

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

# DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS UTILIZANDO BIOCOMPOSTOS MICROALGAIS COM AÇÃO ANTIOXIDANTE E INDICADORES DE pH

JULIANA BOTELHO MOREIRA Engenheira de Alimentos

> PROF. DR<sup>a</sup>. MICHELE GREQUE DE MORAIS Orientadora PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA Coorientador

RIO GRANDE, RS 2018

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

# DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS UTILIZANDO BIOCOMPOSTOS MICROALGAIS COM AÇÃO ANTIOXIDANTE E INDICADORES DE pH

## JULIANA BOTELHO MOREIRA

Engenheira de Alimentos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

PROF. DR<sup>a</sup>. MICHELE GREQUE DE MORAIS Orientadora PROF. DR<sup>.</sup> JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA Coorientador

RIO GRANDE, RS 2018

## Ficha catalográfica

M838d Moreira, Juliana Botelho. Desenvolvimento de nanofibras utilizando biocompostos microalgais com ação antioxidante e indicadores de pH / Juliana Botelho Moreira. – 2018. 141 p.
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2018. Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Michele Greque de Morais. Coorientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.
1. Biomassa microalgal 2. Embalagem de alimentos 3. Ficocianina 4. Indicador de pH I. Morais, Michele Greque de II. Costa, Jorge Alberto Vieira III. Título.

Catalogação na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

## APROVAÇÃO

Tese defendida por Juliana Botelho Moreira aprovada em 08 de fevereiro de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Michile Morais

Profa. Dra. Michele Gregue de Morais - FURG

h Prof. Dr. Álvaro Renate Querra Dias - UFPel

Lavours Profa. Dra. Elessandra da Rosa Zavareze (UFPel

Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins - FURG

A 34 m<sup>2</sup> Profa. Dra. Ana Paula Dutra Resem Brizio - FURG

Dedico este trabalho a minha família, pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

#### AGRADECIMENTOS

## À Deus,

por permitir concretizar mais um sonho.

# Aos meus pais Luiz Henrique Moreira e Maria de Fátima Botelho Moreira, e meu marido Maurício Neumann de Oliveira,

pelo amor incondicional, carinho, imensa dedicação e incentivo para que eu chegasse até aqui. Agradeço por acreditarem em mim e por apoiarem as minhas decisões.

## À minha querida orientadora Prof. Dra. Michele Greque de Morais,

pela orientação, incentivo, confiança, aprendizado e tempo disponibilizado. Sua força de vontade e de superação frente a todos os momentos difíceis enfrentados demonstraram o quanto és forte e isso faz com que eu a admire e a respeite ainda mais.

#### Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa,

pela co-orientação e, como sempre digo, pela oportunidade de ter feito parte da equipe LEB, período que proporcionou grande aprendizado, onde fiz iniciação científica e Mestrado. Agradeço também pela confiança durante esses 10 anos.

## Ao Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias e a Prof. Dra. Elessandra Zavereze,

pela confiança em oferecer a oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho na Universidade de Guelph, no Canadá.

## Ao Prof. Dr. Loong-Tak Lim,

pela supervisão, experiência e conhecimentos compartilhados ao longo do período em que realizei meu Doutorado Sanduíche.

## À querida amiga Ana Luiza Terra,

pela amizade, e como sempre muito prestativa, agradeço por me auxiliar nos experimentos finais.

## Às amigas Thaisa Duarte Santos e Bárbara Franco Lucas,

pela nossa amizade, pelos momentos de discontração que foram importantes para superar os momentos difíceis desta caminhada.

## Aos amigos Igor Severo Gonçalves e Vagner Braga,

pela amizade, apoio e auxílios no decorrer dos experimentos, e convívio no dia-a-dia do laboratório.

## Ao iniciante científico Raphael Cruz,

pela competência e dedicação ao trabalho, contribuindo também, para minha formação pessoal e profissional.

## Aos colegas do MIBI e LEB,

que conviveram comigo durante essa caminhada e que me ajudaram.

## Aos técnicos Adriano Arruda e Roque Zílio,

pela disposição na solução de problemas.

## À Universidade Federal do Rio Grande e à Universidade de Guelph

pelo ensino de qualidade, estendo a todos os professores e funcionários com os quais convivi.

## À CAPES, CNPq e MCTIC,

pelo apoio financeiro.

## À todas as pessooas que contribuiram para o desenvolvimento deste trabalho,

as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, a minha terna gratidão.

"Não tenha medo do caminho, tenha medo de não caminhar."

Augusto Cury

#### LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO III

## ARTIGO 1 - AQUECIMENTO DA PROTEÍNA DE MICROALGA EM SOLUÇÃO ÁCIDA E BÁSICA PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS

## ARTIGO 2 - NANOFIBRAS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE DESENVOLVIDAS A PARTIR DE FICOCIANINA E PROTEÍNA MICROALGAL

ARTIGO 3 - INDICADOR DE pH DESENVOLVIDO A PARTIR DE NANOFIBRAS DE PLA/PEO E FICOCIANINA

Tabela 1 - Características das nanofibras de PLA/PEO contendo diferentes concentrações de ficocianina
Tabela 2 – Membranas de nanofibras de PLA/PEO contendo diferentes concentrações deficocianina e espessuras frente a variação de pH112
<b>Tabela 3</b> - Mudança de cor ( $\Delta E$ ) das membranas de nanofibras de PLA/PEO contendo 3 %(m.v <sup>-1</sup> )de ficocianina com diferentes espessuras em função do pH
Tabela 4 - Mudança de cor (ΔE) das membranas de nanofibras de PLA/PEO contendo 2 %(m.v <sup>-1</sup> )de ficocianina com diferentes espessuras em função do pH

## LISTA DE FIGURAS

#### CAPITULO II

Figura 1 - Diagrama esquemático que mostra o conceito de embalagem ativa e	seu
envolvimento na nanotecnologia	31
Figura 2 - Diagrama esquemático que mostra o conceito de embalagem inteligente e	seu
envolvimento na nanotecnologia.	33
Figura 3 - Diagrama esquemático do processo de <i>electrospinning</i>	34
Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura de nanofibras produzidas	por
electrospinning	34
Figura 5 - Estrutura química da ficocianina	42

## CAPÍTULO III

## ARTIGO 1 - AQUECIMENTO DA PROTEÍNA DE MICROALGA EM SOLUÇÃO ÁCIDA E BÁSICA PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS

# ARTIGO 2 - NANOFIBRAS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE DESENVOLVIDO A PARTIR DE FICOCIANINA E PROTEÍNA MICROALGAL

ARTIGO 3 - INDICADOR DE pH DESENVOLVIDO A PARTIR DE NANOFIBRAS DE PLA/PEO E FICOCIANINA

CAPÍTULO I	21
RESUMO GERAL	23
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO GERAL	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO II	27
3 REvisão da literatura	29
3.1 EMBALAGENS DE ALIMENTOS	29
3.2 NANOTECNOLOGIA APLICADA A ALIMENTOS	30
3.2.1 Nanotecnologia aplicada a embalagens ativas	30
3.2.2 Nanotecnologia aplicada a embalagens inteligentes	31
3.3 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS POR <i>ELECTROSPINNING</i>	33
3.3.1 Parâmetros ambientais e do processo de <i>electrospinning</i>	35
3.3.2 Parâmetros da solução polimérica	36
3.4 POLIMEROS	37
3.4.1 POLI (ACIDO LATICO)	38
3.4.2 POLI (OXIDO DE ETILENO)	39
3.4.3 Proteínas	39
3.5 MICROALGA Spirulina	40
3.6 FICOCIANINA	41
3.7 NANOFIBRAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM EMBALAGEM	I DE
ALIMENIOS	43
5./.1 Ação antimicropiana	43
5.7.2 Barreiras a O2 e permeabilidade ao vapor de agua	44
5.7.5 Freservação de compostos bioativos	45 16
2 8 HISTÓDICO DA I INUA DE DESOLUSA "ENCENUADIA DE NANOEIDDA	
CADÍTULO IU	/ ۲. د. ۸۵
CALLI ULO III DESENVOI VIMENTO DO TRABALHO	47 51
ARTICO 1 - AOUFCIMENTO DA PROTEÍNA DE MICROALCA EM SOLU	CÃO
ÁCIDA E BÁSICA PARA PRODUCÃO DE NANOFIBRAS	<b>5</b> 3
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUCÃO	
2 MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 MICROALGA E PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA	
2.2 EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA CONCENTRADA DE Spirulina sp. LEB 18	
2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS E PARÂMETROS	DO
ELECTROSPINNING	59
2.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA	60
2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	60
2.6 DETERMINAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NANOFIBRAS	60
2.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA	<b>DE</b>
FOURIER (FTIR)	61

# SUMÁRIO

2.8 ESTABILIDADE TÉRMICA	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DE Spirulina sp. LEB 18	61
3.2 EFEITO DO AQUECIMENTO DOS BIOPOLÍMEROS E SOLUC	ÓES
POLIMÉRICAS NA MORFOLOGIA E DIÂMETRO DAS NANOFIBRAS	61
3.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA	DE
FOURIER (FTIR)	67
3.4 ESTABILIDADE TÉRMICA	
4 CONCLUSÃO	68
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ARTIGO 2 - NANOFIBRAS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE DESENVOLVI	DAS
A PARTIR DE FICOCIANINA E PROTEÍNA MICROALGAL	73
RESUMO	75
ABSTRACT	75
1 INTRODUÇÃO	77
2 MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL	78
2.2 EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA CONCENTRADA DE Spirulina sp. LEB 18	78
2.3 PREPÁRO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS E PARÂMETROS	DO
ELECTROSPINNING	79
2.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA	79
2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	79
2.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA	DE
FOURIER (FTIR)	79
2.7 ESTABILIDADE TÉRMICA	80
2.8 ATIVIDADES ANTIOXIDANTE DAS NANOFIBRAS	80
2.8.1 Atividade antioxidante com 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfôni	co)
sal de diamônio (ABTS <sup>+</sup> )	80
2.8.2 Atividade antioxidante com hidrato 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).	81
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, UNIFORMIDADE E DIÂMETRO	DAS
NANOFIBRAS	81
3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA	DE
FOURIER (FTIR)	85
3.3 ESTABILIDADE TERMICA	86
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS NANOFIBRAS	87
4 CONCLUSAO	89
5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	90
	a de
ARTIGO 3 - INDICADOR DE PH DESENVOLVIDO A PARTIR DE NANOFIBRA	S DE
PLA/PEO E FICOCIANINA	95
	97
	9/
Ι ΙΝΙΚΟΡυζΑυ	99
2 MATERIAL E METUDUS	. 100
2.1 WAIEKIAL	. 100
2.2 SULUÇUES PULIVIEKICAS E <u>ELEUTKUSPINININU</u>	. 100
2.3 ΕΓΙΟΙΕΝΟΙΑ DE ΕΙΝΟΑΡΌΟLΑΥΑΟ (ΕΕ)	. 1UI
2.4 MUKFULUUIA. DIAMETKU MEDIU E TAMANHU DE PUKU DAS FIBKA	3101

2.5 ESTABILIDADE TÉRMICA	.102
2.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA	DE
FOURIER (FTIR)	.102
2.7 MOLHABILIDADE DAS FIBRAS	.102
2.8 PARÂMETROS DE COR E ESPESSURA DAS NANOFIBRAS	.102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	.103
3.1 MORFOLOGIA, DIÂMETRO MÉDIO DAS NANOFIBRAS E EFICIÊNCIA	DE
ENCAPSULAÇÃO (EE)	.103
3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA	.108
3.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA	DE
FOURIER (FTIR)	.108
3.4 MOLHABILIDADE	.109
3.5 ESPESSURA E ANÁLISE DE COR	.110
4 CONCLUSÃO	.115
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.115
CAPÍTULO IV	.119
CONCLUSÃO GERAL	.121
CAPÍTULO V	.123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.125
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	.141

CAPÍTULO I

#### **RESUMO GERAL**

A proteína e ficocianina de origem microalgal podem ser utilizadas para o desenvolvimento de nanofibras, apresentando características de biodegradabilidade e bioatividade. No entanto, para que ocorra a formação de nanofibras com proteína é necessário tratamento ácido, alcalino ou aquecimento, assim como formação de blendas com outros polímeros como o poli (óxido de etileno) (PEO). Devido a mudança da sua coloração frente a variação de pH, a ficocianina pode ser adicionada em fibras com o intuito de desenvolver indicador de pH. Para a produção de nanofibras poliméricas com aplicação em embalagens de alimentos, o PEO e poli (ácido lático) (PLA) também ganham destaque, uma vez que são biodegradáveis, renováveis e compatíveis com os polímeros sintéticos. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver nanofibras poliméricas utilizando biocompostos de origem microalgal com ação antioxidante e sensíveis a alteração do pH. Inicialmente foi avaliado o efeito do aquecimento do PEO em soluções alcalinas e ácidas na formação de nanofibras utilizando proteína concentrada de Spirulina sp. LEB 18. Com a maior concentração de proteína (10 %, m.m<sup>-1</sup>), o diâmetro médio das nanofibras foi de aproximadamente 450 nm. Para as nanofibras desenvolvidas com 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada, os picos no espectro FTIR foram observados a 1641 cm<sup>-1</sup> (amida I) e 1533 cm<sup>-1</sup> (amida II). Além disso, o incremento da concentração de proteína de 5 para 10 % (m.m<sup>-1</sup>) aumentou a temperatura inicial de degradação das nanofibras em 34 °C. Analisada a melhor condição para o desenvolvimento de nanofibras a base de proteína microalgal (solução ácida e aquecimento do PEO), foi estudada a adição ficocianina para avaliar o potencial de aplicação em embalagens bioativas. Nanofibras uniformes contendo ficocianina foram obtidas, apresentando diâmetro médio de 269, 314 e 542 nm ao utilizar 5, 7,5 e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18, respectivamente. As nanofibras desenvolvidas com 7,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada e 2 % (m.m<sup>-1</sup>) de ficocianina apresentaram potencial antioxidante pelos métodos ABTS+ e DPPH. Para desenvolver indicador de pH foram produzidas nanofibras de PLA/PEO contendo ficocianina. As soluções foram preparadas com PLA (9 %, m.v<sup>-1</sup>) e PEO (3 %, m.v<sup>-1</sup>), sendo utilizada a proporção 9:1, respectivamente. A ficocianina foi avaliada nas concentrações 2, 3, 4, 5 e 6 % (m.v<sup>-1</sup>). Nanofibras uniformes de PLA/PEO foram obtidas com 2 e 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina. Ao utilizar o coletor rotatório foi obtido diâmetro médio de 921 nm para as fibras desenvolvidas com 3 % (m.v<sup>-1</sup>) do corante. As nanofibras de PLA/PEO com 2 e 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina apresentaram eficiência de encapsulação de 80,7 e 71,4 %, respectivamente. As fibras contendo 3% (m.v<sup>-1</sup>) do pigmento foram as que apresentaram as melhores respostas quanto a percepção de mudanca de cor ( $\Delta E$ ). A maioria (60 %) dos valores de  $\Delta E$  encontrada para essas nanofibras foram superiores a 12, indicando mudança absoluta de cor. Além disso, foi verificada influência da espessura das nanofibras no valor de  $\Delta E$ . Com a maior espessura das nanofibras desenvolvidas a partir de 3 %  $(m.v^{-1})$  de ficocianina foi possível obter 76 % dos resultados de  $\Delta E$  acima de 12. Desta forma, biocompostos microalgais podem ser utilizados para o desenvolvimento de nanofibras bioativas e indicadoras de pH com potencial aplicação para embalagem de alimentos. Além disso, a adição da ficocianina em nanofibras PLA/PEO como indicador de pH é alternativa promissora para aplicação na área de embalagem inteligentes.

**Palavras-chave**: Biomassa microalgal. Embalagem de alimentos. Ficocianina. Indicador de pH.

# Development of nanofibras using microalgae biocompounds with antioxidant action and pH indicators

#### ABSTRACT

Protein and phycocyanin of microalgal origin can be used for the development of nanofibers, presenting characteristics of biodegradability and bioactivity. However, for the formation of nanofibers with protein it is necessary to treat acid, alkaline or heating, as well as the formation of blends with other polymers such as polyethylene oxide (PEO). Due to the change of its coloration against pH variation, phycocyanin can be added in fibers in order to develop a pH indicator. For the production of polymeric nanofibers for use in food packaging, PEO and poly (lactic acid) (PLA) are also prominent as they are biodegradable, renewable and compatible with synthetic polymers. In this context, the general objective of this work was to develop polymeric nanofibers using biocompounds of microalgal origin with antioxidant activity and sensitive to pH alteration. Initially the effect of the heating of the PEO in alkaline and acidic solutions in the formation of nanofibers using protein concentrate from Spirulina sp. LEB 18 was evaluated. With the highest protein concentration (10 %, w.w<sup>-1</sup>), the mean diameter of the nanofibers was approximately 450 nm. For the nanofibers developed with 5 % (w.w<sup>-1</sup>) of protein concentrate, the peaks in the FTIR spectrum were observed at 1641 cm<sup>-1</sup> (amide I) and 1533 cm<sup>-1</sup> (amide II). In addition, the increase in protein concentration from 5 to 10 % (w.w<sup>-1</sup>) increased the initial degradation temperature of the nanofibers by 34 °C. After analyzing the best condition for the development of nanofibers based on microalgal protein (acid solution and heating of PEO), the addition of phycocyanin was studied to evaluate the potential of application in bioactive packages. Uniform nanofibers containing phycocyanin were obtained with a mean diameter of 269, 314 and 542 nm using 5, 7.5 and 10 % (w.w<sup>-1</sup>) of the protein concentrate from Spirulina sp. LEB 18, respectively. Nanofibers developed with 7.5 % (w.w<sup>-1</sup>) of protein concentrate and 2 % (w.w<sup>-1</sup>) of phycocyanin showed antioxidant potential by the ABTS<sup>+</sup> and DPPH methods. To develop pH indicator PLA/PEO the nanofibers containing phycocyanin were produced. The solutions were prepared with PLA (9%, w.v<sup>-1</sup>) and PEO (3%,  $w.v^{-1}$ ), using a 9:1 ratio, respectively. Phycocyanin was evaluated at concentrations 2, 3, 4, 5 and 6 % (w.v<sup>-1</sup>). Uniform PLA/PEO nanofibers were obtained with 2 and 3 % (w.v<sup>-1</sup>) of phycocyanin. When using the rotary collector a mean diameter of 921 nm was obtained for the fibers developed with 3% (w.v<sup>-1</sup>) of the dye. PLA/PEO nanofibers with 2 and 3 % (w.v<sup>-1</sup>) of phycocyanin showed encapsulation efficiency of 80.7 and 71.4 %, respectively. The fibers containing 3 % (w.v<sup>-1</sup>) of the pigment were the ones that presented the best responses regarding the perception of color change ( $\Delta E$ ). Most (60 %) of the  $\Delta E$  values found for these nanofibers were greater than 12, indicating absolute color change. In addition, the influence of the thickness of the nanofibers in the value of  $\Delta E$  was verified. With the highest thickness of the nanofibers developed from 3 % (w.v<sup>-1</sup>) of phycocyanin, it was possible to obtain 76 % of the results of  $\Delta E$  above 12. Thus, microalgae biocompounds can be used for the development of bioactive nanofibers and pH indicators with potential application for food packaging. In addition, the addition of phycocyanin to PLA/PEO nanofibers as a pH indicator is a promising alternative for application in the intelligent packaging area.

