilho em diferentes concentrações reduziu a condutividade elétrica da solução polimérica na concentração 30% ($p < 0,05$) em comparação com a solução sem óleo essencial (0%) e com a solução contendo 40% de óleo essencial, as quais não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Entretanto, a solução polimérica contendo a maior concentração de óleo essencial de tomilho (60%) foi a que apresentou maior valor de condutividade elétrica ($p < 0,05$).

Por sua vez, tanto o aumento quanto a redução da condutividade elétrica, não afetou o processo de formação das nanofibras, tendo em vista de que ocorreu a formação de jato contínuo e estável sendo possível a produção de nanofibras contínuas e uniformes pela técnica de *electrospinning*.

Tabela 2: Condutividade elétrica das soluções poliméricas de zeína em diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho.

Nanofibras com óleo essencial de tomilho (%) [*]	Condutividade elétrica ($\mu\text{.cm}^{-1}$)	Viscosidade aparente (cP.cm^{-1})
0	1763 ± 12^b	$114,4 \pm 0,7^c$
30	1035 ± 9^c	$182,2 \pm 0,3^b$
40	1624 ± 14^b	$215,2 \pm 0,3^b$
60	1831 ± 10^a	$335,3 \pm 5,5^a$

^{*}Concentração de óleo essencial de tomilho nas soluções poliméricas formadoras de nanofibras. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). ^{a,b,c}Letras diferentes para cada parâmetro, na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com 5% de significância

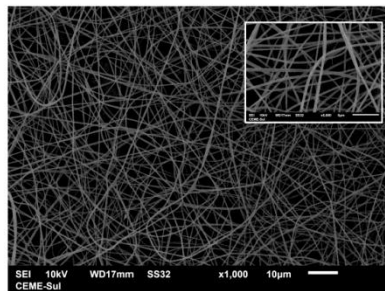
A adição do óleo essencial de tomilho na solução polimérica de zeína promoveu um aumento da viscosidade aparente das soluções poliméricas (Tabela 2), o que pode ter ocorrido pela interação do óleo essencial de tomilho com o polímero.

A viscosidade é uma característica importante, pois é necessária uma viscosidade suficiente para que ultrapasse a tensão superficial entre a solução polimérica e ocorra a evaporação do solvente possibilitando a formação de nanofibras (LI et al.,2010).Segundo Aytac et al. (2016), o aumento da viscosidade aparente é relacionado ao maior emaranhamento de cadeias poliméricas na solução. Em um estudo com fibras de zeína adicionadas de ácido fólico, foi observado que conforme ocorreu o aumento da concentração

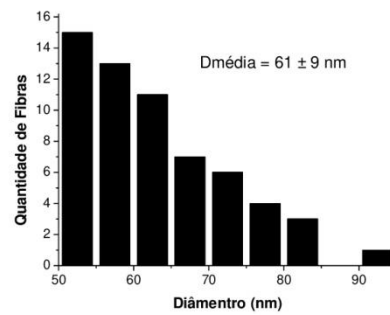
de ácido fólico, maior foi a viscosidade aparente (EVANGELHO et al., 2019), desempenho semelhante ao encontrado no presente estudo.

8.2 MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHODAS NANOFIBRAS

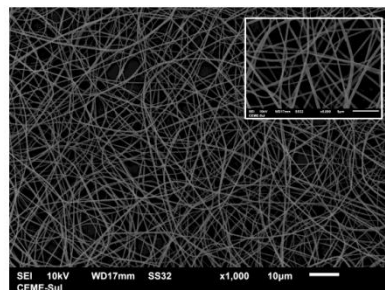
A morfologia e a distribuição de tamanho das nanofibras de zeína adicionadas de 30, 40 e 60% de óleo essencial de tomilho estão apresentadas na Figura 3. Os parâmetros utilizados no processo de *electrospinning* permitiram a formação de nanofibras cilíndricas, homogêneas e contínuas sem a presença de *beads* (Figura 3 a₁, b₁, c₁, d₁).



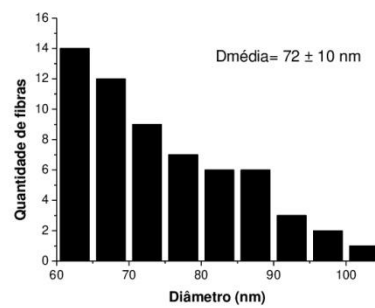
(a₁)



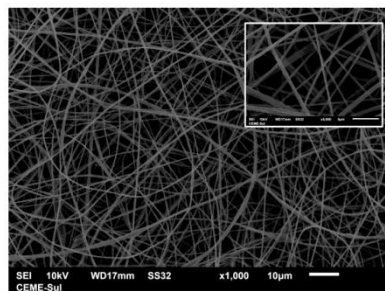
(a₂)



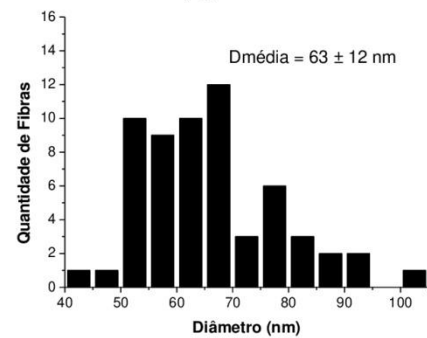
(b₁)



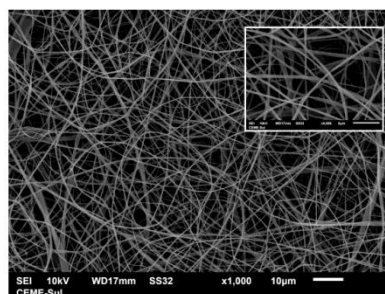
(b₂)



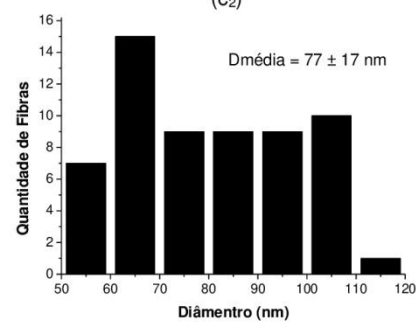
(c₁)



(c₂)



(d₁)



(d₂)

Figura 3: Morfologia das nanofibras e respectiva distribuição de tamanho: zeína controle (a), zeína com 30% de óleo essencial de tomilho (b), zeína com 40% de óleo essencial de tomilho (c) e zeína com 60% de óleo essencial de tomilho (d). Amplitudes (1000x e 500x)

Ao observar a distribuição de tamanho das nanofibras (Figura 3 a₂, b₂, c₂, d₂), nota-se que o diâmetro médio teve pouca variação entre as nanofibras produzidas. A incorporação do óleo essencial de tomilho causou um leve aumento do diâmetro médio das nanofibras de zeína. Os valores ficaram entre 61 e 77 nm, sendo que o maior diâmetro foi observado nas nanofibras contendo a concentração de 60% de óleo essencial (Figura 3d₂). Este comportamento pode ser relacionado com os parâmetros da solução polimérica de viscosidade e condutividade, sendo que as nanofibras contendo 60% de óleo essencial de tomilho apresentaram maior viscosidade aparente e condutividade elétrica (Tabela 2) e maior diâmetro médio (Figura 3 d₂). No geral, maiores viscosidades geram nanofibras com maiores diâmetros (HAIDER et al., 2015), comportamento que está de acordo com o encontrado no presente estudo. As diferenças na distribuição de tamanho ainda podem estar relacionadas a fatores distintos, desde o processo de obtenção das nanofibras, como por exemplo, umidade relativa do ar, distância da bomba de ejeção ao coletor e a tensão aplicada, a qual está diretamente relacionada a formação de *beads*, pois a voltagem aplicada deve estar suficientemente alta para superar a tensão superficial da solução polimérica.

Além disso, as características da própria solução polimérica, como por exemplo, viscosidade e condutividade, influenciam no resultado das nanofibras coletadas após a técnica de *electrospinning* (OLIVEIRA et al., 2013).

Estudos realizados com fibras de zeína e com a incorporação de diferentes tipos de compostos também obtiveram diâmetros variados. Torres (2015) avaliou a morfologia de fibras de zeína combinada com Poli(N-isopropilacrilamida), onde o diâmetro variou entre 700 a 1334 nm. Silva (2018) analisou fibras de zeína com ação do óleo essencial de gengibre, e relatou que as fibras com maior concentração do óleo essencial de gengibre foram as que apresentaram as maiores médias de diâmetro, variando entre 213 a 625 nm onde é mencionado que o maior teor de sólidos presentes na solução polimérica altera tamanho das fibras formadas. Em outro estudo foi realizada a análise do diâmetro médio de fibras com diferentes concentrações de zeína, no qual a porcentagem de 30% foi a que demonstrou melhor uniformidade, não ocorrendo o aparecimento de *beads* e, ainda, foi obtido um diâmetro médio entre 168 e 679 nm (ANTUNES et al., 2016). Yilmaz et al. (2016) obtiveram

valores de diâmetros com variação entre 600 a 1400 nm, para fibras ultrafinas de zeína e cumarina obtidas pela técnica de *electrospinning*. Ao analisar os resultados dos diâmetros médios obtidos nos estudos mencionados, pode-se observar que no presente estudo as nanofibras apresentaram menores diâmetros médios, com valores abaixo de 100 nm, podendo ser consideradas nanofibras. Como já mencionado, a diferença entre os valores de diâmetro está relacionada às condições tanto do processo da técnica de *electrospinning* e as características próprias da solução formadora de fibras. Com isso, as nanofibras apresentam alta área superficial em relação ao volume, além de morfologia adequada (nanofibras cilíndricas, homogêneas e contínuas), podendo ser efetivamente aplicadas como agente antimicrobiano, visto que os nanomateriais produzidos possibilitam a liberação controlada e efetiva de compostos bioativos do óleo essencial de tomilho.

8.3 ÂNGULO DE CONTATO COM A ÁGUA

Os ângulos de contato das nanofibras com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho estão dispostos na Figura 4.

Em trabalhos encontrados na literatura (BÖHMER-MAAS et al., 2020), as nanofibras de zeína controle mostraram um ângulo de contato de 95° nos primeiros segundos de gotejamento da água. Um ângulo de contato com a água inferior a 90° indica que o material é hidrofílico (BÖHMER-MAAS et al., 2020). O que condiz com as características do polímero, por possuir grande quantidade de aminoácidos apolares, o qual confere estrutura molecular hidrofóbica (PAPALIA & LONDERO, 2015).