Keywords: Microalgae biomass. Food packaging. Phycocyanin. pH indicator.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento de novos materiais para aplicação em embalagens busca a redução dos custos de produção, embalagens sustentáveis ao meio ambiente. A nanotecnologia potencializa características funcionais das embalagens através do uso de nanomateriais. A aplicação de nanofibras em embalagens pode contribuir com as propriedades mecânicas do material, gerando embalagens mais reforçadas (WEISS; TAKHISTOV; MCCLEMENTS, 2006), e com o aumento da vida útil dos produtos alimentícios (GARCÍA; FORBE; GONZALEZ, 2010).

O aumento de escala da produção de nanofibras para aplicação em embalagens pode ser obtido utilizando a tecnologia *Nanospider*. *Nanospider* é uma metodologia modificada do processo de *electrospinning*, utilizada para produção comercial de nanofibras. Esta tecnologia utiliza potencial elétrico de até 80 kV e permite a utilização de volumes maiores de solução polimérica quando comparado ao processo tradicional de *electrospinning*. Além disso, as nanofibras produzidas são depositadas em coletor cilíndrico rotatório (AL-DEYAB et al., 2013). Este processo pode ser utilizado para produção de nanofibras aplicadas em embalagens inteligentes ou ativas para alimentos (GARCÍA; FORBE; GONZALEZ, 2010).

A preocupação com o meio ambiente e a escassez de petróleo estão direcionando a pesquisa para desenvolver nanofibras a partir de polímeros, que sejam biodegradáveis, renováveis e compatíveis com os polímeros sintéticos. Neste contexto, destacam-se as proteínas (GUO et al., 2015) e o poli (ácido láctico) (PLA) (DAI; LIM, 2015). O PLA foi utilizado para desenvolver nanofibras para aplicações, tais como imobilização da enzima (ZHOU; LIM, 2009), liberação controlada de medicamentos (SILL; VON RECUM, 2008) e *scaffolds* (VAZ et al., 2005). Para otimizar a aplicação das nanofibras de PLA, este polímero pode formar blenda com outros polímeros como o poli (óxido de etileno) (PEO), gerando nanofibras hidrofílicas (HONARBAKHSH; POURDEYHIMI, 2011).

Recentemente, proteínas têm sido estudadas no desenvolvimento de nanofibras utilizando a técnica de *electrospinning*, incluindo, o colágeno e a elastina (AGUIRRE-CHAGALA et al., 2017), o fibrinogênio (WNEK; CARR; SIMPSON; BOWLIN, 2003), a proteína isolada de soja (VEGA-LUGO; LIM, 2008; WANG et al., 2013) e a proteína concentrada (VERDUGO; LIM RUBILAR, 2014). A dificuldade com *electrospinning* em solução aquosa de proteína tem sido atribuída às características de polieletrólitos de polipeptídeos, que são capazes de suportar cargas acompanhados por muitos contra-íons, que enfraquecem a densidade de carga requerida para a formação de nanofibras (HUANG et al.,

2004). Ao contrário das proteínas fibrosas, as proteínas globulares devem ser desdobradas para que ocorra o emanharamento das cadeias e formação de nanofibras. Assim, um dos métodos mais utilizados para quebrar a estrutura quaternária da proteína é utilizar a combinação de métodos alcalinos e aquecimento. Em pH acima do seu ponto isoelétrico a proteína solubiliza, expondo os grupos hidrofóbicos e sulfidrilos. Estes grupos podem formar ligações hidrofóbicas e dissulfeto, que tem grande impacto sobre a estabilidade da rede de proteína (REMONDETTO; AÑON; GONZALEZ, 2001). Além de métodos alcalinos, a desnaturação em meio ácido também demonstrou a capacidade das proteínas de formar nanofibras por *electrospinning* (VERDUGO; LIM; RUBILAR, 2014).

A microalga *Spirulina* é conhecida pelo elevado teor proteico que apresenta. A biomassa dessa microalga, assim como seus compostos têm sido estudados no desenvolvimento de nanofibras (MORAIS et al., 2015a). Além disso, pigmentos de importância comercial como a ficocianina, podem ser extraídos de sua biomassa. A ficocianina é um pigmento de coloração azul intensa, utilizado como corante natural em alimentos, que apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatórias e antitumoral. No entanto, a ficocianina é instável ao calor, e, por isso, seu potencial para aplicação em produtos alimentícios, que necessitam de tratamento térmico, é restrito (MARTELLI et al., 2014). Assim, nanofibras poliméricas surgem para aumentar a estabilidade térmica de biocompostos como a ficocianina (BRAGA et al., 2016), contribuindo para sua ação bioativa na preservação de alimentos.

Além disso, a ficocianina também é sensível a luz e a mudanças no pH, assim sua instabilidade resulta em precipitação e descoloração (MARTELLI et al., 2014). A descoloração de ficocianina, considerado recentemente como problema para a indústria de alimentos, pode ser interessante para aplicação em embalagens inteligentes. Nanofibras poliméricas podem ser desenvolvidas com o intuito de produzir indicadores de pH para serem aplicados em embalagens de alimentos, uma vez que a estabilidade e, consequentemente, a coloração da ficocianina é reduzida dependendo das variações deste parâmetro.

## **2 OBJETIVOS**

#### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanofibras poliméricas utilizando biocompostos de origem microalgal com ação antioxidante e sensíveis a alteração do pH.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

• Avaliar a influência da solução polimérica em meio ácido e alcalino para o desenvolvimento de nanofibras com proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18;

• Verificar o efeito do aquecimento do PEO na morfologia das nanofibras com proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18;

• Desenvolver nanofibras de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18/PEO e ficocianina com atividade antioxidante;

- Desenvolver nanofibras de PLA/PEO e ficocianina sensíveis à variações de pH;
- Avaliar a influência da concentração de ficocianina e espessura das nanofibras na resposta de mudança de cor do indicador de pH desenvolvido.

CAPÍTULO II

#### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

## 3.1 EMBALAGENS DE ALIMENTOS

As embalagens de alimentos continuam a evoluir em resposta ao avanço da ciência e tecnologia dos materiais, bem como à mudança da procura dos consumidores. A embalagem é essencial para permitir a distribuição e preservação dos alimentos e facilitar sua conveniência e comunicação final com o consumidor. Com isso, a indústria de embalagens tornou-se a terceira maior do mundo e representa cerca de 2 % do Produto Nacional Bruto em países desenvolvidos (HAN, 2005; MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014; ROBERTSON, 2005).

As embalagens desempenham papel fundamental na indústria alimentícia devido as suas funções, tais como contenção, para armazenar os produtos e mantê-los seguros até serem consumidos; proteção, contra riscos mecânicos, ambientais e microbiológicos encontrados durante a distribuição e o uso; comunicação, para identificar o conteúdo, auxiliar na venda do produto e manejo da embalagem; maquinabilidade, para alcançar bom desempenho em linhas de produção de alta velocidade de enchimento, fechamento e verificação e conveniência, manuseio simples tanto para utilização quanto para descarte da embalagem (FELLOWS, 2006).

A principal função das embalagens de alimentos é manter a qualidade e a segurança dos produtos alimentícios. A embalagem deve, portanto, dificultar o ganho ou perda de umidade, evitar a contaminação microbiana e atuar como barreira contra a infiltração de vapor de água, oxigênio (O<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e outros compostos voláteis. A embalagem deve ser segura, inerte, de baixo custo, leve, de fácil degradação no ambiente ou reutilização e capaz de resistir à condições extremas durante o processamento (DUNCAN, 2011; MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014).

Diversas tecnologias e materiais vêm sendo desenvolvidos para obtenção de embalagens definindo novas possibilidades e formas de uso, ideais aos produtos e usuários. Devido ao complexo e ocupado estilo de vida dos consumidores, os produtores de alimentos estão se esforçando para desenvolver sistemas de embalagem funcionais. Embalagens ativas tem as funções de prolongar a vida de prateleira "Shelf Life", preservando o frescor do produto. As embalagens inteligentes possuem a função de exibir informações sobre a qualidade, fornecendo *feedback* ao consumidor, além de melhorar a segurança e conveniência (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014).

#### **3.2 NANOTECNOLOGIA APLICADA A ALIMENTOS**

A nanotecnologia é uma ferramenta interdisciplinar para o desenvolvimento de produtos inovadores. Prevê-se que a nanotecnologia impactará pelo menos US\$ 3 trilhões em toda a economia global até 2020, criando uma demanda de 6 milhões de empregados em diversas indústrias (DUNCAN, 2011). Em 2008, a embalagem global de alimentos relacionados com a nanotecnologia foi de US\$ 4,13 bilhões, que foi projetado para cerca de 12 % da taxa de crescimento anual composta. Com esta tendência global, espera-se que a nanotecnologia proporcione um impulso importante no desenvolvimento de sistemas avançados de embalagem para atender às necessidades dos consumidores (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014).

Nanotecnologia é a criação de materiais funcionais, dispositivos e sistemas, através da manipulação da matéria em escala atômica ou molecular com comprimento de 1 a 1000 nm (SCHMATZ et al., 2016). Nesta escala, as propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais são potencializadas. A aplicação da nanotecnologia em alimentos é nova em comparação com a área biomédica e as indústrias de tecnologia de informação, nas quais esta tecnologia é utilizada para fabricação de materiais. No entanto, existem inúmeras oportunidades que podem ser exploradas, como a elaboração de embalagens ativas com características funcionais e nutracêuticas e embalagens inteligentes (ASSIS et al., 2012).

A nanotecnologia tem grande potencial para gerar produtos inovadores no âmbito alimentar com inúmeros benefícios. Algumas aplicações previstas para os próximos 5-10 anos incluem: desenvolvimento de alimentos à base de nanotecnologia com menos calorias, gordura, sal e açúcar, mantendo sabor e textura; veículos em nanoescala para a entrega eficaz de micronutrientes e bioativos sensíveis; nanobiosensores para a detecção de agentes patogênicos, toxinas e bactérias em alimentos; sistemas de identificação para rastrear materiais de origem animal e vegetal para o consumo; filmes em nanoescala para embalagens de alimentos e materiais de contato que prolongam a vida de prateleira e conservam a qualidade (HONGDA et al., 2014).

#### 3.2.1 Nanotecnologia aplicada a embalagens ativas

As embalagens ativas estão focadas em fornecer proteção e preservação dos alimentos através de mecanismos ativados por fatores intrínsecos e /ou extrínsecos. Esse tipo de embalagem retarda as deteriorações química e microbiológica, inibindo o crescimento de micro-organismos patogênicos, garantindo a segurança dos alimentos e melhorando características sensoriais (LIM, 2011).

Nos sistemas de embalagens ativas, a função de proteção da embalagem é reforçada pela incorporação de compostos ativos como antimicrobianos, absorvedores de oxigênio, CO<sub>2</sub> e umidade, removedores de etileno, dentre outros. A Figura 1 ilustra os componentes-chave de um sistema de embalagem ativa habilitado pela nanotecnologia. Os componentes ativos são utilizados pela nanotecnologia para produzir um transportador de componentes ativos que pode ser integrado a embalagem de alimentos. O transportador pode interagir com fatores internos e/ou externos (setas azuis), ativando, assim, uma ação pretendida (seta vermelha). Essa ação contribui para aumentar a vida útil, manter a qualidade dos alimentos e/ou a segurança do produto (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014).

Figura 1 - Diagrama esquemático que mostra o conceito de embalagem ativa e seu envolvimento na nanotecnologia.



Fonte: MIHINDUKULASURIYA; LIM (2014)

## 3.2.2 Nanotecnologia aplicada a embalagens inteligentes

Na busca da satisfação dos consumidores mais exigentes, as empresas, juntamente aos centros de pesquisa e universidades, têm investido no estudo de novas tecnologias, como no desenvolvimento de embalagens inteligentes (BRIZIO, 2014). As embalagens inteligentes possuem função reforçada no que diz respeito à comunicação e *marketing*, para fornecer *feedback* dinâmico para o consumidor sobre a qualidade do produto. As embalagens inteligentes permitem o monitoramento da vida útil dos alimentos, do ambiente ou da integridade da embalagem durante o transporte e armazenamento, detectando ou registrando suas mudanças, além de fornecer informações sobre a qualidade do produto (LIM, 2011).

As embalagens inteligentes também podem contribuir para melhorar os Sistemas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (HEISING et al., 2014) desenvolvidos para detectar oportunamente alimentos inseguros; identificar riscos para a saúde e estabelecer estratégias e procedimentos para prevenir, reduzir ou eliminar suas ocorrência; e identificar processos que afetam fortemente os atributos de qualidade e melhorar de forma eficiente a qualidade final dos alimentos.

Os sistemas de embalagens inteligentes têm a função de melhorar o aspecto de comunicação de uma embalagem com o consumidor de modo a refletir a qualidade dos alimentos em tempo real. Este tipo de embalagem é útil para aumentar a eficácia da transferência de informações durante a distribuição de produtos através de métodos de comunicação inovadores, como etiquetas inteligentes (indicadores de tempo-temperatura, sensores de oxigênio e dióxido de carbono) (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006; VON BULTZINGSLOWEN et al., 2002). Através de sensores incorporados ao material, interna o externamente, por exemplo, pode-se controlar as condições do alimento ou ambiente com selos ou etiquetas que mudam de cor para identificar qualquer tipo de alteração. As embalagens inteligentes podem informar detalhes da origem e da qualidade do transporte e a distribuição por meio de códigos de barras inteligentes, ligados a sistemas de rastreamento por GPS. Assim, o fabricante consegue rastrear o produto e se informar sobre suas condições (BRIZIO, 2014).

Os elementos-chave do sistema de embalagem inteligente baseado na nanotecnologia são resumidos na Figura 2. O indicador/sensor, produzido com nanotecnologia, pode interagir com fatores internos (componentes de alimentos e *headspace*) e/ou fatores ambientais externos (setas azuis). Como resultado dessa interação, o indicador/sensor irá gerar uma resposta (sinal visual, por exemplo) que se correlaciona com o estado do produto alimentício. A informação gerada é útil para a comunicação com os consumidores, informando-os sobre a segurança e a qualidade dos produtos. Além disso, a resposta dos indicadores ou sensores pode ser utilizada pelos produtores para determinarem, quando e quais as ações a serem tomadas em todo o processo de produção e distribuição dos produtos alimentícios (YAM; TAKHISTOV; MILTZ, 2005).
Figura 2 - Diagrama esquemático que mostra o conceito de embalagem inteligente e seu envolvimento na nanotecnologia.



Fonte: MIHINDUKULASURIYA; LIM (2014).

## 3.3 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS POR ELECTROSPINNING

Nanofibras são compostas de polímeros sintéticos, naturais ou biopolímeros (MORAIS et al., 2014). O processo de *electrospinning* (Figura 3) é a técnica mais amplamente adotada para formação de nanofibras poliméricas devido à repetibilidade, facilidade na ampliação de escala do processo e produção de nanofibras longas e uniformes (Figura 4). Este método produz nanofibras com faixa de diâmetro que varia de 10 a 1000 nm, com elevada elasticidade, resistência e área de superfície em relação ao volume, dependendo do polímero utilizado (SCHMATZ et al., 2015).

O equipamento do processo de *electrospinning* consiste basicamente de um recipiente que contém a solução polimérica, uma fonte de alta tensão e um coletor condutor aterrado. O eletrodo acoplado ao capilar carrega eletricamente a solução polimérica e esta é ejetada em direção ao coletor condutor (BAJI et al., 2010). O princípio do *electrospinning* consiste na aplicação de alta tensão à solução de polímero que resulta na formação de nanofibras por meio de repulsão de cargas eletrostáticas e alongamento da solução. A solução polimérica é alimentada através de capilar em fluxo constante carregado com potencial de alta tensão (10-

30 kV). Quando o campo elétrico produz força suficiente para superar a tensão superficial na ponta do capilar ocorre à formação do "cone de Taylor". O solvente evapora gradualmente, as nanofibras são depositadas no coletor, resultando apenas em nanofibras sobre coletor (MORAIS et al., 2014).

Figura 3 - Diagrama esquemático do processo de *electrospinning*.



Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura de nanofibras produzidas por *electrospinning*.



As nanofibras produzidas podem ser depositadas em coletor que pode ser estacionário ou rotatório como no equipamento *Nanospider*. O *Nanospider* possibilita o uso da

tecnologia *electrospinning*, porém de uma forma modificada denominada *free surface electrospinning*. Esta tecnologia é empregada para produção comercial de nanofibras, a qual utiliza potencial elétrico de até 80 kV e permite a utilização de volumes maiores de solução polimérica quando comparado ao processo tradicional de *electrospinning*. Além disso, as nanofibras produzidas são depositadas em coletor cilíndrico rotatório (AL-DEYAB et al., 2013) proporcionando a maior produção do material.

Existem vários fatores que afetam o processo de *electrospinning*. Esses fatores são classificados como parâmetros do processo, da solução e ambientais. Os parâmetros do processo incluem o potencial elétrico aplicado, a taxa de alimentação e a distância entre o capilar e o coletor. Os parâmetros da solução incluem a concentração do polímero, a viscosidade, a tensão superficial e a condutividade da solução. Os parâmetros ambientais incluem a umidade relativa e a temperatura. Cada um desses parâmetros afeta significativamente a morfologia das nanofibras. Pela manipulação adequada desses parâmetros obtêm-se nanofibras de morfologia e diâmetros desejados (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

#### 3.3.1 Parâmetros ambientais e do processo de electrospinning

A temperatura e a umidade relativa podem influenciar o processo de *electrospinning* e a formação de nanofibras. O aumento de temperatura, por exemplo, pode resultar em nanofibras com diâmetros menores devido à redução da viscosidade (VRIEZE et al., 2009). Em relação à umidade, se esta for baixa pode ocorrer a secagem do solvente quando a taxa de evaporação do solvente for mais rápida (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Por outro lado, se a umidade for alta poderá ser formado nanofibras com diâmetros maiores devido a cargas no jato que podem ser neutralizadas e a força de alongamento que se torna pequena (LI; WANG, 2013).