No presente estudo, a gota de água depositada sobre as nanofibras de zeína contendo diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho apresentaram aumento no tempo de absorção da mesma. Na concentração de 30% de óleo essencial de tomilho o ângulo de contato foi de 150,4° após 3 s (Figura 4 a₁), entretanto no tempo de 5 s o ângulo diminuiu para 87,3° (Figura 4 a₂). Na concentração de 40% de óleo essencial de tomilho nos mesmos períodos (3 e 5 s) o ângulo de contato foi de 146,7° para 107,2° (Figura 4 b₁, b₂) respectivamente. Para as nanofibras com concentração de 60% de óleo essencial de tomilho, o ângulo de contato foi 0° nos tempos de 3 e 5 s, no

tempo de 7 s o ângulo de contato foi de $134,8^{\circ}$ (Figura 4 c₁) e no tempo de 10 s foi de $61,03^{\circ}$ (Figura 4 c₂) indicando o caráter hidrofóbico das nanofibras.

Os aminoácidos presentes na zeína são responsáveis por esse polímero não ter afinidade com a água. Além disso, o óleo essencial de tomilho é hidrofóbico (DENG et al., 2019), o que justifica o maior tempo para absorção nas nanofibras com maior concentração de óleo essencial de tomilho. Para a gota se espalhar por toda superfície das nanofibras, foi necessário 19 s para a concentração 30% de óleo essencial de tomilho, 34 s para a concentração 40% e 44 s para a concentração de 60% (dados não mostrados). Corrêa et al. (2012) ao avaliarem filmes comestíveis contendo nanofibras de zeína em diferentes concentrações de zeína na matriz polimérica, observaram que quanto maior a quantidade de zeína no filme, maior foi a capacidade hidrofóbica das amostras.

Fontes (2021) desenvolveu fibras ultrafinas produzidas de poli (ácido láctico), lignina e 30% de óleo essencial de pimenta rosa e ao analisar o ângulo de contato da água, confirmou um ângulo de 103° o qual indica o caráter hidrofóbico das fibras ultrafinas, correlacionando-se com o presente estudo, indicando a interação do óleo essencial com o polímero. As características de baixa afinidade com a água geram um potencial de aplicação para embalagens contendo alimentos, principalmente aqueles que possuem alta umidade e atividade de água, devido a capacidade de maior durabilidade e, conseqüentemente, mais eficazes para este fim.

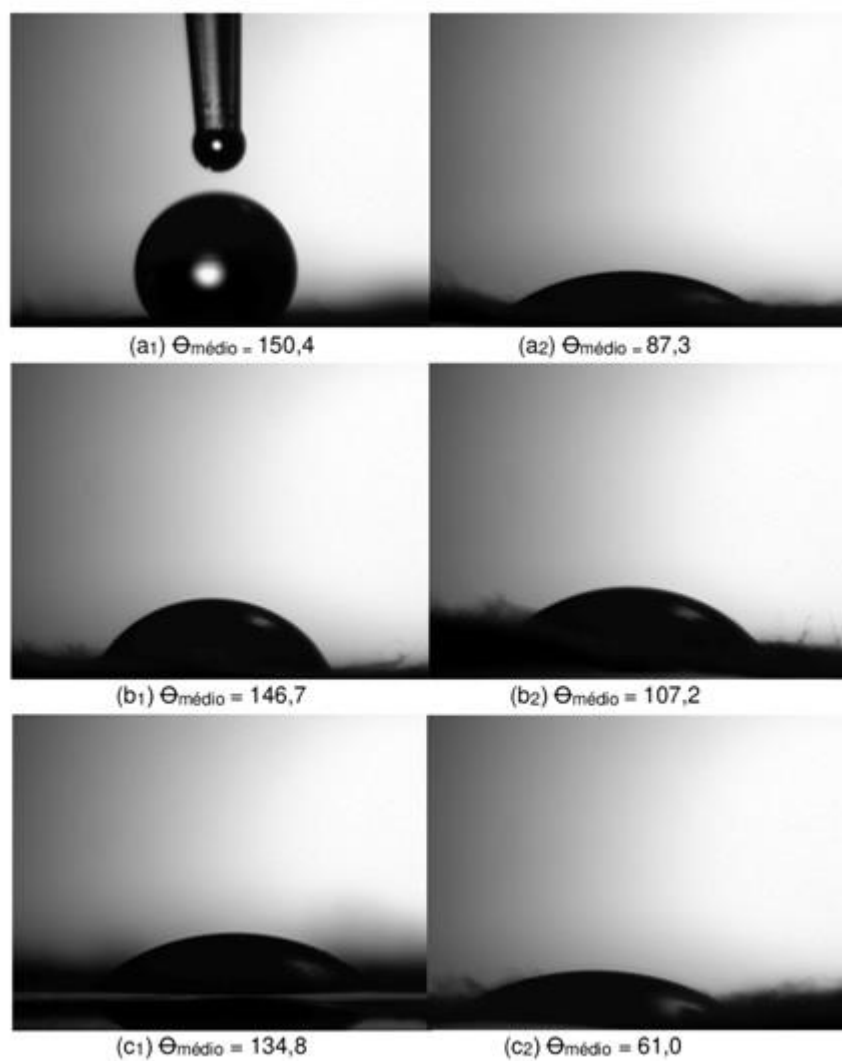


Figura 4: Ângulo de contato das nanofibras de zeína com 30% de óleo essencial de tomilho (a₁, a₂), zeína com 40% de óleo essencial de tomilho (b₁, b₂) e zeína com 60% de óleo essencial de tomilho (c₁, c₂).

8.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante, frente aos radicais DPPH e ABTS, das nanofibras de zeína com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho está representada na Figura 5.

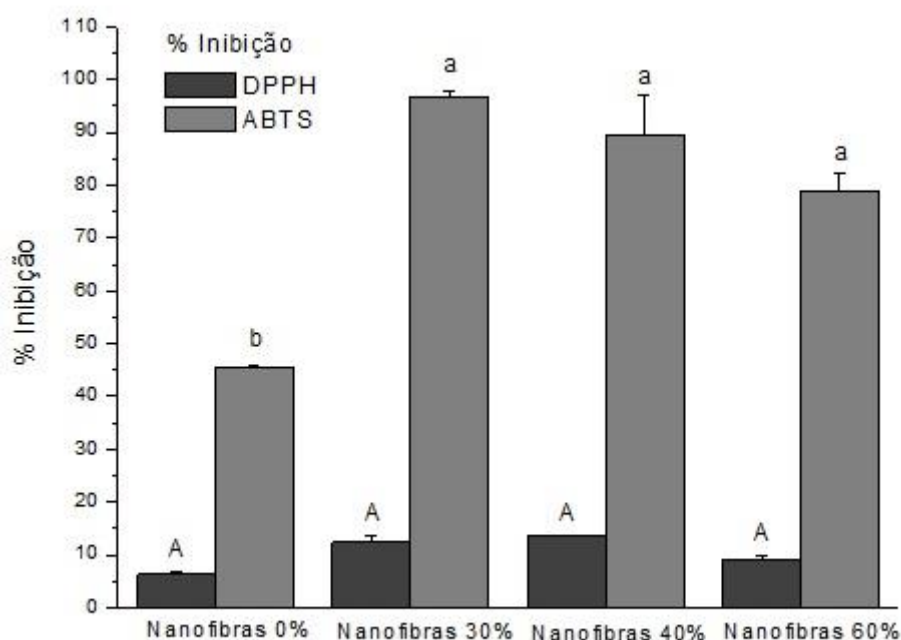


Figura 5: Atividade antioxidante das nanofibras produzidas com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho (0, 30, 40 e 60%) pelos métodos de inibição dos radicais DPPH e ABTS. Letras diferentes indicam diferença significativa para cada radical avaliado ($p < 0,05$).

As nanofibras controle (0% de óleo essencial de tomilho), apenas de zeína, apresentaram uma capacidade de eliminação de 13% para o radical DPPH e 37% para o radical ABTS (Figura 5). Isso ocorreu pela capacidade antioxidante que a zeína apresenta, devido a sua composição química (BRUNI et al., 2020), o que corrobora com Lee et al. (2015) no qual justifica a maior atividade de inibição do radical ABTS quando comparado ao radical DPPH. As nanofibras de zeína contendo diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho (30, 40 e 60%) apresentaram capacidade de inibição de até 15% para o radical DPPH, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$).

Além disso, foi observado um aumento da atividade antioxidante frente ao radical ABTS, nas nanofibras com concentração de 30% de óleo essencial de tomilho, as quais apresentaram capacidade antioxidante de 98%.

Entretanto, para as concentrações de 40 e 60% este percentual de inibição diminuiu para 89 e 78%. Isso pode ter ocorrido devido a concentração mais elevada de óleo essencial de tomilho incorporado na solução polimérica, o que pode ter acarretado em perdas durante o processo de *electrospinning* pela menor interação da zeína com o óleo essencial em alta quantidade.

O ensaio ABTS é mais sensível para identificar atividade antioxidante, devido a cinética de reação mais rápida apresentada e também a uma resposta aumentada aos antioxidantes. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor é a concentração inibitória (IC50) em análises antimicrobianas e maior a atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Analisando os resultados obtidos para as nanofibras contendo óleo essencial de tomilho, o percentual de inibição frente ao radical DPPH foi baixo (de até 15%), não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$). Ainda assim, as nanofibras apresentaram atividade antioxidante frente a este radical, valendo ressaltar que o óleo essencial está protegido nas nanofibras frente a elementos externos e, o óleo essencial na sua forma livre, poderia ser facilmente degradado, dependendo das condições, apresentando atividade mais baixa ou nenhuma atividade, quando aplicado sem a encapsulação. Além disso, as nanofibras apresentaram inibição do radical ABTS acima de 98%, valores estes considerados como alta atividade antioxidante. Tendo em vista o potencial antioxidante das nanofibras de zeína e óleo essencial de tomilho, seria mais uma aplicação promissora, possível de ser realizada em embalagens ativas para contenção de alimentos.

8.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para identificar as diferenças estruturais bem como a natureza química, a análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é comumente utilizada (LEIDY; XIMENA, 2019). Com isso, as nanofibras de zeína produzidas com as diferentes concentrações do óleo essencial de tomilho foram analisadas por FTIR e estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Espectros no infravermelho com Transformada de Fourier das nanofibras de zeína com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho produzidas por *electrospinning* e do óleo puro.

Vibração (cm ⁻¹)	Óleo essencial de tomilho	Nanofibras (%)*			
		0	30	40	60
v(O-H)	3370	3283	3292	3292	3292
vs(C-H)	-	2950	2950	2941	2959
va(C-H)	2975, 2929, 2866	-	2869	2888	2878
vC=O/vsN-H; va-H	-	1638	1638	1656	1602
vaN-O	-	1557	1575	1575	1557
v(C=C) <i>b</i>	1518	-	-	-	-
δsC-H ₂	-	1458	1450	1450	1450
v(C-C) <i>c</i>	1455	-	-	-	-
v(CO) <i>c</i>	1420	-	1422	1414	1422
vC-N/δNH ₂	-	1255	1225	1225	1251
	1141	-	-	-	-
	1087	-	-	-	-
	1042	-	-	-	-

v - estiramento, δ - deformação no plano, a – hibridizações sp₃ e sp₂, b – aromático, c – grupamento fenil. *concentração de óleo essencial nas nanofibras de zeína.