No processo de *electrospinning*, o fator crucial é a tensão aplicada à solução. Existe uma faixa ideal de tensão aplicada ou intensidade de campo elétrico para um determinado sistema polímero-solvente, em que a formação de nanofibra é desejável (PILLAY et al., 2013). O aumento da tensão aplicada aumenta a força de repulsão eletrostática na solução favorecendo o alongamento do jato da solução de polímero. Assim, há formação de nanofibras de diâmetros reduzido (SHI et al., 2015; SILL; VON RECUM, 2008). O aumento de diâmetro e a formação de nanofibras desuniformes e com gotas a partir do aumento da tensão aplicada, são atribuídos à diminuição do tamanho do cone de Taylor e ao aumento da velocidade do jato para a mesma taxa de alimentação (HAIDER; HAIDER; KANG, 2015).

A taxa de alimentação da solução de polímero é outro parâmetro importante do processo. Geralmente, recomenda-se a taxa de fluxo mais baixa, uma vez que o solvente terá tempo suficiente para a evaporação (BHARDWAJ; KUNDU 2010). Se a taxa for muito alta, serão formadas fibras com gotas e diâmetros maiores, devido a não evaporação do solvente e a falta de alongamento da solução entre o capilar e o coletor (LI; WANG 2013). Por outro lado, a menor taxa de alimentação pode, também, não expulsar o jato de solução de polímero do capilar devido à secagem da solução no capilar (ROGINA, 2014). Assim, deve haver uma taxa de fluxo mínima para que o solvente seja evaporado, ocorra alongamento do jato da solução e haja a formação das nanofibras uniformes, sem gotas (HAIDER; HAIDER; KANG, 2015).

Semelhante ao potencial elétrico aplicado e taxa de alimentação, a distância entre a ponta do capilar e o coletor também varia com o sistema de polímero. A morfologia das nanofibras pode ser afetada por este parâmetro, uma vez que depende do tempo de deposição e da taxa de evaporação (MATABOLA; MOUTLOALI, 2013. Portanto, uma distância crítica precisa ser mantida para preparar nanofibras lisas e uniformes (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

#### 3.3.2 Parâmetros da solução polimérica

No processo de *electrospinning*, é necessária uma concentração mínima de solução polimérica para a formação de nanofibras (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Durante o alongamento da solução de polímero, é o emaranhamento das cadeias de moléculas que impede que o jato eletricamente dirigido se separe, mantendo um jato de solução contínua (HAIDER; HAIDER; KANG, 2015). Quando a concentração da solução é baixa, os polímeros não possuem emaranhamento suficiente e não podem se alongar (RAMAKRISHNA et al., 2005). A rede de emaranhamento não é tão forte para estabilizar o jato carregado, gerando nanofibras com gotas e/ou somente gotas (WANG; HSU; HWANG, 2008). Para altas concentrações, existem mais emaranhados das cadeias poliméricas e o jato carregado começa a ser estabilizado produzindo nanofibras (YÖRDEM; PAPILA; MENCELOĞLU, 2008). Além disso, o aumento da concentração do polímero acima de um valor crítico evita o fluxo de solução através da ponta da agulha, obstruindo o capilar.

Aumentar a concentração da solução polimérica ocasionará aumento na viscosidade, que contribui para o emaranhamento entre as cadeias de polímero (HAIDER et al., 2013). A viscosidade da solução de polímero afeta significativamente o diâmetro da fibra. Os poros, microporos e estruturas com gotas são menos propensos a se formar durante o *electrospinning* se a viscosidade for mais alta. Se a viscosidade for muito baixa, o jato a partir

do cone de Taylor será transformado em gotas, resultando em estrutura com grânulos (KHAN et al., 2013).

O peso molecular do polímero também efeito significativo nas propriedades reológicas e elétricas, como viscosidade, tensão superficial, condutividade e força dielétrica e, consequentemente, sobre a morfologia das nanofibras (ROGINA, 2014). Geralmente, o polímero de alto peso molecular é utilizado, pois fornecem a viscosidade desejada para a produção de nanofibras (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Com a concentração fixa e a redução do peso molecular do polímero há tendência para formar gotas (LI; WANG, 2013).

A tensão superficial é função da composição do solvente da solução e também influencia na morfologia das nanofibras. Nanofibras com gotas podem ser convertidas em nanofibras planas e uniformes quando a concentração de polímero é fixada e a tensão superficial da solução é reduzida (LI; WANG, 2013). A alta tensão superficial de uma solução inibe o processo de *eletrospinning* devido à instabilidade de jatos e à geração de gotículas pulverizadas (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

A condutividade da solução é determinada principalmente pelo tipo de polímero, solvente utilizado e disponibilidade de sais ionizáveis. *Electrospinning* envolve alongamento da solução causada pela repulsão das cargas na sua superfície. Assim, se a condutividade da solução for aumentada, mais cargas podem ser transportadas pelo jato eletrostático acarretando no alongamento da solução (RAMAKRISHNA et al., 2005). A condutividade da solução não afeta apenas a formação do cone de Taylor, mas também o diâmetro das nanofibras. Em solução com menor condutividade, a superfície da gota não terá carga suficiente para formar o cone de Taylor, e o processo de *electrospinning* não ocorrerá. Aumentar a condutividade da solução para um valor crítico não só aumentará a carga na superfície da gota para formar o cone de Taylor, mas também causará a redução no diâmetro da nanofibra. Entretanto, aumentar a condutividade para além de um valor crítico irá novamente dificultar a formação do cone de Taylor (SUN et al., 2014).

# 3.4 POLÍMEROS

Polímeros são compostos de origem natural ou sintética com massa molecular da ordem de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> formados pela repetição de um grande número de unidades químicas. Existem polímeros orgânicos e inorgânicos, que podem ser utilizados no desenvolvimento de materiais para aplicação em embalagem de alimentos, fibras têxteis, borrachas, dentre outros. As substâncias que dão origem aos polímeros por reação química são chamada de monômeros. As unidades que se repetem ao longo da cadeia polimérica e que caracterizam a composição química do polímero são chamadas de unidades repetitivas ou *meros* (AKCELRUD, 2007).

A crescente população global e o aumento do consumo resultaram em uma crescente poluição ambiental e acumulação de resíduos. Os resíduos gerados pelo descarte inadequado de polímeros representam grande desafio para o nosso meio ambiente. Esses problemas são predominantemente contribuídos por plásticos empregados em aplicações de curto prazo, como embalagens e produtos descartáveis. Além disso, grande parte desses problemas pode ser resolvida empregando materiais biodegradáveis e, portanto, estão recebendo atenção nos últimos anos (KOH et al., 2018).

# 3.4.1 POLI (ÁCIDO LÁTICO)

Entre os materiais biodegradáveis, o poli (ácido lático) (PLA), é um dos polímeros mais promissores. O PLA é um poliéster alifático constituído por monómeros de ácido lático polimerizados ligados por ligações éster (CASTRO-AGUIRRE et al, 2016). O seu monômero ácido lático é obtido a partir da fermentação dos carboidratos de fontes renováveis (milho, batata e cana-de-açúcar) por bactérias do gênero *Lactobacillus* (LU; XIAO; XU, 2009). Como o PLA é um polímero sintetizado a partir de recursos renováveis, a sua utilização pode vir a auxiliar a reduzir as emissões de gases de efeito estufa e o consumo de energia fóssil (VINK et al., 2004). Assim, o PLA se torna uma alternativa sustentável aos demais polímeros de origem petroquímica (KOH; ZHANG; HE, 2018).

O PLA fornece propriedades óticas, mecânicas, térmicas e de barreira comparáveis aos polímeros de origem petroquímica, tais como polipropileno (PP), poli (tereftalato de etileno (PET) e poliestireno (PS), expandindo sua gama de aplicações (AURAS; HARTE; SELKE, 2004; VINK; DAVIES, 2015). O PLA é classificado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), sendo considerado seguro para todas as aplicações de embalagens de alimentos (CONN et al., 1995; FDA, 2002).

Dentre as principais vantagens do PLA inclui-se toxicidade zero, biocompatibilidade, alta resistência mecânica e plasticidade térmica e é compostável (KARAMANLIOGLU; PREZIOSI; ROBSON, 2017). O PLA foi utilizado para desenvolver nanofibras para aplicações, tais como imobilização da enzima (ZHOU; LIM, 2009), liberação controlada de medicamentos (SILL; VON RECUM, 2008) e *scaffolds* (VAZ et al., 2005). Para otimizar a aplicação das nanofibras de PLA, este polímero pode formar blenda com outros polímeros mais econômicos e hidrofílicos como o óxido de polietileno (PEO) (HONARBAKHSH; POURDEYHIMI, 2011).

#### **3.4.2 POLI (ÓXIDO DE ETILENO)**

O poli (óxido de etileno) (PEO) é um polímero linear amplamente estudado na ciência dos materiais e biotecnologia devido ao seu comportamento em solução e possibilidade em amplas aplicações. O PEO é um termoplástico semicristalino, biocompatível com células e tecidos, solúvel em água e disponível comercialmente a baixo custo. Este polímero apresenta, em água, uma relação inversa de solubilidade-temperatura. À medida que a temperatura aumenta, o sistema de PEO e água se separa em fases (TALAGHAT, 2010).

O PEO pode ser adicionado a outros polímeros e biocompostos com funções específicas, auxiliando na formação de nanofibras uniformes (SAFI et al. 2007). Este polímero foi utilizado juntamente com biomassa microalgal para o desenvolvimento de nanofibras com aplicação na engenharia de tecidos (MORAIS et al., 2010); com compostos bioativos como ficocianina (FIGUEIRA et al., 2016), com polímeros como quitosana para produção de nanofibras antimicrobianas (Kohsari; Shariatinia; Pourmortazavi, 2016) e com outros polímeros biodegradáveis como PLA (DAI; LIM, 2015). O PEO também é comumente utilizado para superar a dificuldade de emanharamento das cadeias de soluções com proteína para formação de nanofibras (VEGA-LUGO; LIM, 2008; WANG et al., 2013). Além disso, o PEO também é reconhecido como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser aplicado em embalagem de alimentos.

#### 3.4.3 Proteínas

As proteínas têm ganhado atenção devido ao seu potencial de substituição por polímeros de origem petroquímica. As proteínas foram usadas para revestimentos e filmes comestíveis (AHMED et al., 2017), bem como para o desenvolvimento de nanofibras poliméricas com potencial antimicrobiano (WANG et al., 2013). Além disso, o uso de proteínas de microalgas para produzir materiais bioativos é uma estratégia inovadora para explorar novas embalagens para preservação de alimentos (BENELHADJ et al., 2016).

Recentemente, proteínas têm sido estudadas no desenvolvimento de nanofibras utilizando a técnica de *electrospinning*, incluindo, o colágeno e a elastina (AGUIRRE-CHAGALA et al., 2017), o fibrinogênio (WNEK; CARR; SIMPSON; BOWLIN, 2003), a proteína isolada de soja (VEGA-LUGO; LIM, 2008; WANG et al., 2013) e a proteína concentrada (VERDUGO; LIM RUBILAR, 2014). Ao contrário das proteínas fibrosas (colágeno e gelatina), as proteínas globulares (proteína isolada de soja e proteína de microalgas) devem ser desdobradas para que ocorra o emanharamento das cadeias e formação de nanofibras.

A dificuldade com *electrospinning* em solução aquosa de proteína tem sido atribuída às características de polieletrólitos de polipeptídeos, que são capazes de suportar cargas acompanhados por muitos contra-íons, que enfraquecem a densidade de carga requerida para a formação de nanofibras (HUANG et al., 2004).

Um dos métodos mais utilizados para quebrar a estrutura quaternária da proteína é utilizar a combinação de métodos alcalinos e aquecimento. Em pH acima do seu ponto isoelétrico a proteína solubiliza, expondo os grupos hidrofóbicos e sulfidrilo. Estes grupos podem formar ligações hidrofóbicas e dissulfeto, que tem grande impacto sobre a estabilidade da rede de proteína (REMONDETTO; AÑON; GONZALEZ, 2001). Além de métodos alcalinos, a desnaturação em meio ácido também demonstrou a capacidade das proteínas de formar nanofibras por *electrospinning* (VERDUGO; LIM; RUBILAR, 2014).

#### 3.5 MICROALGA Spirulina

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos, incluindo organismos unicelulares e multicelulares, e tanto procariotos quanto eucariotos (LI et al., 2008). Dentre as microalgas, a *Spirulina*, também chamada de *Arthrospira*, é um micro-organismo procarioto, multicelular e filamentoso. Esta microalga tem ganhado destaque na indústria de alimentos devido a sua utilização como suplemento alimentar para humanos e animais, principalmente devido ao alto teor de proteínas em sua composição. A biomassa dessa microalga tem sido utilizada há muitos anos como suplemento dietético por pessoas que vivem próximas de lagos alcalinos onde a microalga é naturalmente encontrada, como por exemplo, no Lago Chade na região de Kanem e do Lago Texcoco no México (CIFERRI; TIBONI, 1985; SOTIROUDIS; SOTIROUDIS, 2013).

A *Spirulina* possui elevadas concentrações de macro e micronutrientes, como proteínas, aminoácidos, ácidos graxos insaturados, minerais e vitaminas. Geralmente, a *Spirulina* consiste em 55-70 % de teor de proteína, 15-25 % de polissacarídeo, 5-6 % de lipídios, 6-13 % ácidos nucleicos e 2,2-4,8 % de minerais (HOSSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI, 2013). Além disso, a biomassa dessa microalga é facilmente digerida devido à ausência de celulose em suas paredes celulares, sendo que após 18 h, mais de 85 % de sua proteína é digerida e assimilada (SASSON, 1997).

Além de sua função nutricional, a *Spirulina* também possui atividade farmacológica devido a compostos bioquímicos de importância comercial como a ficocianina (CHEN et al., 2014; LI et al., 2006; OU et al., 2012; REDDY et al., 2000; SOHEILI; KHOSRAVI-DARANI, 2011). A ficocianina atinge aproximadamente 20 % da proteína total presente na biomassa de

microalgas (VONSHAK, 1997), sendo que sua importância farmacológica e fisiológica é, principalmente, devido as suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória (ROMAY et al., 2003).

As principais vantagens em utilizar microalgas para extração de biocompostos é que esses micro-organismos não competem com culturas alimentares, pois não requerem terras aráveis, além de usar efluentes como nutrientes para seu desenvolvimento. As microalgas crescem mais rapidamente do que as plantas terrestres e, portanto, apresentam uma maior taxa de fixação de CO<sub>2</sub> (CHEN et al., 2011). Além disso, a composição bioquímica das microalgas pode ser manipulada por mudanças em condições de crescimento e estresses ambientais. Assim, essas micro-organismos podem ser induzidas a produzir altas concentrações de biocompostos comercialmente importantes (GOIRIS et al., 2015; HU et al., 2008).

#### **3.6 FICOCIANINA**

A ficocianina é um pigmento fotossintético acessório caracterizado pela sua intensa coloração azul (PATEL, et al., 2005), conhecida pelas suas propriedades antioxidante, antiinflamatórias e antitumoral (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014; HUSSEIN; ALI; AHMED, 2015; KOTHADIA et al., 2011; SAINI; SANYAL, 2014). A ficocianina é extraída, principalmente, a partir da microalga Spirulina 2012; FERNÁNDEZ-ROJAS; CHIRASUWAN: BUNNAG. (CHAIKLAHAN; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014; MARTELLI et al., 2014), podendo também ser encontrada em outras microalgas tais como Calothrix sp. (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004), Oscillatoria quadripunctulata (SONI et al., 2006) e Phormidium fragile (SONI; TRIVEDI; MADAMWAR, 2008). Em células de Spirulina é encontrado até 14 % deste pigmento no conteúdo proteico da biomassa (EARTHRISE, 2017), que é localizado no sistema de tilacoide ou lamelas fotossintéticas na membrana citoplasmática (DUANGSEE; PHOOPAT; NINGSANOND, 2009).

A ficocianina é composta por uma apoproteína e um componente não protéico conhecido como ficocianobilina, que é um cromóforo. A ficocianobilina é um tetrapirrólico de cadeia aberta responsável pela coloração azul da ficocianina. A apoproteína é ligada a uma ficocianobilina por ligação tioéter e a porção de proteína é constituída por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de pesos moleculares na faixa de 18 e 20 kDa. O espectro de absorção da ficocianina, monômero e todos os agregados, exibem uma forte primeira banda em estado excitado em aproximadamente 615 nm e uma segunda banda mais fraca em aproximadamente 360 nm (MACCOLL, 1998).

A conformação de estrutura de ficocianina (Figura 5) é afetada pelo pH. O ponto isoelétrico da ficocianina varia entre 4,1 e 6,4, dependendo da fonte de algas e os métodos utilizados para a extração e purificação (CHEN; WONG, 2008; SILVEIRA et al., 2007). Segundo Chaiklahan, Chirasuwan e Bunnag (2012) a estabilidade máxima do pigmento encontra-se na faixa de pH 5,5-6,0. Para Duangsee, Phoopat e Ningsanond (2009), o pigmento pode manter a estrutura nativa em pH> 5 e também verificaram que o calor exibe efeito fortemente prejudicial sobre a cor da solução da ficocianina a pH> 5,0 e pH <3.

Figura 5 - Estrutura química da ficocianina.



Fonte: HOSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI (2013).

A temperatura também desempenha papel importante na estabilidade da ficocianina. Quanto maior a temperatura de trabalho menor será o pH ao qual o extrato aquoso de ficocianina será mais estável. Isso demonstra que a temperatura de degradação e pH são inversamente proporcionais em relação à degradação (ANTELO; COSTA; KALILL, 2008). Sekar e Chandramohan (2008) relataram que a ficocianina foi estável em intervalo de pH 5,0 a 7,5 a 9 °C, enquanto que temperaturas superiores a 40 °C levou a instabilidade do pigmento. Para Chaiklahan, Chirasuwan e Bunnag (2012), a maior estabilidade da solução de ficocianina foi observada a pH 6,0. Além disso, a ficocianina precipitou em pH 5,0 e 6,0, após incubação a 59 °C durante 15 min, resultando em perda da coloração azul. A solução de ficocianina a pH 7,0 mostrou precipitação após incubação a 64 °C durante 30 min.