As bandas formadas para o óleo essencial de tomilho, o qual é composto principalmente pelos compostos timol, paracimeno, linalol, gamma-terpineno e carvacrol, entre outros, conforme mensurado em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (RADÜNZ, 2020). Sendo assim, na análise de espectroscopia na região do infravermelho são observadas bandas características desses compostos majoritários.

As bandas observadas em 2975, 2929 e 2866 cm⁻¹ (v_aC-H) são específicas das hibridizações sp₃ e sp₂ presentes nas estruturas dos compostos majoritários citados. A banda na faixa de 1518 cm⁻¹ (vC=C)

referente aos anéis aromáticos presentes nos compostos timol, paracimeno e carvacrol. A banda em 1420 cm^{-1} ($\nu\text{C-O}$) é proveniente do grupamento fenil presente no timol (RADÜNZ et al., 2020).

Para as nanofibras 0% (controle) foi observada a banda em 3283 cm^{-1} a qual representa o estiramento de ligação N-H e O-H presentes na estrutura da proteína utilizada como material de parede (PÉREZ-MASIÁ; LÓPEZ-RUBIO; LAGARÓN, 2013). Na banda 2950 cm^{-1} relaciona-se à ligação C-H dos grupos alifáticos presente na estrutura da zeína (ANTUNES et al., 2017). É possível observar que as nanofibras contendo as diferentes concentrações do óleo essencial de tomilho (30, 40 e 60%) apresentaram bandas características do óleo puro (2869 e 1422 cm^{-1}) com sucinto deslocamento. Confirmando, a presença do mesmo nas nanofibras de zeína desenvolvidas.

9. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

9.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* EM MICRO-ATMOSFERA

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* das nanofibras de zeína e óleo essencial de tomilho em micro-atmosfera estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Análise *in vitro* do efeito das nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho frente *S. aureus* ATCC (10838).

Microrganismo	(%)*	Contagens (UFC)
<i>S. aureus</i>	0	$7,2 \times 10^{4a}$
<i>S. aureus</i>	30	$6,3 \times 10^{4a}$
<i>S. aureus</i>	40	$2,4 \times 10^{5b}$
<i>S. aureus</i>	60	$8,5 \times 10^{4a}$
<i>S. aureus</i>	Sem nanofibras	$1,9 \times 10^{5b}$

^{a,b} Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

* concentração de óleo essencial nas nanofibras de zeína.

As nanofibras contendo óleo essencial de tomilho nas concentrações de 30 e 60% e de zeína pura (sem óleo essencial) apresentaram maior efeito inibitório frente a *S. aureus*, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos com nanofibras contendo óleo essencial de tomilho na concentração de 40% e do tratamento sem nanofibras. Estes três tratamentos (30%, 60% e zeína pura) não diferiram entre si ($p > 0,05$). As nanofibras contendo 40% de óleo essencial de tomilho foram as que apresentaram menor efeito inibitório, não diferindo das nanofibras controle. Uma possível explicação para este resultado pode-se atribuir ao processo da produção das nanofibras, através da técnica de *electrospinning*, podendo correlacionar a condições da técnica como, por exemplo, campo elétrico, distância da bomba ao coletor e outras variáveis até mesmo umidade e temperatura do ambiente no momento do processo (COSTA et al., 2012). Uma possível explicação para o tratamento com zeína pura (sem óleo essencial de tomilho) apresentar efeito inibitório frente a *S. aureus* pode ser encontrada em alguns estudos que demonstram que a proteína do milho, zeína, tem potencial inibitório perante algumas bactérias. Cordeiro (2018) avaliou o potencial da zeína através da técnica de halo de inibição para o controle microbiológico em carne ovina *in natura* frente a *Staphylococcus coagulase* positiva, coliformes termotolerantes e *Salmonella*

spp. e verificou diminuição no crescimento bacteriano quando esta proteína foi utilizada. Rehman et al. (2010) avaliaram a inibição microbiana, através da técnica de micro-atmosfera, os pesquisadores compararam revestimentos de zeína, glúten de trigo e quitosana. A zeína apresentou melhor resultado inibitório.

Já o efeito dos tratamentos com óleo essencial pode estar relacionado ao fato que o óleo essencial de tomilho tem ação através dos compostos voláteis, no qual é formada uma fase a vapor, atingindo diretamente as células bacterianas sem a necessidade de difusão no meio em que os microrganismos estão. (GHABRAIE et al, 2016). Outros óleos essenciais foram bastante testados frente à diminuição da multiplicação bacteriana. Paula et al. (2021) desenvolveram *blends* de óleos essenciais e compostos majoritários para o controle de microrganismos patogênicos, utilizando os óleos de capim limão (*Cymbopogon citratus*), e cardamomo (*Elettaria cardamomum*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), cravo da índia (*Syzygium aromaticum*), alecrim (*Salvia rosmarinus*) e os compostos citral, cineol e eugenol. Os testes foram realizados pela medição de halo de inibição, as concentrações testadas foram de 50% e 70%, todas foram eficazes perante microrganismos Gram positivos e Gram negativos. Na contagem de *Escherichia coli* (Tabela 5) as amostras que continham nanofibras de zeína adicionado de 60% de óleo essencial de tomilho, foram as que mostraram maior efeito inibitório, seguido das demais concentrações.

Tabela 5: Análise *in vitro* do efeito das nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho frente *Escherichia coli* ATCC (43895).

Microrganismo	Nanofibras (%) [*]	Média das Contagens (UFC)
<i>E-coli</i>	0	8,0x10 ^{3a}
<i>E-coli</i>	30	8,1x10 ^{4a}
<i>E-coli</i>	40	8,5x10 ^{4b}
<i>E-coli</i>	60	6,4x10 ^{4a}
<i>E-coli</i>	Sem nanofibras	1,3x10 ^{5b}

a, b Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey.

^{*} concentração de óleo essencial de tomilho nas nanofibras de zeína.

Frente à bactéria *E. coli* os resultados foram semelhantes ao anterior, as nanofibras contendo 30 e 40 e 60% de concentração de óleo essencial de

tomilho e nanofibras de zeína foram as mais efetivas na inibição e não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Entretanto se diferenciaram ($p < 0,05$) das amostras sem nanofibras, onde as contagens de *E. coli* foram maiores. Alves et al. (2021) realizaram análise de micro-atmosfera para testar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de cravo-da-índia, o qual reduziu em até 70% a proliferação de *E. coli*. Em um estudo Gonçalves et al. (2018) avaliaram as características inibitórias do óleo essencial de tomilho, *in vitro* frente às espécies patogênicas *E. coli* e outros microrganismos, como *S. aureus*, sendo as amostras com a presença do óleo essencial de tomilho, as que apresentaram maior resultado no controle de multiplicação dos mesmos. Esse resultado ocorreu provavelmente pelo fato de óleo essencial de tomilho ser classificado como um antimicrobiano muito ativo (DIMITRIJEVIĆ et al., 2007).

Em um estudo utilizando diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho adicionado em um filme de amido e quitosana foi observado que, conforme foi aumentado a quantidade de óleo essencial de tomilho ao filme, maior foi a atividade inibitória em cepas de *E. coli*. A concentração de 50% foi a mais eficaz em comparação com as de menor porcentagem, as quais também tiveram ação contra as cepas patogênicas (CAVALCANTE, 2018).

Uma provável explicação do mecanismo de ação de óleos essenciais voláteis como o de tomilho sobre as bactérias Gram negativas como *E. coli* foi proposta por Dannenberg et al. (2017). Esses autores relatam que as características lipofílicas que ligam a bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentam a permeabilidade, fazendo com que o conteúdo intracelular prejudique o sistema enzimático da célula, uma vez que, ocorrem alterações na estrutura citoplasmática afetando diretamente o metabolismo, através dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais.

9.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN SITU*

Para avaliação *in situ* escolheu-se os tratamentos utilizados mais efetivos nos ensaios *in vitro* (nanofibras contendo 30 e 60% de óleo essencial de tomilho). As amostras não foram intencionalmente contaminadas, sendo avaliadas de acordo com a concentração de microrganismos originalmente presentes nas mesmas. No caso específico de *Salmonella* spp., não foi verificada a sua presença em nenhuma das amostras. Assim, este microrganismo não pode ser utilizado para avaliação dos tratamentos. Posteriormente poderão ser realizados estudos com a contaminação intencional das amostras com esta bactéria para que os tratamentos possam ser avaliados frente a esse microrganismo.

Os resultados referentes as contagens de coliformes a 45°C (termotolerantes) e de *E. coli* das amostras de carne moída presentes nas bandejas submetidas a diferentes tratamentos e avaliados após 7 dias de armazenamento sob refrigeração de temperatura média de 4,5°C podem ser visualizados na Tabela 6 e 7 respectivamente.

Tabela 6: Quantificação de coliformes termotolerantes em bandejas com carne com ou sem a presença de sachê de nanofibras adicionadas de óleo essencial de tomilho.

Tratamento	Média das Enumerações (NMP/g)
Controle*	210 ^a
Nanofibras sem óleo essencial de tomilho	43 ^b
Nanofibras com 30% de óleo essencial de tomilho	15 ^c
Nanofibras com 60% de óleo essencial de tomilho	9 ^c

* Bandejas sem sachê de nanofibras sem óleo essencial. ^{a,b,c} Letras diferentes nos expoentes na coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 7: Quantificação de *E. coli* em bandejas com carne com ou sem a presença de sachê de nanofibras adicionadas de óleo essencial de tomilho.

Tratamento	Média das Enumerações (NMP/g)
Controle*	210 ^a
Nanofibras sem óleo essencial de tomilho	43 ^b
Nanofibras com 30% de óleo essencial de tomilho	15 ^c
Nanofibras com 60% de óleo essencial de tomilho	9 ^c

* Bandejas sem sachê de nanofibras sem óleo essencial. Letras diferentes nos expoentes na coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A concentração tanto de coliformes termotolerantes como de *E coli* foi pequena em todos os tratamentos. Entretanto foi possível verificar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos mesmo estas concentrações sendo pequenas.

Todos os coliformes termotolerantes que estavam presentes foram identificados como sendo da espécie *E coli*. Através da análise estatística aplicada foi possível observar que os tratamentos com sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho nas concentrações de 30 e 60% foram significativamente mais efetivos ($p < 0,05$) na inibição de *E coli*, em comparação com os tratamentos com nanofibras sem óleo essencial e o controle (sem nanofibras).