Com relação a aplicação comercial da ficocianina, este pigmento é utilizado como corante natural em alimentos. No entanto, a ficocianina é instável ao calor, e, por isso, seu potencial para aplicação em produtos alimentícios, que necessitam de tratamento térmico, é restrito. A ficocianina também é sensível a luz, assim sua instabilidade resulta em precipitação e descoloração (MARTELLI et al., 2014). A descoloração de ficocianina, considerado recentemente como problema para a indústria de alimentos, pode ser interessante para aplicação em embalagens inteligentes através da nanotecnologia. Indicadores de pH, temperatura e/ou luz podem ser desenvolvidos para serem aplicados em embalagens de alimentos, uma vez que a

estabilidade e, consequentemente, a coloração da ficocianina é reduzida dependendo das condições destes parâmetros.

# 3.7 NANOFIBRAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM EMBALAGEM DE ALIMENTOS

#### 3.7.1 Ação antimicrobiana

A necessidade por desenvolvimento de embalagens inovadoras tem sido impulsionada para preservação de alimentos visando, principalmente, o aumento da vida útil do produto. Assim, embalagens podem ser desenvolvidas com incorporação de nanopartículas inorgânicas (cobre - Cu e prata - Ag) à matriz polimérica (CIOFFI et al., 2005; MONTEIRO et al., 2009). Bikiaris e Triantafyllidis (2013) desenvolveram nanocompósitos de polietileno de alta densidade (HDPE) contendo nanofibras de Cu em diferentes concentrações (0,5; 1; 2,5 e 5,0 %). O trabalho demonstrou que a incorporação de 2,5 e 5,0 % apresentou melhoria na resistência à tração, barreira ao oxigênio e propriedades antibacterianas. Estas melhorias foram atribuídas ao pequeno tamanho das nanofibras de Cu e a sua dispersão fina na matriz de HDPE.

Nanofibras à base de quitosana com nanopartículas de prata (AgNPs) foram desenvolvidas e mostraram pronunciada atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (LIU et al., 2015). De acordo com Xiu et al. (2012) AgNPs leva à morte da célula bacteriana por interacção com as proteínas que contém enxofre na membrana e liberar Ag <sup>+</sup> para atacar a cadeia respiratória.

A atividade antimicrobiana de peptídeos antimicrobianos (PAMs) pode ser significativamente reduzida quando expostos diretamente a proteínas, enzimas, lipídios e produtos químicos (TAYLOR et al., 2007). Assim, a fim de manter a atividade antimicrobiana de PAMs, têm sido estudado a incorporação destes em nanofibras. Wang et al. (2015) incorporaram Pleurocidin (PLE) em nanofibras de poli (álcool vinílico) a fim de preservar a bioatividade desse composto. Os estudos *in vitro* mostraram que a fibra com a incorporação de PLE apresentou potencial para inibir patógenos de origem alimentar (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e prolongar a vida útil dos alimentos.

Wang et al. (2013) desenvolveram nanofibras de proteína isolada de soja com óxido de polietileno (PEO) contendo antocianina extraída de framboesa e observaram que os nanomateriais apresentaram atividade antibacteriana para *Staphylococcus epidermidis*. Desta forma, os autores sugeriram que as nanofibras produzidas poderiam ser usadas como conservante natural de alimentos para inibir o crescimento microbiano e/ou a oxidação.

#### 3.7.2 Barreiras à O2 e permeabilidade ao vapor de água

Muitos alimentos são embalados em atmosfera modificada (MAP), com redução de teor de O<sub>2</sub> para aumentar a vida útil dos produtos (ROBERTSON, 2006). Entretanto, um dos desafios enfrentados na MAP é que o nível de O<sub>2</sub> pode variar durante o armazenamento do produto devido à permeação desse gás por meio do material da embalagem (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014). Os indicadores de O<sub>2</sub>, por meio de nanofibras poliméricas vem sendo estudados. Moomand e Lim (2014) estudaram fibras de zeína incorporadas com óleo de peixe, desenvolvidas por *electrospinning*. Os autores observaram que as nanofibras de zeína contribuíram para a redução das taxas de oxidação e permeação O<sub>2</sub> para dentro da fibra. Mihindukulasuriya e Lim (2014) desenvolveram indicador de O<sub>2</sub> ativado por UV usando *electrospinning* e dióxido de titânio. O estudo mostrou que o desempenho do indicador pode ser reforçado com nanofibras devido à grande proporção superfície/volume do material fibroso que é favorável para aumentar a formação de elétrons excitados pela irradiação UV.

Em embalagens de alimentos, muitas vezes é necessário diminuir ou evitar a transferência de umidade com a atmosfera. Neste contexto, Salaberria et al. (2015) constataram que a adição de 5 e 10 % (m/m) de nanofibras de quitina (CTNs) na matriz de amido termoplástico reduziu os valores de taxa de transmissão de água (WVTR). Entretanto, quando incorporado 20 % de CTNs a WVTR aumentou consideravelmente. Fabra et al. (2013) desenvolveram estruturas de multicamadas com base em poli-hidroxibutirato-co-valerato com teor de valerato de 12 % que continha intercamada de nanofibras de zeína. Os autores observaram que as nanofibras de zeína contribuíram na redução da permeabilidade ao vapor de água.

Revestimentos nanoestruturados à base de óxido de metal em embalagens podem contribuir com suas propriedades de barreira. Sensores de umidade são projetados a partir de óxidos de metais (SnO<sub>2</sub>, NiO, ZnO, WO<sub>3</sub> ou In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), polímeros e compósitos (KIM et al., 2015; PARTHIBAVARMAN; HARIHARAN; SEKAR, 2011; PASCARIU et al., 2016). Segundo Pascariu et al. (2016) nanofibras de NiO–SnO<sub>2</sub> foram excelentes sensores de umidade. De acordo com os autores a superfície destas nanofibras aumenta a condução na presença de vapor de água e isso reflete na sensibilidade à umidade das nanoestruturas NiO-SnO<sub>2</sub>.

#### 3.7.3 Preservação de compostos bioativos

A indústria de alimentos tem mostrado interesse em nanofibras desenvolvidas por meio da técnica de *electrospinning*, com a utilização de biopolímeros, para encapsulamento de ingredientes alimentícios e manter a viabilidade e estabilidade de bactérias probióticas e bacteriocinas durante o processamento e armazenamento de alimentos (REZAEI; NASIRPOUR; FATHI, 2015).

Lopez-Rubio e Lagaron (2012) mostraram a viabilidade da utilização de *electrospinning* para aplicações em alimentos funcionais encapsulando estirpes de *Bifidobacterium* em proteina concentrada de soro de leite (WPC) e carboidrato (*pullulan*). O encapsulamento em WPC demonstrou maior capacidade de proteção que em *pullulan*, prolongando a sobrevivência das células, mesmo em altas umidades relativas.

A utilização de WPC e de proteina isolada do soro de leite também foi demonstrada através do encapsulamento de  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -lactoglobulina (LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2012; SULLIVAN et al, 2014). Outro estudo realizado para preservação de antioxidantes foi realizado por Peinado et al. (2016), no qual incorporaram  $\beta$ -caroteno em nanofibras de PEO com o objetivo de prolongar a vida de prateleira e estabilidade térmica do antioxidante.

Figueira et al. (2016) desenvolveram nanofibras bioativas de PEO com incorporação de ficocianina (3 %, m.v<sup>-1</sup>) e a adição de NaCl (1 %, m.v<sup>-1</sup>), com diâmetro médio de 295 nm. Segundo Moreno et al. (2011), as nanofibras fornecem uma alternativa para a liberação de proteínas para aplicações terapêuticas e engenharia de tecidos devido à sua grande área de superfície que aumenta a área de contato entre a proteína encapsulada e o meio de liberação. Além disso, para Kai, Liow e Loh, a porosidade das nanofibras facilitam o carregamento de moléculas ativas e transporte de nutrientes.

Em outro estudo com ficocianina foi comprovado que o encapsulamento por nanofibras contribui com a estabilidade deste pigmento. Braga et al. (2016) avaliaram a influência dos conservantes de ficocianina (glicose, sorbitol e nanofibras) e descobriram que a *half-life* mais alta da ficocianina foi obtida quando a glicose foi adicionada a uma solução de ficocianina ultrafiltrada, seguida da adição de sorbitol e nanofibras, apresentando aumento de 86, 71 e 66 %, respectivamente, quando comparado ao extrato inicial. Segundo esses autores, os valores de *half-life* obtidos após esses tratamentos são muito similares. Portanto, as nanofibras podem ser uma excelente estratégia para aumentar a estabilidade térmica da ficocianina.

#### 3.7.4 Indicadores de pH

Indicadores de pH vêm sendo estudados abrangendo diversas áreas. Dentre estas destacam-se aplicações na engenharia de tecidos (RAZAQ et al., 2003; SCHWARTZ et al., 1976; WALDMAN et al., 2004), estudos microbiológicos (NAKAO et al., 1996), filtração de água, estudando mudança do pH em processos biológicos (MASUDA et al., 2009). Na área de nanotecnologia os indicadores foram aplicados a embalagens inteligentes de alimentos e bebidas (TASSANAWAT et al., 2007) e na área têxtil (SCHUEREN et al., 2010).

Geralmente, o indicador de pH é um composto químico halocrômico que faz com que a cor da solução altere, dependendo do valor de pH. Neste contexto, as nanofibras surgem como alternativas para sensores de pH. Schueren et al. (2010) mostraram que os indicadores de pH não afetam a formação de fibras a partir de *electrospinning* e o comportamento halocrômico de corantes não é alterado nesse processo. No entanto, cada corante é útil apenas para uma gama limitada de valores de pH. Portanto, é importante identificar o corante ou escolher uma combinação correta, a fim de que possam apresentar a mudança de cor para o intervalo de pH desejado (Agarwal et al., 2012).

Agarwal et al. (2012) incorporaram cinco diferentes indicadores em nanofibras, e constataram que corantes com diferentes combinações não afetam a morfologia das fibras, nem o comportamento halocrômico dos corantes. Além disso, o sensor de pH desenvolvido com nanofibras foi estável em ampla faixa de temperatura (100 °C e -70 °C) e umidade. Quando incubadas durante 6 meses em temperatura ambiente, as nanofibras não apresentaram alterações em suas propriedades, comprovando a estabilidade do sensor por longo período. Devarayan e Kim (2015) também desenvolveram sensor de nanofibras com a incorporação de pigmento natural capaz de detectar valores de pH na faixa de 1-14. Também foi verificado que o sensor manteve-se estável a diferentes temperaturas por tempo prolongado.

Devido ao seu pequeno diâmetro, as estruturas nanofibrosas apresentam características únicas, tais como tamanhos de poros reduzidos, alta porosidade e elevadas área de superfície e capacidade de absorção (GREINER; WENDORFF, 2007; MUZZARELLI, 2012). Estas características tornam as nanofibras materiais adequados para serem utilizados como sensores de pH. Além disso, uma estrutura nanofibrosa pode aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo de resposta do sensor. Neste contexto, Schueren et al. (2013) estudaram o desempenho da resposta do sensor desenvolvido a partir de nanofibras de policaprolactona (PCL) e blenda de PCL/quitosana, ambos adicionados do corante amarelo de nitrazina. Segundo os autores, o uso da blenda PCL/quitosana para desenvolvimento de sensores de nanofibras

sensíveis ao pH foi fundamental. Ao contrário da resposta lenta das nanofibras de PCL (mais de 3 h), o uso da blenda PCL/quitosana levou a uma maior sensibilidade e redução significativa do tempo de resposta (5 min) do sensor de pH.

Os sensores de pH também podem ser utilizados para monitoramento da qualidade da água. O controle das contaminações de água é crucial em áreas onde o acesso a água potável é limitado e suas instalações de processamento estão fora de alcance (YANG et al., 2012). Os sistemas de detecção baseados em sensores potenciométricos de luz endereçável podem ser aplicados para detectar células bacterianas quando ocorre alteração do pH no meio (TU et al., 2000). Shaibani et al. (2016) desenvolveram sensor potenciométrico a base de nanofíbras de hidrogel de ácido poli (acrílico)/álcool polivinílico (PAA/PVA). Após 60 min, os autores constataram alteração do pH do meio para todas as concentrações de *Escherichia coli* testadas com as nanofíbras. A alta sensibilidade para *E. coli*, com um limite teórico de detecção de 20 UFC/mL, está associada ao comportamento sensível das nanofíbras ao pH. Assim, a detecção de espécies ácidas liberadas no metabolismo celular de agentes patogênicos na presença de fonte de carbono diminui os custos do mecanismo de detecção, além de torná-lo menos demorado e mais prático que a abordagem baseada na interação anticorpo-antígeno.

Com o intuito de aplicação em embalagens de alimentos, Prietto et al. (2017) desenvolveram filmes como indicadores de pH com base em amido de milho e antocianinas extraídas de feijão preto e repolho roxo. O estudo demonstrou que os filmes são adequados para monitorar a qualidade de alimentos refrigerados, quando a degradação causa variação no pH. Além disso, os filmes sensíveis ao pH com antocianinas de repolho roxo apresentaram maior potencial para o desenvolvimento de embalagens inteligentes, devido à maior estabilidade durante o armazenamento e maior variação de cor entre os valores de pH.

# 3.8 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA "ENGENHARIA DE NANOFIBRAS"

A linha de pesquisa "Engenharia de Nanofibras" visa o desenvolvimento de nanofibras pelo método de *electrospinning* a partir de diferentes polímeros e incorporação de compostos ativos para aplicação na área de Alimentos. Essa linha de pesquisa foi iniciada em 2007 no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB). Em 2014, foi criado o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica (MIBI), o qual deu seguimento ao tema de estudo.

Em 2007-2008, o projeto "Matrizes de nanofibras biodegradáveis para célulastronco no tratamento de lesão de medula espinhal" foi desenvolvido, no qual foi estudado a extração de biopolímeros da biomassa microalgal, utilizando diferentes métodos, e desenvolvimento de nanofibras, pelo método de *electrospinning*, utilizando o polímero obtido. No período de 2009-2011 o projeto intitulado "Uso de nanotecnologia na bioengenharia" teve como objetivo utilizar a nanotecnologia na bioengenharia para produzir pele, através do cultivo de células-tronco em matrizes produzidas por *electrospinning* e desenvolvimento de novas fontes de polímeros para produção de *scaffolds* de nanofibras a partir de alga brasileira. No mesmo período, outro projeto "Desenvolvimento de nanofibras para produtos aplicados na Engenharia de Alimentos" foi aprovado, onde foram estudadas as condições do processo de *electrospinning* para desenvolvimento de nanofibras, bem como a caracterização das nanofibras formadas.

Em 2011 no projeto " Bionanotecnologia microalgal: Desenvolvimento de nanomateriais a partir de biopolímeros e compostos bioativos sintetizados por microalgas" foram desenvolvidas nanofibras e nanocápsulas com biopolímeros e compostos ativos extraídos da microalga *Spirulina*. Atualmente, desde 2015 está em vigência o projeto intitulado "Desenvolvimento de embalagens biodegradáveis produzidas a partir de nanofibras".

Desde 2010 foram 4 patentes depositadas, 14 artigos publicados e 1 capítulo de livro (*Elsevier*) na área de nanofibras poliméricas para aplicação em embalagens de alimentos. No total, foram defendidas 3 dissertação de mestrado e 4 TCCs (trabalho de conclusão de curso) do curso de Engenharia Bioquímica. Além disso, em 2014 tiveram 2 teses de doutorado concluídas com parte do seu estudo relacionado a área de nanofibras.

Desde 2015 o MIBI tem parceria com Laboratório de Pós-Colheita, Industrialização e qualidade de Grãos da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), com o projeto intitulado "Produção e caracterização de nanofibras pelo método de *electrospinning* e aplicação no encapsulamento de peptídeos e embalagens inteligentes", sendo desenvolvido trabalhos em ambas universidades e na Universidade de Guelph, no Canadá.

Atualmente, no MIBI é estudado o desenvolvimento nanofibras para aplicação como membranas filtrantes, embalagens ativas e inteligentes, e adsorvedores de gases, totalizando, em andamento, 4 teses de doutorado e 1 dissertação de mestrado. O MIBI conta com uma equipe em torno de 20 integrantes, entre professores, estudantes de graduação, mestrado, doutorado e 1 técnico de laboratório.

CAPÍTULO III

#### DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O trabalho foi realizado em três etapas, em que a partir de cada uma foi gerado um artigo que será submetido para publicação em periódico qualificado de circulação internacional, de acordo com o QUALIS. O artigo 1 encontra-se em processo de revisão na *Journal of Food Engineering*.

As duas primeiras etapas foram realizadas na Universidade de Guelph, por meio do projeto intitulado "Produção e caracterização de nanofíbras pelo método de *electrospining* e aplicação no encapsulamento de peptídeos e embalagens inteligentes", no período em que foi realizado o Doutorado Sanduíche, no Canadá. No Canadá, o trabalho foi supervisionado pelo Prof. Dr. Loong-Tak Lim, no qual foi estudado a utilização da proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 para o desenvolvimento de nanofíbras. Nesse período foi avaliado o efeito do aquecimento de biopolímeros em soluções ácida e alcalina para o processo de *electrospinning*. Em um segundo momento, foi adicionado a ficocianina às nanofíbras de proteína de *Spirulina* sp. LEB 18, com o intuito de desenvolver nanofíbras foram produzidas utilizado o equipamento *Nanospider*. Este equipamento é utilizado para produção de nanofíbras em maior escala. A última etapa, realizada no Brasil, foi estudar o desenvolvimento de um indicador de pH a partir de nanofíbras de PLA/PEO contendo ficocianina para aplicação como etiqueta em embalagem inteligente de alimentos.