Não foram encontrados na literatura estudos que utilizaram especificamente sachês de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho, porém Govaris et al. (2011) avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo essencial de tomilho em alimentos e constataram atividade antibacteriana contra *E coli*. Estes autores atribuíram este efeito a predominância dos principais constituintes (carvacrol, timol, p-cimeno e g-terpineno) que somam 80% do óleo essencial de tomilho. Milkiewicz et al. (2018) verificaram o potencial do óleo essencial de tomilho em produtos à base de carne na inibição de *E coli*, corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo. Alves (2018) verificou que em diferentes concentrações, o óleo essencial de tomilho teve inibição semelhante ao presente trabalho. No estudo de Alves (2018), as amostras com maior concentração de óleo essencial de tomilho (50%) foram as mais eficazes. Ainda, mostraram que as menores concentrações também apresentaram atividade antimicrobiana. A maior efetividade de inibição de *E coli* pelo sachê de nanofibras de zeína e óleo essencial de tomilho nas concentrações 30 e 60% encontrada no presente estudo, provavelmente se deve aos componentes majoritários presentes no óleo essencial de tomilho, o qual tem uma forte ação antimicrobiana contra bactérias Gram negativas, conforme já explicado anteriormente.

Outros autores mencionam a importância da utilização de óleos essenciais visando a segurança alimentar como estratégia do aumento de vida

útil sem a necessidade aditivos sintéticos (GARCÍA-DÍEZ et al., 2016). Esses resultados possuem grande relevância considerando que existem patótipos de *E coli* que podem causar doenças graves como *Escherichia coli* enterohemorrágica e *Escherichia coli* síngica-toxigênica.

As contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva das amostras de carne moída presentes nas bandejas submetidas a diferentes tratamentos e avaliados após 7 dias de armazenamento sob refrigeração a temperatura média de 4,5°C podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8: Quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva em bandejas com carne com ou sem a presença de sachê de nanofibras adicionadas de óleo essencial de tomilho após 7 dias de armazenamento.

Tratamento	Média das Contagens (UFC)
Controle*	2,8x10 ^{5b}
Nanofibras sem óleo essencial	8,9x10 ^{4b}
Nanofibras com 30% de óleo essencial	5,3x10 ^{5a}
Nanofibras com 60% de óleo essencial	2,7x10 ^{4a}

* Bandejas sem sachê de nanofibras sem óleo essencial. ^{a,b} Letras diferentes nos expoentes na coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Para os microrganismos do grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva, a aplicação de nanofibras de zeína contendo óleo essencial de tomilho na concentração de 60% e com nanofibras sem óleo essencial de tomilho diferenciaram-se significativamente (p<0,05) das contagens dos tratamentos controle e do tratamento com as nanofibras 30% de óleo essencial de tomilho. Estes tratamentos (60% de óleo essencial e nanofibras sem óleo essencial) não diferiram estatisticamente entre si (p>0,05). E a amostra controle e a nanofibras com 30% de óleo essencial de tomilho também não se diferenciaram estatisticamente entre si (p>0,05).

A ação do tratamento com nanofibras com 60% de óleo essencial de tomilho pode ser explicada pelo fato das bactérias Gram positivas possuírem susceptibilidade ao óleo essencial de tomilho, isso ocorre devido as características da parede celular desses microrganismos. Os compostos majoritários do óleo essencial causam distorções na estrutura física da célula, afetando diretamente a membrana plasmática (BARREIRA et al., 2020). Como já mencionado, os óleos essenciais de um modo geral, apresentam atividade antibacteriana sobre cepas de bactérias Gram positivas (SILVA et al., 2019).

A falta de efetividade inibitória do tratamento com nanofibras e óleo essencial na concentração de 30% pode ter ocorrido devido a esta concentração ser inferior a necessária para que o óleo tenha atuação efetiva contra as bactérias presentes nas amostras. E a ação inibitória verificada para o tratamento com zeína pura (sem óleo essencial de tomilho) frente a *S. aureus* nas amostras de carne, novamente pode estar relacionado ao descrito por Cordeiro (2018) que demonstraram que a proteína do milho, zeína, tem potencial inibitório perante *S. aureus*. Por fim cabe destacar que na análise *in situ* ficou demonstrado potencial de aplicação do sachê de nanofibras de zeína com óleo essencial de tomilho como agente antimicrobiano natural em bandejas contendo carne moída, visto que promoveram a inibição significativa ($p < 0,05$) de *E. coli* e *S. aureus* durante sete dias de armazenamento refrigerado quando comparados as bandejas sem a presença do sachê.

10. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, pode-se concluir que a concentração de 60% de óleo essencial de tomilho encapsulado em nanofibras de zeína através da técnica de *electrospinning*, foi a que apresentou maior efetividade na atividade antimicrobiana, mostrando ser capaz de promover o controle da proliferação de coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva durante 7 dias de armazenamento sob refrigeração, verificando assim uma possível alternativa na substituição aos conservantes químicos sintéticos para aplicação em cortes cárneos. Ainda, foi possível a formação de nanofibras de morfologias uniformes, contínuas e homogêneas sem a presença de *beads*, com potencial antioxidante, indicando a aplicação em embalagens ativas, a fim de prevenir reações oxidativas em alimentos. Sendo assim, o sachê de nanofibras de zeína incorporado com óleo essencial de tomilho tem potencial para ser utilizado como uma alternativa para manutenção da qualidade e segurança de alimentos durante seu armazenamento.

Referências Bibliográficas

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

ALVES, R. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de folhas de manjerição, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos em alimentos. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, **Universidade Federal de Lavras**. 72f. 2010.

BADIA, V.; MILKIEVICZ, T.; LONGHI, D. A.; OLIVEIRA, M. S.; GALVÃO, A. C.; ROBAZZA, W. S. O efeito da aplicação de diferentes óleos essenciais na inativação de bactérias deteriorantes e patogênicas em produtos cárneos: uma meta-análise. **6º simpósio de segurança alimentar**. Desvendando mitos FAURGS. Gramado, 2018.

BRASIL. Doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA). **Ministério da Saúde**. 2020.

BRASIL. **Companhia Nacional de Abastecimento** (CONAB). Informações Agropecuárias. Oferta e demanda de carnes. Nov de 2021.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. 2001.

BARREIRAS, D. G.; RUIZ, F. M.; GOMES, J. E. G.; SOUZA, B. M. S. Eficácia da ação antimicrobiana do extrato de própolis de abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Caderno De Ciências Agrárias**, v. 12, p 1-5, 2020.

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

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

BITTENCOURT, V. R.; GRASSI, L. I.; SCHÚ, A. I.; DALLA NORA, F. M. Embalagens ativas como novas abordagens sustentáveis e ambientalmente corretas: uma revisão da literatura. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 2, p. 219-232, 2020.

CORRÊA, T. R. A.; FERNANDES, C. P.; OLIVEIRA, F. B.; FORATO, L. A.; FILHO, R. B. Análise por ângulo de contato e microscopia de força atômica de filmes comestíveis à base de zeína com adição de nanofibras de celulose. **VI Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**. EMBRAPA. 2021.

COSTA, R. G. F.; MEDEIROS, R. C.; PICCIANI, E. S.; OLIVEIRA, P. G. F.; COSTA, F. G. Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte II: **Aplicações e Perspectivas. Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 22, p. 178-185, 2012.

DENG, L.; LI, Y.; FENG, F.; ZHANG, H. Study on wettability, mechanical property and biocompatibility of electrospun gelatin/zein nanofibers cross-linked by glucose. **Food Hydrocolloids**, v.80, p. 1-10, 2019.

GARCÍA-DÍEZ, J.; ALHEIRO, J.; PINTO, A.L. et al. Behaviour of food-borne pathogens on dry cured sausagemanufactured with herbs and spices essential oils andtheir sensorial acceptability. **Food Control**, v.29, p.262-270, 2016.

GOVARIS, A.; BOTSOGLOU, E.; SERGELIDIS , D.; PASHALINA , S. C. Antibacterial activity of orégano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:h7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, P 1240-1244, 2011.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in

biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, p. 1165-1188, 2018.

HOFFMANN, T. G.; AMARAL, D. P.; BARBIERI, M.; OLIVEIRA, J. T.; ANGIOLETTI, B. L.; CARVALHO, L.; BERTOLI, S. L.; SOUZA, C. K. Embalagem inteligente à base de jaboticaba com potencial aplicação em alimentos lácteos. **Congresso Brasileiro de Polímeros**. 2019.

HOFFMANN, T. G.; ANGIOLETTI, B. L.; BERTOLI, S. L. BARBIERI, M.; CARVALHO, L.; SOUZA, C. K. Intelligent pH-sensing film based on jaboticaba peels extract incorporated on a biopolymeric matrix. **Journal of Food Science and Technology**. v. 59, p. 1001-1010, 2021.

JILDEH, N. B.; MOHAMMED, M. Nanotechnology in packing materials for food and drug stuff opportunities. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 8, p. 5, 2020.

LI F, ZHAO Y, SONG Y. Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning. **Nanofibers, Ashok Kumar, Intech**, v. 22, p. 438-512, 2010.

MARIN, T. MONTANUCCI, J. R.; BENASSI, M. Y.; YAMASHITA, F.. Embalagem ativa para alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada. **Semana Ciências Agrárias**. v. 31. p. 653-660, 2010.

OLIVEIRA, J. E., MATTOSO, L. H. C., ORTS, W. J.; MEDEIROS, E. S. Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: a comparative study. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 10 p. 1-14, 2013.

PAPALIA, I. S.; LONDERO, P. M. G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**. v. 45, p. 552-559, 2015

PÉREZ-MASIÁ, R.; LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARÓN, J. M. Development of zein-based heat-management structures for smart food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 182–191, 2013.

RADÜNZ, M.; HACKBART, H. C. dos S.; CAMARGO, T. M.; NUNES, C. F. P.; BARROS, F. A. P.; MAGRO, J. D.; FILHO, P. J. S.; GANDRA, E. A.; RADÜNZ, A. L.; ZAVAREZE, E. R. Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 330. 2020.

SILVA, S. R.; SOUZA, F. M.; ESPINHEIRA, M. J. C. L. Avaliação da Atividade Antibacteriana do Óleo Essencial das Sementes de *Passiflora edulis Sims* Frente às Bactérias Gram Positivas e Gram Negativas. **ID on line. Revista de psicologia**, [S.l.], v. 13, n. 43, p. 1003-1017, 2018.

SILVA, P. P. B.; XAVIER, M. W. R.; MORAES M. R.; MARTINS, A. C. S.; VIEIRA, V. B. Embalagens de alimentos importância e tipos: uma revisão da literatura. **International Journal of Nutrology**. v. 11, p. 368-390, 2018.

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

TORRES, S. J. V. Obtenção de fibras de blendas zeína/PNIPAAm por eletrofiação em solução. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Londrina, 58 f., 2015.

YILMAZ, A.; BOZKURT, F.; CICEK, P. K.; DERTLI, E.; DURAK, M. Z.; YILMAZ, M. T. A novel antifungal surface-coating application to limit postharvest decay on coated apples: Molecular, thermal and morphological properties of electrospun zein– nanofiber mats loaded with curcumin. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 74-83, 2016.