Diante do exposto, os artigos desenvolvidos na tese de doutorado foram:

# **ARTIGO 1:** AQUECIMENTO DA PROTEÍNA DE MICROALGA EM SOLUÇÃO ÁCIDA E BÁSICA PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS

# **ARTIGO 2:** NANOFIBRAS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE DESENVOLVIDO A PARTIR DE FICOCIANINA E PROTEÍNA MICROALGAL

**ARTIGO 3:** INDICADOR DE pH DESENVOLVIDO A PARTIR DE NANOFIBRAS PLA/PEO E FICOCIANINA

ARTIGO 1

# AQUECIMENTO DA PROTEÍNA DE MICROALGA EM SOLUÇÃO ÁCIDA E BÁSICA PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS

#### Aquecimento da proteína de microalga em solução ácida e básica para produção de

#### nanofibras

#### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do aquecimento de biopolímeros em soluções alcalinas e ácidas na formação de nanofibras utilizando proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 para potencial aplicação na área de embalagens de alimentos. Com a maior concentração de proteína o diâmetro médio das nanofibras foi de aproximadamente 450 nm. Para as nanofibras desenvolvidas com 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada, os picos no espectro FTIR foram observados a 1641 cm<sup>-1</sup> (amida I) e 1533 cm<sup>-1</sup> (amida II). Além disso, o incremento da concentração de proteína de 5 para 10 % (m.m<sup>-1</sup>) aumentou a temperatura inicial de degradação das nanofibras em 34 ° C, quando o poli (óxido de etileno) (PEO) foi adicionado após o aquecimento da solução. A possibilidade de formação de nanofibras uniformes utilizando a solução ácida com baixa concentração de PEO (0,8 %, m.m<sup>-1</sup>) mostra o potencial da proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB para a produção desses materiais.

**Palavras-chave:** Biomassa microalgal. Desnaturação. *Electrospinning*. Poli (óxido de etileno).

Spirulina.

#### Microalgae protein heating in acid/basic solution for nanofibers production

#### ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of the biopolymers heating in alkaline and acidic solutions in the formation of nanofibers using protein concentrate from *Spirulina* sp. LEB 18 for potential application in food packaging field. With the highest protein concentration, the mean diameter of nanofibers was approximately 450 nm. For nanofibers developed with 5 % (w.w<sup>-1</sup>) of protein concentrate, the peaks in FTIR spectra were observed at 1641 cm<sup>-1</sup> (amide I) and 1533 cm<sup>-1</sup> (amide II). Moreover, the increasing of protein concentration of 5 to 10 % (w.w<sup>-1</sup>) enhanced the initial temperature of degradation of the nanofibers at 34 °C, when the poly (ethylene oxide) (PEO) was added after solution heating. The possibility of formation of uniforms nanofibers using the acidic solution with a low concentration of PEO (0.8 %, w.w<sup>-1</sup>) shows the potential of the protein concentrate from *Spirulina* sp. LEB for the production of these materials.

**Keywords:** Microalgae biomass. Denaturation. Electrospinning. Poly (ethylene oxide). *Spirulina*.

#### 1 INTRODUÇÃO

A preocupação com o meio ambiente e a escassez de petróleo estão direcionando as pesquisas para o desenvolvimento de nanofibras a partir de polímeros que sejam biodegradáveis, renováveis e compatíveis com os polímeros sintéticos. Neste contexto, proteínas ganharam atenção devido ao seu potencial para substituição aos polímeros de origem petroquímica. As proteínas podem ser utilizadas para revestimentos e filmes comestíveis (AHMED et al., 2017), assim como para o desenvolvimento de nanofibras poliméricas (GUO et al., 2015; WANG et al., 2013) com potencial antimicrobiano (WANG et al., 2013). Além disso, a utilização de proteínas de microalga para produzir materiais bioativos é estratégia inovadora para explorar novas embalagens para preservação de alimentos (BENELHADJ et al., 2016).

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes que possuem capacidade de se desenvolver em ambientes diversos (LARKUM et al., 2012). As vantagens do uso de microalgas para extração de proteínas abrangem uma série de fatores. A principal vantagem é que esses micro-organismos podem ser cultivados com efluentes industriais, reduzindo as emissões de gases poluentes; apresentam elevadas taxas de crescimento; não competem com culturas alimentares, pois não necessitam de terras aráveis e exigem menos água (BAICHA et al., 2016; MEIXNER et al., 2016).

A microalga *Spirulina* é amplamente conhecida devido ao elevado teor de proteínas constituído em sua biomassa (65-80 %, m.m<sup>-1</sup>) (MORAIS et al., 2009; MOREIRA et al., 2016). A biomassa de *Spirulina* e seu biopolímero polihidroxibutirato foram utilizados para produção de nanofibras com potencial aplicação na engenharia de tecidos (MORAIS et al., 2015b). No entanto, não há estudos na literatura com a proteína de *Spirulina* para o desenvolvimento de nanofibras.

Nanofibras poliméricas à base de proteína destinam-se, principalmente, a produção de componentes pequenos, como etiquetas ou adesivos para embalagem com função inteligente ou ativa (AHMED et al., 2017; BOWLES; LU, 2014). Potencialmente, a nanofibra também pode ser aplicada na superfície da estrutura de empacotamento, como papel ou papelão.

*Nanospider* é uma metodologia modificada do processo de *electrospinning*, empregada para produção comercial de nanofibras. Uma vez que a biomassa de *Spirulina* apresenta elevado teor de proteínas, a utilização deste biopolímero aplicado à tecnologia *Nanospider* pode facilitar o aumento de escala de nanofibras para potencial aplicação em embalagens de alimentos. No entanto, a proteína microalgal deve ser desnaturada para que ocorra o emanharamento das cadeias e formação de nanofibras. Assim, um dos métodos mais utilizados para alterar a estrutura quaternária da proteína é utilizar a combinação de métodos alcalinos e aquecimento. Em pH acima do seu ponto isoelétrico a proteína solubiliza, expondo os grupos hidrofóbicos e sulfidrilo. Estes grupos podem formar ligações hidrofóbicas e dissulfeto, que possuem grande impacto sobre a estabilidade da rede proteica (REMONDETTO; AÑON; GONZALEZ, 2001).

O óxido de polietileno (PEO) é um polímero amplamente estudado na ciência dos materiais e biotecnologia devido ao seu comportamento em solução e possibilidade em amplas aplicações. O PEO é um termoplástico semicristalino, biocompatível, solúvel em água e disponível comercialmente em baixo custo. Além disso, o PEO é comumente utilizado para superar a dificuldade de emanharamento das cadeias de soluções com proteína para formação de nanofibras (VEGA-LUGO; LIM, 2008; WANG et al., 2013).

Os estudos relativos a soluções proteicas contendo blenda de polímeros em condições ácidas ou alcalinas para produção de nanofibras por *electrospinning* são conduzidos realizando o aquecimento de ambos os polímeros juntos. Outro diferencial deste estudo é que se investigou também a adição de biopolímero após a desnaturação proteica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do aquecimento de biopolímeros em solução alcalina e ácida na formação de nanofibras utilizando proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 para potencial aplicação em embalagens de alimentos.

#### 2 MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 MICROALGA E PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA

A microalga utilizada neste estudo foi a *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira, no sul do Brasil. A biomassa da microalga foi submetida a operações de secagem (50 °C durante 4 h), moagem em moinho de bolas (Modelo Q298, Quimis, Brasil) e embalada a vácuo (Supervac400, Suplack, Brasil). A biomassa com umidade de 5,3 % (m.m<sup>-1</sup>) foi armazenada no escuro a 4 °C (MORAIS et al., 2009).

## 2.2 EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA CONCENTRADA DE Spirulina sp. LEB 18

A extração da proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 foi realizada de acordo com Verdugo, Lim e Rubilar (2014), com algumas modificações. A proteína concentrada da microalga foi extraída por dissolução da biomassa em pH 12 a 40 °C e 150 rpm (durante 1 e 2 h), seguido de centrifugação a 10.000 x g durante 15 min a 25 °C, no qual foi recolhido o

sobrenadante. O precipitado foi dissolvido novamente em pH 12 e centrifugado (10.000 x g durante 15 min a 25 °C), a partir do qual foi recolhido novamente o sobrenadante. Ambos os sobrenadantes foram ajustados em pH 4 para precipitar a proteína. O sedimento foi recuperado por centrifugação a 10.000 x g durante 15 min a 25 °C e dialisado em água Mili-Q por 3 d a 4 °C utilizando membrana de celulose (MWCO 6000-8000, Spectra/Pore, Spectrum Laboratories, Inc., EUA).

O concentrado proteico foi liofilizado e o teor da proteína concentrada e da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram determinados pelo método de Dumas (FP528, Leco, EUA), utilizando fator de conversão de 6,25 (AOAC, 2000).

# 2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS E PARÂMETROS DO *ELECTROSPINNING*

Experimentos com proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 (5 e 10 %, m.m<sup>-</sup>) e 0,8 % (m.m<sup>-1</sup>) de PEO (peso molecular 900.000 da) (Sigma Aldrich, Canadá) foram realizados para o desenvolvimento das nanofibras. Ensaios em solução NaOH (1 %, m.v<sup>-1</sup>) e ácido acético:água (3:1) foram conduzidos, a fim de se obter soluções alcalina e ácida, respectivamente (VEGA-LUGO; LIM, 2008; VERDUGO; LIM; RUBILAR, 2014). Dois modos de preparo das soluções foram estudados. No primeiro, a proteína e PEO foram aquecidos em conjunto a  $67 \pm 3$  °C durante 1 h. Em seguida, esta solução foi agitada durante 12 h à temperatura ambiente para a dissolução completa da proteína. No segundo, apenas a proteína foi aquecida para desnaturação ( $67 \pm 3$  °C durante 1 h). Após o resfriamento, o PEO em pó foi adicionado na solução de proteína, sob agitação durante 12 h à temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  °C).

Os parâmetros no processo de *electrospinning* utilizados foram potencial elétrico de 50 kV, velocidade de transporte da solução polimérica pelo fio condutor de 100 mm.s<sup>-1</sup>, diâmetro do orifício 0,6 mm e distância do coletor ao fio condutor de 15 cm. O equipamento utilizado foi *Nanospider* (NS lab, Elmarco, USA) (Figura 1).



Figura 1 – Nanospider utilizado para produção de nanofibras.

# 2.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

A condutividade das soluções foi medida utilizando condutivímetro (Accumet XL20, Fisher Scientific, Canadá).

# 2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As nanofibras desenvolvidas foram revestidas com ouro (20 nm) utilizando revestidor por crepitação (Modelo K550, Emitech, Reino Unido). A morfologia das nanofibras foi obtida utilizando microscópio eletrônico de varredura (S-570, Hitachi High Technologies Corporation, Japão) com voltagem de aceleração de 10 kV. O diâmetro médio da nanofibra foi determinado a partir das imagens de MEV, com 50 medidas utilizando software de processamento de imagem (Image Pro-Plus 5.1, Media Cybernetics Inc., USA).

## 2.6 DETERMINAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NANOFIBRAS

Todas as nanofibras, aglomerados e esferas obtidas na micrografia foram utilizadas para estimar o índice de morfologia para cada experimento (RODRIGO; TORO; CUELLAR, 2012). Cada micrografia foi dividida em 20 porções. Pontuações para gotas e aglomerações foram atribuídas para cada porção da micrografia. Se pelo menos uma esfera, gota ou aglomeração estiverem presentes foi atribuído um ponto (1). Caso contrário, foi atribuído zero (0). O índice de morfologia foi calculado utilizando a Eq. (1).

Índice de Morfologia = 1 - 
$$\frac{N^{\circ}gotas + N^{\circ}aglomerações + N^{\circ}esferas}{N^{\circ}características x N^{\circ}porções}$$
(1)

Em que: N°<sub>gotas</sub> é o número de porções com característica de gotas, N°<sub>aglomerações</sub> é o número de porções na micrografia com presença de aglomerações e N°<sub>esferas</sub> corresponde ao número de porções com esferas. N°<sub>características</sub> é 3 e N°<sub>porções</sub> é 20.

# 2.7 ESPECTROSCOPIA NO *INFRAVERMELHO* POR TRANSFORMADA DE *FOURIER* (FTIR)

As nanofibras e a proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 foram avaliadas em espectrômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (IR Prestige-21, Shimadzu Corp., Japão), com refletância total atenuada (ATR). Varreduras na faixa espectral de 650 a 4000 cm<sup>-1</sup> foram realizadas e recolhidas 32 leituras com resolução de 8 cm<sup>-1</sup>. Os dados foram analisados usando Origin software (OrginLab, USA).

# 2.8 ESTABILIDADE TÉRMICA

A medida da estabilidade térmica do PEO, proteína e nanofibras foi realizada em analisador termogravimétrico (Shimadzu, DTG-60, Japão) de acordo com a metodologia ASTM D3850-12. As análises foram conduzidas a temperatura ambiente até 500 °C, em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo 30 mL min<sup>-1</sup> e taxa de aquecimento constante de 10 °C min<sup>-1</sup>.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

# 3.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DE Spirulina sp. LEB 18

O tempo de solubilização da proteína não influenciou no conteúdo proteico concentrado na biomassa. Assim, foi definido 1 h para posterior extração da proteína para o desenvolvimento das nanofibras. Os teores de proteína obtidos na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e no concentrado proteíco da biomassa foram 65,2 e 80,7 % (m.m<sup>-1</sup>), respectivamente.

# 3.2 EFEITO DO AQUECIMENTO DOS BIOPOLÍMEROS E SOLUÇÕES POLIMÉRICAS NA MORFOLOGIA E DIÂMETRO DAS NANOFIBRAS

Nanofibras com solução de proteína (5 e 10 %, m.m<sup>-1</sup>) não foram obtidas sem adição de PEO. Ao contrário das proteínas fibrosas (colágeno e gelatina), as proteinas globulares

devem ser desdobradas para que ocorra o emanharamento das cadeias e formação de nanofibras. A dificuldade com *electrospinning* em solução aquosa de proteína tem sido atribuída às características de polieletrólitos de polipeptídeos, que são capazes de suportar cargas acompanhados por muitos contra-íons, que enfraquecem a densidade de carga requerida para a formação de nanofibras (HUANG et al., 2004).

Para realizar o desdobramento da proteína métodos alcalinos e aquecimento tem sido aplicados. No entanto, a solução polimérica alcalina com 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína de *Spirulina* sp. LEB 18 e 0,8 % (m.m<sup>-1</sup>) de PEO resultou em gotas (Figura 2a). Entretanto, as gotas foram reduzidas ao utilizar o aquecimento do polímero (Figura 2b).

Quando o PEO foi adicionado após a desnaturação da proteína em meio alcalino, fibras não foram formadas devido a falta de emanharamento das cadeias do PEO com as da proteína de *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 2c). Além disso, a maior concentração de proteína (10 %, m.m<sup>-1</sup>) em solução alcalina teve influência na solubilização da proteína. A dificuldade de solubilização, de certa forma, também pode justificar o aumento na predominância de gotas e obtenção de partículas esféricas. O efeito do aquecimento do PEO na morfologia não foi observada nessa concentração de 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína (Figura 2d).

**Figura 2** - Nanofibras desenvolvidas em solução alcalina com 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 sem (a) e com aquecimento de PEO (b); e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 sem (c) e com aquecimento de PEO (d).



A formação de gotas também foi observada em outros estudos com a utilização de soluções poliméricas com proteínas (VEGA-LUGO; LIM, 2008; WANG et al., 2013). Para minimizar a presença de gotas nas nanofibras pode-se alterar a densidade da carga da solução polimérica. A condutividade pode ser reduzida ao utilizar solução ácida (ácido acético: água - 3:1, respectivamente) (Tabela 1), proporcionando a formação de fibras mais lisas, finas e longas, com ocorrência mínima de gotas e aglomerados (Figura 3).

**Figura 3** - Nanofibras desenvolvidas em solução ácida com 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 sem (a) e com aquecimento de PEO (b); e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 sem (c) e com aquecimento de PEO (d).



De acordo com Verdugo, Lim e Rubilar (2014), a condutividade reduzida pode ocasionar decréscimo da densidade de carga na superfície de jato do polímero durante o processo de *electrospinning*. A solução deve possuir condutividade elétrica que estabeleça a repulsão de carga (força de repulsão) para superar a tensão superficial da gota para formar a fibra. As soluções de polímero, tais como proteína são altamente condutoras e dificultam a formação de nanofibras por *electrospinning*.

Ensaio	Proteína	Tipo de	Preparo da solução	Condutividade	Índice de	Diâmetro médio (nm)
	(%, m.m <sup>-1</sup> )	solução		(mS/cm)	morfologia	
1	5	Alcalina	Proteína + PEO aquecidos	3,64 ± 0,01	0,48	81 ± 20
2	5	Alcalina	Proteína aquecida	-	-	-
3	5	Ácida	Proteína + PEO aquecidos	$1,65 \pm 0,01$	0,84	$118 \pm 27$
4	5	Ácida	Proteína aquecida	$1,56 \pm 0,01$	0,67	$202\pm56$
5	10	Alcalina	Proteína + PEO aquecidos	-	-	-
6	10	Alcalina	Proteína aquecida	-	-	-
7	10	Ácida	Proteína + PEO aquecidos	$0,77 \pm 0,00$	1,00	$452 \pm 102$
8	10	Ácida	Proteína aquecida	$0,72\pm0,00$	0,98	$390\pm88$

 Tabela 1 - Características das soluções poliméricas e nanofibras desenvolvidas com proteína concentrada de Spirulina sp. LEB 18 e PEO.

-: não houve formação de nanofibras uniformes

Sistemas à base de polímero apresentam elevada miscibilidade em água à baixas temperaturas, enquanto que a separação de fases ocorre quando a temperatura é aumentada. Apesar de a literatura mencionar que a taxa de agregação do polímero aumenta com o incremento da temperatura (BAHLOULI et al., 2013), o aquecimento do PEO a  $67 \pm 3$  °C, em solução ácida, não prejudicou a solubilidade do polímero, sendo possível a produção de nanofibras. No entanto, em testes preliminares foi observado que o aquecimento do PEO em solução alcalina desencadeou solubilização parcial e consequente agregação das moléculas, uma vez que foram visualizadas algumas partículas suspensas do polímero. Segundo Hey, Ilet e Davidson (1995), essa agregação pode ser atribuída à contração nas dimensões das cadeias poliméricas ao elevar a temperatura, proporcionando interação menos favorável com as moléculas de água para a formação de fibras. Além disso, as propriedades das soluções aquosas de PEO dependem das diferentes interações entre as moléculas de água e os grupos metileno que é hidrofóbico e oxigênios de éter hidrofílicos nas subunidades de óxido de etileno.

A morfologia das nanofibras é determinada por fatores intrínsecos (propriedades da solução) e extrínsecos (condições operacionais) (LI; XIA, 2004). A solução ácida proporcionou melhor solubilização do concentrado proteico e melhor morfologia das fibras. Assim como com a solução alcalina, não foi observada influência significativa do aquecimento do PEO na morfologia das nanofibras com 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína. Nanofibras mais uniformes tendem a apresentar índice 1. Ao aumentar o conteúdo proteico de 5 para 10 % (m.m<sup>-1</sup>) houve o incremento de 19 e 46 % no índice de morfologia das nanofibras, quando o PEO foi aquecido em solução ácida e adicionado depois da desnaturação proteica, respectivamente (Tabela 1). Verdugo, Lim e Rubilar (2014) também avaliaram o índice de morfologia e encontraram, para as fibras desenvolvidas, valores entre 0,28 e 1,0. Assim, pode-se constatar que aquecendo a solução de PEO (0,8 %, m.m<sup>-1</sup>) e proteína (10 %, m.m<sup>-1</sup>) foi possível obter nanofibras com morfologia uniforme. Os diâmetros mínimo e máximo nessas condições foram 280 e 683 nm, respectivamente. Observou-se frequência relativa de 20 % em diâmetro de aproximadamente 375 nm e 20 % em 425 nm (Figura 4d). Além disso, sem o aquecimento do PEO, foi encontrada frequência relativa de 43 % em diâmetro de 425 nm. Os diâmetros mínimo e máximo para estas condições foram 248 e 555 nm, respectivamente (Figura 4c).

Quando utilizado 5% (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada em meio ácido sem aquecimento do PEO, o diâmetro mínimo encontrado foi 88 nm e o máximo, 301 nm, com frequência relativa de 40 % em diâmetro de 225 nm (Figura 4a). Quando a mesma concentração de proteína foi utilizada com aquecimento do PEO, o diâmetro mínimo foi 80 nm e o diâmetro

máximo, 202 nm. Além disso, a frequência relativa de 36 % em diâmetro de 110 nm foi encontrada (Figura 4b).

**Figura 4** - Frequência de diâmetro das nanofibras desenvolvidas em meio ácido com 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 sem (a) e com aquecimento do PEO

(b); 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 sem (c) e com

aquecimento do PEO (d).



Além disso, verificou-se que ao dobrar o teor de proteínas na solução ácida houve aumento de aproximadamente 4 vezes no diâmetro das nanofibras. A condutividade elétrica também pode ser correlacionada com o diâmetro da fibra, como foi observado neste estudo. Os menores valores de condutividade proporcionaram fibras com diâmetros maiores. Segundo Verdugo, Lim e Rubilar (2014), a condutividade reduzida influencia na densidade das cargas que minimiza a força de repulsão ao longo do jato do polímero, resultando em nanofibras de maior diâmetro.

# 3.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE *FOURIER* (FTIR)

Para a proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 em pó, assim como para as nanofibras desenvolvidas, foram observados bandas no espectro, em aproximadamente 1628 e 1525 cm<sup>-1</sup>, que correspondem aos grupos amida I e amida II, respectivamente (Figura 5). As respostas obtidas sugerem que houve interação entre a proteína e o PEO, provavelmente devido a alteração da estrutura secundária da proteína (LIU; MA, 2016).

**Figura 5** - Espectros de FTIR-ATR para proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 (a), nanofibras desenvolvidas com 10 % (m.m<sup>-1</sup>) (b) e 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada (c) em solução ácida.



Em comparação com a amostra de proteína concentrada, a localização das bandas de absorção pertencentes à amida I e à amida II foi deslocada para valores menores quando a proteína foi encapsulada nas nanofibras. Além disso, as bandas de amida I e amida II foram deslocados para valores menores com o aumento do teor de proteína. Para nanofibras desenvolvidas com 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18, as bandas no espectro FTIR foram observados em 1641 cm<sup>-1</sup> (amida I) e 1533 cm<sup>-1</sup> (amida II).

# 3.4 ESTABILIDADE TÉRMICA

A fim de avaliar o efeito do aquecimento do PEO nas propriedades térmicas das nanofibras, foi constatado redução de 5°C na temperatura final e máxima de degradação quando

o PEO foi adicionado após a desnaturação da proteína (10 %, m.m<sup>-1</sup>) (Tabela 2). A temperatura inicial de degradação ( $T_i$ ) nestas condições foi 56 °C maior quando comparado as nanofibras de proteína desenvolvidas a partir do aquecimento do PEO. Além disso, a  $T_i$  das nanofibras de proteína foi 23 % maior que a proteina em pó. O mesmo foi observado por Uebel et al. (2016), em que a adição de policaprolactona em curcumina e quercitina, resultou em  $T_i$  mais elevada quando comparada a dos compostos puros, demonstrando que o polímero conferiu maior proteção aos compostos bioativos.

proteína concentrada e nanofibras desenvolvidas em solução ácida.

 Amostras
 Ti (°C)
 Tf (°C)
 Tmáx (°C)

**Tabela 2** - Temperatura inicial  $(T_i)$ , final  $(T_f)$  e máxima  $(T_{máx})$  de degradação de PEO,

Amostias	$\Pi(\mathbf{C})$	II ( C)	$1 \max(C)$
PEO	345,7	423,3	388,4
Proteína concentrada	231,9	384,2	312,9
Nanofibras de 5 % (m.m <sup>-1</sup> ) de proteína + PEO aquecidos	235,5	412,5	326,5
Nanofibras de 5 % (m.m <sup>-1</sup> ) de proteína aquecida + PEO	251,6	412,9	316,9
Nanofibras de 10 % (m.m <sup>-1</sup> ) de proteína + PEO aquecidos	229,9	405,2	323,4
Nanofibras de 10 % (m.m <sup>-1</sup> ) de proteína aquecida + PEO	285,0	400,0	318,6

Além disso, observou-se que o aumento da concentração de proteína de 5 para 10 % (m.m<sup>-1</sup>) aumentou a Ti em 34 ° C quando o PEO foi adicionado após o aquecimento da solução proteica. Assim, constatou-se que o maior teor de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 e a adição de PEO após o aquecimento da solução polimérica contribuíram para melhorar a estabilidade térmica deste tipo de material.

Segundo Mascheroni et al. (2013), o encapsulamento por nanofibras melhora a estabilidade e a preservação de diversos compostos, incluindo proteína, vitaminas, compostos antioxidantes e antimicrobianos. Braga et al. (2016) avaliaram a influência de conservantes de ficocianina e constataram que o valor *half-life* obtido na ficocianina encapsulada em nanofibras (66 %) foi semelhante aos valores encontrados quando adicionado 20 % de glicose (86 %) e 50 % de sorbitol (71 %) na solução de ficocianina ultrafiltrada. Portanto, as nanofibras podem ser uma excelente estratégia para aumentar a estabilidade térmica deste biocomposto.

# 4 CONCLUSÃO

Nanofibras uniformes e termicamente estáveis foram desenvolvidas com a maior concentração (10 %, m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18. O diâmetro médio
encontrado para nanofibras desenvolvidas com esta concentração de proteína foi 390 e 452 nm, com e sem aquecimento do PEO em solução polimérica ácida, respectivamente. O aquecimento do PEO mostrou influência em meio alcalino e ácido apenas quando aplicado com a menor concentração de proteína, reduzindo a formação de gotas e aglomerados.

A possibilidade de formação de nanofibras com baixa concentração de PEO demonstra o potencial da proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 para desenvolver nanofibras. O elevado teor proteico desta microalga associada à tecnologia *Nanospider* pode facilitar o aumento de escala de nanofibras para potencial aplicação na área de embalagens de alimentos. Além disso, o uso de polímeros biodegradáveis como a proteína de microalgas contribui para o desenvolvimento de embalagens ambientalmente corretas.

### **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AHMED, I.; LIN, H.; ZOU, L.; BRODY, A. L.; LI, Z.; QAZI, I. M.; PAVASE, T. R.; LV, L. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. **Food Control**, v. 82, p. 163–178, 2017.

AL-DEYAB, S. S.; EL-NEWEHY, M. H.; NIRMALA, R.; ABDEL-MEGEED, A.; KIM, H. Y. Preparation of nylon-6/chitosan composites by nanospider technology and their use as candidate for antibacterial agents. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 422–428, 2013.

AOAC. THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Gaithersburg, MD, USA: Association of Analytical Communities, 2000.

BAHLOULI, M. I.; BEKKOUR, K.; BENCHABANE, A.; HEMAR Y.; NEMDILI, A. The effect of temperature on the rheological behavior of polyethylene oxide (PEO) solutions. **Applied Rheology**, v.23, p. 1–15, 2013.

BAICHA, Z.; SALAR-GARCÍA, M. J.; ORTIZ-MARTÍNEZ, V. M.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J.; RÍOS, A. P.; LABJAR, N.; ELMAHI, M. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: a promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104–116, 2016.

BENELHADJ, S.; FELLI, N.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBLE, D.; GHARSALLAOUI, A. Properties of lysozyme/*Arthrospira platensis* (*Spirulina*) protein complexes for antimicrobial edible food packaging. **Algal Research**, v. 15, p. 43–49, 2016.

BOWLES, M.; LU, J. Removing the blinders: A literature review on the potential of nanoscale technologies for the management of supply chains. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 82, p. 190–198, 2014.

BRAGA, A. R. C.; FIGUEIRA, F. S.; SILVEIRA, J. T.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Improvement of thermal stability of C-phycocyanin by nanofiber and

preservative agents. Journal of Food Processing and Preservation, v. 40, p. 1264–1269, 2016.

GUO, L.; CHEN, F.; ZHOU, Y.Z.; LIU, X.; XU, W. The influence of interface and thermal conductivity of filler on the nonisothermal crystallization kinetics of polypropylene/natural protein fiber composites. **Composites Part B: Engineering**, v. 68, p. 300–309, 2015.

Hey, M.J.; Ilet, S.M.; Davidson, G. Effect of temperature on poly(ethylene oxide) chains in aqueous solution. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, v. 91, p. 3897–3900, 1995.

HUANG, Z-M.; ZHANG, Y. Z.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C.T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. **Polymer**, v. 45, p. 5361–5368, 2004.

LARKUM, A. W.; ROSS, I. L.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v, 30, p. 198–205, 2012.

LI, D.; XIA, Y. lectrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? Advanced Materials, v. 16, p. 1151–1170, 2004.

LIU, C.; MA, X. Study on the mechanism of microwave modified wheat protein fiber to improve its mechanical properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 99–107, 2016.

MASCHERONI, E.; FUENMAYOR, C. A.; COSIO, M. S.; DI SILVESTRO, G.; PIERGIOVANNI, L.; MANNINO, S.; SCHIRALDI, A. Encapsulation of volatiles in nanofibrous polysaccharide membranes for humidity-triggered release. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 17–25, 2013.

MEIXNER, K.; FRITZ, I.; DAFFERT, C.; MARKL, K.; FUCHS, W.; DROSG, B. Processing recommendations for using low-solids digestate as nutrient solution for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production with *Synechocystis salina*. Journal of Biotechnology, v. 240, p. 61–67, 2016.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; PRANKE, P.; WENDORFF, J. H.; STILLINGS, C.; RUDISILE, M.; DERSCH, R. Biofunctionalized nanofibers using *Arthrospira (Spirulina)* biomass and biopolymer. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

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

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Utilization of CO<sub>2</sub> in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 691–698, 2016.

REMONDETTO, G.; AÑON, M. C.; GONZALEZ, R. J. Hydration properties of soybean protein isolates. **Brazilian Archives Biology and Biotechnology**, v. 44, p. 425–431, 2001.

RODRIGO, R.; TORO, C. A.; CUELLAR, J. Influence of the geometric factors of the experimental device used in suspension polymerization on the properties of poly(styrene-*co* divinylbenzene) microparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 1431–1446, 2012.

UEBEL, L. S.; SCHMATZ, D. A.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.; MUCCILO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. uercetin and curcumin in nanofibers of polycaprolactone and poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate): Assessment of in vitro antioxidant activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, p. 1–7, 2016.

VEGA-LUGO, A.-C.; LIM, L.-T. Electrospinning of soy protein isolate nanofibers. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, v. 2, p. 223–230, 2008.

VERDUGO, M.; LIM, L.-T.; RUBILAR, M. Electrospun protein concentrate fibers from microalgae residual biomass. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 22, p. 373–383, 2014.

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

ARTIGO 2

NANOFIBRAS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE DESENVOLVIDAS A PARTIR DE FICOCIANINA E PROTEÍNA MICROALGAL

#### Nanofibras com potencial antioxidante desenvolvidas a partir de ficocianina e proteína

#### microalgal

#### **RESUMO**

Nanofibras podem ser desenvolvidas para serem adicionadas total ou parcialmente em embalagens, proporcionando propriedades bioativas. A microalga Spirulina apresenta em sua biomassa compostos antioxidantes de importância comercial como a ficocianina. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanofibras de proteína concentrada de Spirulina sp. LEB 18/PEO e ficocianina com atividade antioxidante. Nanofibras uniformes de proteína concentrada de Spirulina sp. LEB 18 foram desenvolvidas apresentando diâmetro médio de 196, 292 e 446 nm ao utilizar 5, 7,5 e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína, respectivamente. Ao adicionar a ficocianina (2 %, m.m<sup>-1</sup>), os diâmetros médios encontrados foram 269, 314 e 542 nm, respectivamente. Pela técnica de FTIR foi possível observar a interação entre a proteína, o PEO e a ficocianina. Além disso, o encapsulamento por nanofibras aumentou a estabilidade térmica da ficocianina. As nanofibras desenvolvidas com 7,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada e 2 % (m.m<sup>-1</sup>) de ficocianina apresentaram potencial antioxidante pelos métodos ABTS+ e DPPH. Desta forma, bioprodutos microalgais são alternativas inovadoras para o desenvolvimento de nanofibras bioativas com potencial aplicação para embalagem de alimentos. Além disso, a utilização de nanofibras de proteína concentrada de microalgas pode proporcionar liberação controlada do antioxidante, prolongando o tempo de circulação do composto no alimento.

Palavras-chave: Embalagem de alimentos. Nanospider. Proteína concentrada. Spirulina.

#### Nanofibers with antioxidant potential developed from phycocyanin and microalgal

#### protein

#### ABSTRACT

Nanofibers can be developed to be added fully or partially in packages, providing bioactive properties. The Spirulina microalga presents in its biomass compounds antioxidants of commercial importance as phycocyanin. Thus, the objective of this study was to develop nanofibers of protein concentrate from *Spirulina* sp. LEB 18/PEO and phycocyanin with antioxidant activity. Uniforms nanofibers of protein concentrate of *Spirulina* sp. LEB 18 were developed with a mean diameter of 196, 292 and 446 nm using 5, 7.5 and 10 % (w.w<sup>-1</sup>) of protein, respectively. When adding phycocyanin (2 %, w.w<sup>-1</sup>), the average diameters found were 269, 314 and 542 nm, respectively. By the FTIR technique, it was possible to observe the interaction between protein, PEO and phycocyanin. In addition, encapsulation by nanofibers increased thermal stability of phycocyanin showed antioxidant potential by the ABTS<sup>+</sup> and DPPH methods. In this way, microalgal bioproducts are innovative alternatives for the development of bioactive nanofibers with potential application for food packaging. In addition, the use of nanofibers of protein concentrate from microalgae can provide controlled release of the antioxidant, prolonging the circulation time of the compound in the feed.

Keywords: Food packaging. Nanospider. Protein concentrate. Spirulina.

#### 1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos, proteínas e lipídios são utilizados para produção de embalagens ativas biodegradáveis (DUTTA et al., 2009; LIU et al., 2017) e podem atuar como transportadores para substâncias ativas, como antioxidantes, antimicrobianos e absorvedores de oxigênio através da nanotecnologia. Entretanto, as soluções com proteínas, que são altamente condutoras, tendem a apresentar dificuldade de produzir materiais como as nanofibras. Esta dificuldade com *electrospinning* de solução aquosa de proteína tem sido atribuída às características de polieletrólitos de macromoléculas de polipeptideos, que são capazes de suportar cargas acompanhados por muitos contra-íons, que enfraquecem a densidade de carga requerida para o processo (HUANG et al., 2004). Por isso, tem-se adicionado concentrações mínimas de PEO na solução polimérica a base de proteínas.

Nanofibras produzidas a partir de biopolímeros, como proteínas, também têm sido relatadas devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Estas fibras altamente porosas apresentam grande área de superfície e foram produzidas contendo biomassa de microalga (MORAIS et al., 2015a; SCHMATZ et al., 2016). A microalga *Spirulina* é conhecida pelo elevado teor proteico que apresenta (65-80 %, m.m<sup>-1</sup>) (MORAIS et al., 2009; MOREIRA et al., 2016). No entanto, não é reportado na literatura o uso da proteína extraída de sua biomassa para o desenvolvimento de nanofibras poliméricas. Além disso, a microalga *Spirulina* é composta por pigmentos de importância comercial como a ficocianina, que pode ser adicionada em nanofibras para potencial aplicação na indústria de alimentos.

A concentração de ficocianina geralmente atinge 20 % da proteína total presente na biomassa de microalgas (VONSHAK, 1997). Pesquisas comprovam que os corantes naturais são mais eficientes do que os corantes sintéticos porque não apresentam toxicidade, nem propriedades cancerígenas (MARTELLI et al., 2014). Assim, os princípios das aplicações comerciais da ficocianina estão associados às suas funções, tais como corantes naturais, marcadores fluorescentes e agentes terapêuticos. A importância farmacológica e fisiológica deste pigmento é, principalmente, devido a suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória (ROMAY et al., 2003; ROMAY et al., 1998). No entanto, na literatura não é encontrado a avaliação dessas propriedades em nanofíbras de ficocianina. Além disso, a ficocianina apresenta atividades hepatoprotetora, neuroprotetora, antitumoral, imunomoduladora e ateroprotetora (MANIRAFASHA et al., 2016), o que também é relevante para a indústria de alimentos que busca novas fontes de compostos bioativos.

*Nanospider* é um método modificado do *electrospinning*, no qual é possível a utilização de um campo eletrostático de alta tensão de até 80 kV e volumes maiores de solução polimérica para produção contínua de nanofibras. Assim, o elevado teor proteico e compostos bioativos da *Spirulina* aliado a tecnologia *Nanospider* tornam as microalgas alternativa inovadora para a aumento de escala da produção de nanofibras bioativas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanofibras de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18/PEO e ficocianina com atividade antioxidante.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

A microalga utilizada neste estudo foi a *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira, no sul do Brasil. A biomassa da microalga foi submetida a operações de secagem (50 °C durante 4 h), moagem em moinho de bolas (Modelo Q298, Quimis, Brasil), embalada a vácuo (Supervac400, Suplack, Brasil). A biomassa com umidade de 5,3 % (m.m<sup>-1</sup>) foi armazenada no escuro a 4 °C (MORAIS et al., 2009).

#### 2.2 EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA CONCENTRADA DE Spirulina sp. LEB 18

A proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 foi extraída por dissolução da biomassa em pH 12 a 40 °C e 150 rpm (durante 1 e 2 h), seguido de centrifugação a 10.000 x g durante 15 min a 25 °C, no qual foi recolhido o sobrenadante. O precipitado foi dissolvido novamente em pH 12 e centrifugado (10.000 x g durante 15 min a 25 °C), a partir do qual foi recolhido novamente o sobrenadante. Ambos os sobrenadantes foram ajustados em pH 4 para precipitar a proteína. O sedimento foi recuperado por centrifugação a 10.000 x g durante 15 min a 25 °C e dialisado em água Mili-Q por 3 d a 4 °C utilizando membrana de celulose (MWCO 6000-8000, Spectra/Pore, Spectrum Laboratories, Inc., EUA) (VERDUGO; LIM; RUBILAR, 2014).

O concentrado proteico foi liofilizado e o teor da proteína concentrada e biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram determinados pelo método de Dumas (FP528, Leco, EUA), utilizando fator de conversão de 6,25 (AOAC, 2000).

# 2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS E PARÂMETROS DO *ELECTROSPINNING*

As soluções foram preparadas com 5, 7,5 e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 e 0,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de PEO (peso molecular 900.000 da) (Sigma Aldrich, Canadá). As soluções foram preparadas em ácido acético:água (3:1, respectivamente), no qual a proteína e o PEO foram aquecidos a  $67 \pm 3$  °C durante 2 h. Após o aquecimento, as soluções poliméricas foram agitadas durante 12 h à temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  °C). Na sequência, 2 % (m.m<sup>-1</sup>) de ficocianina (Parry, Nutraceuticals, Índia) foi adicionado à solução (SCHMATZ, 2017) e mantida sob agitação durante 6 h, a  $25 \pm 3$  °C, antes do processo de *electrospinning*. Ensaios controle (sem adição de ficocianina) também foram realizados.

Os parâmetros no processo de *electrospinning* utilizados foram potencial elétrico de 50 kV, distância do coletor ao fio condutor de 18 cm, velocidade de transporte da solução polimérica de 100 mm.s<sup>-1</sup> e diâmetro do orifício de 0,6 mm. O equipamento utilizado para a formação das nanofibras foi *Nanospider* (NS lab, Elmarco, USA).

### 2.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

A condutividade das soluções foi medida utilizando condutivímetro (Accumet XL20, Fisher Scientific, Canadá).

## 2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As nanofibras desenvolvidas foram revestidas com ouro (20 nm) utilizando revestidor por crepitação (Modelo K550, Emitech, Reino Unido). A morfologia das nanofibras foi obtida utilizando microscópio eletrônico de varredura (S-570, Hitachi High Technologies Corporation, Japão) com voltagem de aceleração de 10 kV. O diâmetro médio da nanofibra foi determinado a partir das imagens de MEV, com 50 medidas utilizando software de processamento de imagem (Image Pro-Plus 5.1, Media Cybernetics Inc., USA).

## 2.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE *FOURIER* (FTIR)

As nanofibras desenvolvidas foram avaliadas em espectrômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (IR Prestige-21, Shimadzu Corp., Japão), com refletância total atenuada (ATR). Varreduras na faixa espectral de 650 a 4000 cm<sup>-1</sup> foram

realizadas e recolhidas 32 leituras a uma resolução de 8 cm<sup>-1</sup>. Os dados foram analisados usando Origin software (OrginLab, USA).

### 2.7 ESTABILIDADE TÉRMICA

A medida da estabilidade térmica das nanofibras foi realizada em analisador termogravimétrico (Shimadzu, DTG-60, Japão) de acordo com a metodologia ASTM D3850-12 (2013). As análises foram conduzidas a temperatura ambiente até alcançar 500 °C, em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo 30 mL min<sup>-1</sup> e taxa de aquecimento constante de 10 °C min<sup>-1</sup>.

#### 2.8 ATIVIDADES ANTIOXIDANTE DAS NANOFIBRAS

A atividade antioxidante foi realizada nas amostras de nanofibras de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 com e sem adição de ficocianina. O preparo das soluções para as análises de atividade antioxidante consistiu em solubilizar aproximadamente 10 mg de amostra de nanofibras em 4 mL de tampão bicarbonato/carbonato 0,2 M (pH 9,5) para solubilização da proteína, seguido de homogeneização em vórtex (AP-59, Phoenix, Argentina) por 10 min. Logo as amostras foram submetidas a banho ultrassônico (Q3350, Quimis, Brasil) por 15 min e posterior centrifugação (Microcentrifuge 5410, Eppendorf, Brasil) a 12.800 x g por 30 min. O sobrenadante foi utilizado para a realização dos ensaios de ABTS e DPPH.

## 2.8.1 Atividade antioxidante com 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio (ABTS<sup>+</sup>)

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia de Miliauskas Venskutonis e Beek (2004), no qual foram adicionados 3 mL da solução ABTS<sup>+</sup> a 30 µL de solução contendo a amostra. As soluções foram mantidas na ausência de luz à temperatura ambiente e analisadas em espectrofotômetro (Q898DRM, Quimis, Brasil) a 734 nm. A atividade antioxidante por redução do radical ABTS<sup>+</sup> foi determinada a partir da Equação 1, em que A<sub>amostra</sub> é a absorvância da amostra após 6 min e A<sub>controle</sub> é a absorvância da solução contendo apenas o solvente com o radical ABTS<sup>+</sup>. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e avaliadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 95 % (p <0,05).

Redução ABTS<sup>+</sup> (%) = 
$$\frac{A \text{ controle-A amostra}}{A \text{ controle}} \times 100$$
 (1)

#### 2.8.2 Atividade antioxidante com hidrato 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia de Miliauskas, Venskutonis e Beek (2004), no qual foram adicionados 3,9 mL da solução de DPPH (concentração de 0,024 g.L<sup>-1</sup>, preparada no dia da análise) a 0,1 mL de amostra. As soluções foram mantidas na ausência de luz à temperatura ambiente e analisadas em espectrofotômetro (Q898DRM, Quimis, Brasil) a 515 nm. A atividade antioxidante por inibição do radical DPPH foi determinada pela Equação 2, em que A<sub>amostra</sub> é a absorvância da amostra após 10 min e A<sub>controle</sub> é a absorvância da solução contendo apenas o solvente com o radical DPPH. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e avaliadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 95 % (p<0,05).

Inibição DPPH (%) = 
$$\frac{A \text{ controle-A amostra}}{A \text{ controle}} \times 100$$
 (2)

#### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 3.1 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, UNIFORMIDADE E DIÂMETRO DAS NANOFIBRAS

As nanofibras desenvolvidas com adição de ficocianina apresentaram morfologia uniforme, sem a ocorrência de gotas ou aglomerados (Figura 1). Além disso, a adição de ficocianina e o aumento da concentração de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 incrementou a condutividade elétrica da solução polimérica e o diâmetro das nanofibras (Tabela 1). A morfologia das nanofibras é influenciada pelas propriedades da solução, especialmente condutividade elétrica. A solução polimérica deve possuir condutividade elétrica que estabeleça repulsão de carga (força de repulsão) para superar a tensão superficial de uma gota para formar jato de fibra. As condições do processo, tais como a taxa de fluxo da solução, a temperatura, a pressão, a distância entre a ponta do capilar e o coletor, assim como a intensidade do campo elétrico também têm sido relatadas por afetar o o proceso de *electrospinning* (HUANG et al., 2004; RAMAKRISHNA et al., 2005).

Figueira et al. (2016) desenvolveram nanofibras bioativas de PEO (6 %,  $m.v^{-1}$ ) e ficocianina (3 %,  $m.v^{-1}$ ) com diâmetro médio de 295 nm, valor semelhante ao encontrado nas nanofibras desenvolvidas com 5 % ( $m.m^{-1}$ ) de proteína de *Spirulina* sp. LEB 18 e 2 % ( $m.m^{-1}$ ) de ficocianina. Além disso, outros estudos também observaram aumento no diâmetro médio

das fibras ao incrementar a solução polimérica com diferentes compostos (MOOMAND; LIM, 2015; VERDUGO et al., 2014).

As nanofibras desenvolvidas com a maior concentração de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 (10 %, m.m<sup>-1</sup>) apresentaram distribuição de diâmetros com menor uniformidade quando comparado as concentrações mais baixas (Figura 2). A frequência relativa do diâmetro das nanofibras desenvolvidas com 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína e adição de ficocianina foi 36 %, em 275 nm (Figura 2e). Com 7,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína com ficocianina a frequência foi 44 % em 325 nm (Figura 2c). As nanofibras com maior concentração proteica (10 %, m.m<sup>-1</sup>) e adição de ficocianina apresentaram frequência relativa de 34 % em 450 nm (Figura 2a).

Figura 1 - Nanofibras desenvolvidas com 0,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de PEO e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada com (a) e sem ficocianina (b); 7,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada com (c) e sem ficocianina (d); 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada com (e) sem ficocianina (f).



 Tabela 1 - Condutividade elétrica das soluções poliméricas, distribuição de tamanho e atividade antioxidante das nanofibras desenvolvidas contendo 0,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de PEO, proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 (m.m<sup>-1</sup>) e ficocianina (m.m<sup>-1</sup>).

Proporção de proteína	Condutividade	Diâmetro	Diâmetro	Diâmetro	% Redução	% Inibição
concentrada:ficocianina	(mS.cm <sup>-1</sup> )	médio (nm)	mínimo (nm)	máximo (nm)	(ABTS <sup>+</sup> )	(DPPH)
5:0	$0,52 \pm 0,00$	$196 \pm 43$	113	309	$22,5 \pm 0,2^{cdA}$	$1,4 \pm 0,0^{cB}$
5:2	$0,99 \pm 0,01$	$269\pm55$	169	417	$26,3\pm1,4^{bcA}$	$5,0\pm0,1^{\mathrm{aA}}$
7,5:0	$0,58 \pm 0,00$	$292\pm80$	109	493	$19,7\pm0,5^{dB}$	$1,3\pm0,0^{cB}$
7,5:2	$0,99 \pm 0,00$	$314 \pm 57$	214	487	$30{,}8\pm0{,}3^{abA}$	$5,6\pm0,6^{aA}$
10:0	$0,79 \pm 0,01$	$446\pm99$	251	728	$21,4 \pm 1,7^{cdB}$	$4,8\pm0,4^{bA}$
10:2	$1,01 \pm 0,02$	$542\pm126$	324	849	$32,1\pm2,1^{aA}$	$5,3\pm0,1^{abA}$

Valores são a média  $\pm$  o desvio padrão; letras maiúsculas na mesma coluna comparam os ensaios com e sem ficocianina para cada concentração de proteína; letras minúsculas na mesma coluna comparam todos ensaios das nanofibras em diferentes concentrações de proteína concentrada; letras iguais não diferem estatisticamente (p> 0,05) pelo teste de Tukey.

Figura 2 - Frequência de diâmetro das nanofibras desenvolvidas com 0,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de PEO e

10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada com (a) e sem ficocianina (b); 7,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada com (c) e sem ficocianina (d); 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada com (e) sem ficocianina (f).



O PEO é um polímero de cadeia longa flexível, que pode interagir com a proteína, diminuindo a condutividade da solução de proteína concentrada. Assim, o jato com densidade de carga elevada melhora o alongamento da solução durante a formação da nanofibra (VEGA-LUGO; LIM, 2008). Desta forma, é possível o desenvolvimento de fibras finas, longas e uniformes a partir de soluções de proteína concentrada de origem microalgal.

## 3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE *FOURIER* (FTIR)

Espectros FTIR das nanofibras desenvolvidas (Figura 3) demonstraram bandas de amida I a 1650 cm<sup>-1</sup> (alongamento C=O) e amida II a 1535 cm<sup>-1</sup> (alongamento N-H) (KRIMM; BANDEKAR, 1986), característico de compostos como a proteína e a ficocianina constituídos nas amostras.

Patel et al. (2005) encontraram bandas para ficocianina pura de *Spirulina*, *Phormidium* e *Lyngbya* spp. em torno de 1655 cm<sup>-1</sup> e 1543 cm<sup>-1</sup>, correspondendo aos grupos amida I e II, respectivamente. Além disso, os autores afirmaram que a posição e a forma da banda de amida I são empregadas para a análise da estrutura secundária da proteína. A banda forte em 1650 cm<sup>-1</sup> observada nas nanofibras de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 adicionadas de ficocianina indica a  $\alpha$ -hélice como o elemento principal da sua estrutura secundária (PATEL et al., 2005).

As bandas de absorção demonstradas em torno de 3300 cm<sup>-1</sup> foram atribuídas as vibrações de alongamento dos grupos O-H. Além disso, foi observado banda de absorção em 1241 cm<sup>-1</sup> que corresponde ao alongamento C-N. Todos as bandas de absorção foram constatados nas amostras de nanofibras desenvolvidas com ficocianina e diferentes concentrações de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18. Isso indica que houve a interação da proteína, ficocianina e PEO, provavelmente devido a alteração da estrutura secundária da proteína (LIU; MA, 2016).

Figura 3 – Espectros de FTIR-ATR das nanofibras desenvolvidas com 0,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de PEO e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada com (a) e sem ficocianina (b); 7,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada com (c) e sem ficocianina (d); 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada com (e) sem ficocianina (f).



#### 3.3 ESTABILIDADE TÉRMICA

As curvas de degradação térmica das nanofibras de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 com e sem incorporação de ficocianina apresentaram perfil semelhante (Figura 4). Dois estágios evidentes de perda de peso foram observados nas curvas TG. O primeiro intervalo de temperatura (30-160 °C) correspondeu à evaporação de umidade das amostras. Este estágio também está associado ao processo de desnaturação de proteínas. A temperatura inicial de degradação térmica das amostras foi em 220-240 °C, correspondente ao segundo estágio observado, característico da degradação térmica de proteínas.

A temperatura inicial de degradação térmica (T<sub>i</sub>) para a ficocianina foi 213,2 °C. As T<sub>i</sub> encontradas para as nanofibras adicionadas de ficocianina foram superiores a T<sub>i</sub> do pigmento, sendo os valores 246,1, 243,8 e 221,9 °C quando desenvolvidas com 5; 7,5 e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18, respectivamente. Uma vez que a ficocianina é instável ao calor, seu potencial para aplicação em produtos alimentícios que necessitam de tratamento térmico é restrito (MARTELLI et al., 2014). Desta forma, as nanofibras de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 podem ser desenvolvidas para contribuir com a estabilidade térmica da ficocianina.





#### **3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS NANOFIBRAS**

No geral, as nanofibras de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 contendo ficocianina demonstraram maior potencial antioxidante, quando comparadas as nanofibras sem o pigmento, com exceção das nanofibras desenvolvidas com 5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada avaliada pelo método ABTS<sup>+</sup> e as nanofibras com 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada avaliada pelo teste DPPH. As nanofibras de proteína concentrada enriquecidas com

ficocianina apresentaram, em média, 29,7 % de redução e 5,3 % de inibição dos radicais ABTS<sup>+</sup> e DPPH, respectivamente (Tabela 1). Uebel et al. (2016) desenvolveram nanofibras com composto antioxidante curcumina e observaram resultado semelhante de 35,5 % de redução do radical ABTS<sup>+</sup>.

De acordo com Sonani et al. (2017), a atividade antioxidante da ficocianina, avaliada pelo poder de inibição do radical DPPH, é dependente da dose utilizada desse biocomposto. Isso pode justificar os resultados mais baixos obtidos no teste de DPPH para as nanofibras de proteína concentrada com ficocianina em comparação ao método ABTS<sup>+</sup>. Além disso, como o encapsulamento por nanofibras melhora a estabilidade e a preservação de compostos como proteínas, antioxidantes, antimicrobianos e vitaminas (MASCHERONI et al., 2013), há dificuldade da total liberação do composto bioativo para a avaliação antioxidante.

As evidências na área da medicina revelaram que a ingestão de antioxidantes pode manter o equilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHADWICK et al., 2003, SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011). De acordo com Moreno et al. (2011), as nanofibras são alternativas para a liberação controlada de proteínas, uma vez que a elevada área superficial aumenta o contato entre a proteína encapsulada e o meio de liberação. Assim, a utilização de nanofibras antioxidantes para aplicação em embalagens de alimentos é alternativa inovadora para ser utilizada na prevenção de doenças como a aterosclerose, a doença de Alzheimer, câncer, diabetes mellitus, artrite reumatoide, doenças inflamatórias e o processo de envelhecimento (DURACKOVA, 2010; WU et al., 2005). Além disso, a utilização da técnica de *electrospinning* apresenta a vantagem de evitar a exposição de proteínas a temperaturas elevadas. Deste modo, o uso de nanofibras como sistema de liberação de ficocianina reduz o risco de instabilidade e desnaturação.

De acordo com Wojcik et al. (2010), os compostos de ação antioxidante podem inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis. O ensaio de atividade antioxidante baseado na descoloração do cátion radical ABTS<sup>+</sup> é amplamente utilizado para avaliar o potencial antioxidante tanto de amostras lipofílicas ou hidrofílicas quanto a inibição de radicais livres (KONG; XIONG, 2006). O mecanismo do ensaio DPPH baseia-se na redução do DPPH através de um antioxidante que é o doador de átomos de hidrogênio e elétron. O DPPH é um radical estável que pode ser facilmente eliminado por um composto antioxidante. Portanto, é utilizado para testar a eliminação de radicais livres de moléculas antioxidantes (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012; PYRZYNSKA; PĘKAL, 2013).

Segundo Bhat e Madyastha (2000), a ação antioxidante da ficocianina é devido à sua capacidade de eliminar os radicais livres e reagir com outros oxidantes de relevância patológica. Alguns benefícios da ficocianina da *Spirulina* para a saúde humana foram comprovados na literatura. Bertolin et al. (2011) indicaram que a quantidade administrada (5mg.d<sup>-1</sup>) foi suficiente para reduzir o dano oxidativo causado pelo glutamato monossódico *in vivo*.

A ficocianina isolada de *Spirulina* também foi testada quanto ao crescimento e multiplicação da linha celular de leucemia mielóide crônica humana (K562) (SUBHASHINI et al., 2004), sendo eficaz na redução das concentrações de colesterol de lipoproteínas de alta densidade (RISS et al., 2007), atenuando o dano pulmonar (SUN et al., 2011) e foi proposta para tratamento neurológico (PENTON-ROL et al., 2013) e anti-câncer (SAINI; SANYAL, 2014). Thangam et al. (2013) mostraram que a ficocianina possui excelente atividade antioxidante e sugeriram que o pigmento poderia ser utilizado para produzir um suplemento dietético antioxidante natural ou adicionado a produtos alimentícios saudáveis.

Assim, uma vez que a nanotecnologia envolve o controle da matéria, a utilização de nanofibras pode melhorar a distribuição de fitoquímicos como a ficocianina para aprimorar a sua eficiência terapêutica (ALEXIS et al., 2010; ZHANG; ZENG; LI, 2013). Nanofibras biocompatíveis e biodegradáveis como as nanofibras de proteína microalgal podem ser utilizadas para aumentar a absorção e biodisponibilidade de compostos bioativos. Esses nanomateriais podem ser aplicadas total ou parcialmente em embalagem de alimentos. Além disso, as nanofibras podem proporcionar uma liberação controlada da ficocianina, prolongando o tempo de circulação do composto no produto alimentício.

#### 4 CONCLUSÃO

Nanofibras com potencial antioxidante e diâmetro médio de 314 nm foram desenvolvidas com 7,5 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e 2 % (m.m)<sup>-1</sup> de ficocianina, aplicando potencial elétrico de 50 kV, distância de 18 cm, velocidade de transporte da solução polimérica de 100 mm.s<sup>-1</sup> e diâmetro do orificío de 0,6 mm. Desta forma, é importante que nanofibras com adição de ficocianina recebam maior atenção pela indústria de alimentos, uma vez que apresentam propriedade antioxidante para ser aplicado em embalagens bioativas.

## **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E. M.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticle technologies for cancer therapy. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 197, p. 55-86, 2010.

AOAC. THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Gaithersburg, MD, USA: Association of Analytical Communities, 2000.

**ASTM D3850 – 12. American Society for Testing and Materials**. Standard test method for rapid thermal degradation of solid electrical insulating materials by thermogravimetric method. West Conshohocken. 2013.

BERTOLIN, T. E.; FARIAS, D.; GUARIENTI, C, PETRY, F. T. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Antioxidant effect of phycocyanin on oxidative stress induced with monosodium glutamate in rats. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 54, p.733-738, 2011.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycocyanin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 20–25, 2000.

BRAGA, A. R. C.; FIGUEIRA, F. S.; SILVEIRA, J. T.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Improvement of thermal stability of C-phycocyanin by nanofiber and preservative agents. Journal of Food Processing and Preservation, v. 40, p. 1264–1269, 2016.

CHADWICK, R.; HENSON, S.; MOSELEY, B.; KOENEN, G.; LIAKOPOULOS, M.; MIDDEN, C.; PALOU, A.; RECHKEMMER, G.; SCHRÖDER, D.; WRIGHT, A. Functional Foods. New York: Springer, 2003.

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, p. 459-469, 2010.

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

FIGUEIRA, F. S.; GETTENS, J. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Production of nanofibers containing the bioactive compound C-phycocyanin. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, p. 944-949, 2016.

HUANG, Z.-M., ZHANG, Y. Z., RAMAKRISHNA, S., LIM, C.T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. **Polymer**, v. 45, p. 5361–5368, 2004.

KONG, B.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6059–6068, 2006.

KRIMM, S.; BANDEKAR, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. Advances in Protein Chemistry, v. 38, p. 181–364, 1986.

LIU, C.; MA, X. Study on the mechanism of microwave modified wheat protein fiber to improve its mechanical properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 99–107, 2016.

LIU, J.; MENG, C.; LIU, S.; KAN, J.; JIN, C. Preparation and characterization of protocatechuic acid grafted chitosan films with antioxidant activity. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 457-466, 2017.

MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; YINGHUA, L.; KEJU, J. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 282-296, 2016.

MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 154-159, 2014.

MASCHERONI, E.; FUENMAYOR, C. A.; COSIO, M. S.; DI SILVESTRO, G.; PIERGIOVANNI, L.; MANNINO, S.; SCHIRALDI, A. Encapsulation of volatiles in nanofibrous polysaccharide membranes for humidity-triggered release. **Carbohydrates Polymers**. v. 98, p. 17–25, 2013.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plants extract. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1036–1043, 2012.

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

MORAIS, M. G., RADDMANN, E. M., ANDRADE, M. R., TEIXEIRA, G. G., BRUSCH, L. R. F., COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Biofunctionalized nanofibers using *Arthrospira* (*Spirulina*) biomass and biopolymer. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Utilization of CO<sub>2</sub> in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 691–698, 2016.

MORENO, I.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, V.; ROMERO-GARCÍA, J. Control release of lactate dehydrogenase encapsulated in poly(vinyl alcohol) nanofibers via electrospinning. **European Polymer Journal**, v. 47, p. 1264-1272, 2011.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 248–255, 2005.

PENTON-ROL, G;. MARTINEZ-SANCHEZ, G.; CERVANTES-LLANOS, M.; LAGUMERSINDEZ-DENIS, N.; ACOSTA-MEDINA, E. F.; FALCÓN-CAMA, V.; ALONSO-RAMÍREZ, R.; VALENZUELA-SILVA, C.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, E.; LLÓPIZ-ARZUAGA, A.; MARÍN-PRIDA, J.; LÓPEZ-SAURA, P. A.; GUILLÉN-NIETO, G. E.; PENTÓN-ARIAS, E. C-phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomy, elitis and induces regulatory T cells. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 29-38, 2011.

PYRZYNSKA, K.; PĘKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, p. 4288–4295, 2013.

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

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, p. 36-41, 1998.

ROMAY, C.; GONZÁLEZ, R.; LEDÓN, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, p. 207-216, 2003.

SAINI, M. K.; SANYAL, S. N. Piroxicam and C-phycocyanin prevent colon carcinogenesis by inhibition of membrane fluidity and canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling while up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR $\gamma$ . **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, p. 537-550, 2014.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 229-254, 2011.

SCHMATZ, D. A. Incorporação de nanopartículas com ficocianina em nanofibras poliméricas por *electrospinning* e *electrospraying*. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

SCHMATZ, D. A.; UEBEL, L. S.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M.G. Scaffolds Containing *Spirulina* sp. LEB 18 Biomass: Development, Characterization and Evaluation of *In Vitro* Biodegradation. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. v.16, p. 1050-1059, 2016.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V.; REDDY, M. C.; MALLIKARJUNA, R. M.; RACHAMALLU, A.; REDDANNA, P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 453-62, 2004.

SUN, Y.; ZHANG, J.; YAN, Y.; CHI, M.; CHEN, W.; SUN, P.; QIN, S. The protective effect of C-phycocyanin on paraquat-induced acute lung injury in rats. **Environmental Toxicology** and **Pharmacology**, v. 32, p. 168-174, 2011.

THANGAM, R.; SURESH, V.; PRINCY. A. W.; RAJKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, N.; GUNASEKARAN, P.; RENGASAMY, R.; ANBAZHAGAN, C.; KAVERI, K.; KANNAN S. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and  $G_0G_1$  cell cycle arrest. Food Chemistry, v.140, p. 262-272, 2013.

VEGA-LUGO, A.-C.; LIM, L.-T. Electrospinning of soy protein isolate nanofibers. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, v, 2, p. 223–230, 2008.

VERDUGO, M.; LIM, L.-T.; RUBILAR, M. Electrospun protein concentrate fibers from microalgae residual biomass. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 22, p. 373–383, 2014.

VONSHAK A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology Cell-Biology and Biotechnology. Londres: Taylor & Francis, 1997.

WOJCIK, M.; BURZYNSKA-PEDZIWIATR, I.; WOZNIAK, L. A. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. **Current medicinal chemistry**, v. 17, p. 3262–3288, 2010.

WU, L. C.; HO, J. A.; SHIEH, M. C.; LU, I. W. Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4207-4212, 2005.

ZHANG, G.; ZENG, X.; LI, P. Nanomaterials in cancer-therapy drug delivery system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, p. 741-750, 2013.

ARTIGO 3

## INDICADOR DE pH DESENVOLVIDO A PARTIR DE NANOFIBRAS DE PLA/PEO E FICOCIANINA

#### Indicador de pH desenvolvido a partir de nanofibras de PLA/PEO e ficocianina

#### **RESUMO**

A ficocianina é um pigmento de coloração azul intenso, constituinte da biomassa de microalgas como a Spirulina. Esse pigmento é sensível ao pH e essa instabilidade resulta em variação da mudança de cor. O objetivo deste estudo foi desenvolver nanofibras de PLA/PEO e ficocianina com potencial aplicação como indicadores de pH para embalagem de alimentos. As soluções foram preparadas com PLA (9 %, m.v<sup>-1</sup>) e PEO (3 %, m.v<sup>-1</sup>), sendo utilizada a proporção 9:1, respectivamente. A ficocianina foi avaliada nas concentrações 2, 3, 4, 5 e 6 % (m.v<sup>-1</sup>), sendo também avaliada a espessura das membranas e o tipo de coletor utilizado no processo (rotatório e estático). Fibras uniformes de PLA/PEO foram desenvolvidas com 2 e 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina. Ao utilizar o coletor rotatório foi obtido diâmetro médio de 1318 nm para as fibras  $com 2 \% (m.v^{-1})$  de ficocianina e 921 nm para as desenvolvidas com 3 % (m.v^{-1}) do corante. As fibras de PLA/PEO com 2 e 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina apresentaram eficiência de encapsulação de 80,7 e 71,4 %, respectivamente. Com relação a avaliação como indicador de pH, as nanofibras de PLA/PEO com 3 % (m.v<sup>-1</sup>) do pigmento foram as que apresentaram as melhores respostas quanto a percepção de mudança de cor ( $\Delta E$ ). A maioria (60 %) dos valores de  $\Delta E$  encontrada para essas nanofibras foram superiores a 12, indicando mudanca absoluta na cor. Além disso, foi verificada influência da espessura das nanofíbras no valor de  $\Delta E$ . Com a maior espessura das nanofibras desenvolvidas a partir de 3 %  $(m.v^{-1})$  de ficocianina foi possível obter 76 % dos resultados de  $\Delta E$  acima de 12. Para a variação de pH 3,0 para 4,0 o valor de  $\Delta E$ encontrado foi 18,85 e para variação de pH 5,0 para 6,0 o valor de  $\Delta E$  foi 18,66. Desta forma, a utilização da ficocianina em nanofibras de PLA/PEO como indicador de pH em embalagem de alimentos é alternativa para aplicação do pigmento que é restrita devido à instabilidade da cor frente a mudanças no valor do pH.

Palavras-chave: *Electrospinning*. Embalagens de alimentos. Ficocianina. Mudança de cor. Sensor de pH.

#### pH indicator developed from PLA/PEO nanofibers and phycocyanin

#### ABSTRACT

Phycocyanin is a pigment of intense blue color, constituting the biomass of microalgae such as Spirulina. This pigment is pH sensitive and this instability results in varying color change. Thus, the objective of this study was to develop nanofibers of PLA/PEO and phycocyanin with potential application as pH indicators for food packaging. The solutions were prepared with PLA (9 %, w.v<sup>-1</sup>) and PEO (3 %, w.v<sup>-1</sup>), using a 9: 1 ratio, respectively. Phycocyanin was evaluated at concentrations 2, 3, 4, 5 and 6 % (w.v<sup>-1</sup>), and the thickness of the membrane and the type of collector used in the process (rotary and static) were evaluated. Uniform PLA/PEO fibers were developed with 2 and 3 % (w.v<sup>-1</sup>) of phycocyanin. Using rotatory collector, the average diameter of 1318 nm was obtained for the fibers with 2 % (w.v<sup>-1</sup>) of phycocyanin and 921 nm for those developed with 3 % (w.v<sup>-1</sup>) of the dye. PLA/PEO fibers with 2 and 3 % (w.v<sup>-1</sup>) of phycocyanin showed encapsulation efficiency of, 80.7 and 71.4 %, respectively. Regarding the evaluation as pH indicator, the nanofibers of PLA/PEO with 3 % (w.v<sup>-1</sup>) of the pigment were the ones that presented the best responses regarding the perception of color change ( $\Delta E$ ). The majority (60 %) of  $\Delta E$  values found for these nanofibers were above 12, indicating absolute change in color. In addition, the influence of the thickness of nanofibers in the value of  $\Delta E$  was verified. With the higher thickness of nanofibers developed from 3 % (w v<sup>-1</sup>) of phycocyanin, it was possible to obtain 76 % of  $\Delta E$  results above 12. For the variation of pH 3.0 to 4.0 the  $\Delta E$  value found was 18.85 and for variation from pH 5.0 to 6.0 the value of  $\Delta E$  was 18.66. Thus, the use of phycocyanin in PLA/PEO nanofibers as a pH indicator in food packaging is an alternative for the application of the pigment that is restricted because of the color instability against changes in pH value.

Keywords: Electrospinning. Food packaging. Phycocyanin. Color change. pH sensor.

#### 1 INTRODUÇÃO

Na busca da satisfação dos consumidores, as empresas, juntamente aos centros de pesquisa e universidades, têm investido em estudos no desenvolvimento de embalagens inteligentes. As embalagens inteligentes possuem função reforçada no que diz respeito à comunicação e *marketing*, fornecendo *feedback* dinâmico para o consumidor sobre a qualidade do produto. Através de sensores incorporados ao material, interna ou externamente, pode-se monitorar as condições do alimento por meio de selos ou etiquetas que mudam de cor para identificar qualquer tipo de alteração do alimento. As embalagens inteligentes também podem informar detalhes da origem e da qualidade do transporte e distribuição dos alimentos. Assim, o fabricante consegue rastrear o produto e obter informações sobre suas condições (BRIZIO, 2014).

A preocupação com o meio ambiente e a escassez de petróleo estão direcionando as pesquisas para o desenvolvimento de nanofibras a partir de polímeros, que sejam biodegradáveis, renováveis e compatíveis com os polímeros sintéticos. Neste contexto, destacase o poli (ácido lático) (PLA) (DAI; LIM, 2015). O PLA foi utilizado para desenvolver nanofibras para aplicações, tais como imobilização da enzima (ZHOU; LIM, 2009), liberação controlada de medicamentos (SILL; VON RECUM, 2008) e *scaffolds* (VAZ et al., 2005). Para otimizar a aplicação das nanofibras de PLA, este polímero pode formar blenda com outros polímeros como o poli (óxido de etileno) (PEO), gerando fibras mais hidrofílicas (HONARBAKHSH; POURDEYHIMI, 2011).

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos, incluindo organismos unicelulares e multicelulares, e procariotos ou eucariotos (LI et al., 2008). Um dos compostos de interesse comercial presente na biomassa de microalgas é a ficocianina. A ficocianina é um pigmento fotossintético acessório caracterizado pela sua intensa coloração azul (PATEL, et al., 2005), extraído, principalmente, a partir da microalga *Spirulina* (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014; MARTELLI et al., 2014). A ficocianina atinge aproximadamente 20 % da proteína total presente na biomassa de microalgas (VONSHAK, 1997), e é utilizada principalmente como corante natural em alimentos.

A ficocianina é sensível ao pH e essa instabilidade resulta em variação da mudança de cor (MARTELLI et al., 2014). A descoloração de ficocianina, considerado recentemente como problema para a indústria de alimentos, torna-se interessante para aplicação em embalagens inteligentes através da nanotecnologia. Indicadores de pH podem ser desenvolvidos a partir de nanofibras e aplicados em embalagens de alimentos, uma vez que a estabilidade e,

consequentemente, a coloração da ficocianina é reduzida dependendo das condições destes parâmetros. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanofibras de PLA/PEO e ficocianina com potencial aplicação como indicadores de pH para embalagem de alimentos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1 MATERIAL

O poli (ácido lático) (PLA) (6201 D) foi doado pela Nature Works LLC (Minnetonka, MN, USA). O poli (óxido de etileno) (PEO), peso molecular de 900 kDa, foi adquirido da Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canadá) e a ficocianina, da Parry Nutraceuticals (Chenai, TN, Índia). Os reagentes clorofórmio e N,N-dimetilformamida (DMF) foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil).

## 2.2 SOLUÇÕES POLIMÉRICAS E ELECTROSPINNING

As soluções foram preparadas com PLA (9 %, m.v<sup>-1</sup>) e PEO (3 %, m.v<sup>-1</sup>) (DAI; LIM, 2015) com modificações, sendo utilizada a proporção 9:1, respectivamente. A mistura de solventes utilizada foi clorofórmio:DMF (9:1). A ficocianina foi avaliada nas concentrações 2, 3, 4, 5 e 6 % (m.v<sup>-1</sup>). As soluções poliméricas sem adição do pigmento foram agitadas por 2 h a 20 $\pm$ 2 °C. Para as soluções com ficocianina, primeiramente foi adicionado metade do volume total do solvente no pigmento, e a solução foi agitada por 2 h. Posteriormente, foram adicionados os polímeros PLA e PEO na solução com ficocianina e adicionou-se o restante do volume do solvente agitando novamente por 3 h a 20 $\pm$ 2 °C.

Os parâmetros utilizados no processo de *electrospinning* foi umidade relativa de 40±2 %, 20±2 °C, diâmetro do capilar de 0,45  $\mu$ m, distância do capilar ao coletor 14 cm, potencial elétrico 15 kV e vazão de alimentação de 600  $\mu$ L h<sup>-1</sup>. No processo foram utilizados dois tipos de coletor (Figura 1): estático e rotatório (180 rpm).





## 2.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)

Para avaliar a eficiência de encapsulação (EE) da ficocianina nas nanofibras com morfologia uniforme foi utilizado 10 mg das fibras PLA/PEO solubilizadas em 4 mL de água destilada. A absorvância foi obtida em espectrofotômetro a 615 nm (A<sub>615</sub>) e 652 nm (A<sub>652</sub>), sendo determinada a concentração de ficocianina (PC, mg mL<sup>-1</sup>) segundo a Equação 1 (BENNET; BOGORAD, 1971).

$$PC = (A_{615} - 0,474 A_{652})/5,34$$
(1)

A EE (%, m.m<sup>-1</sup>) foi calculada pela razão da massa de ficocianina encapsulada em 1 mL de solução de polímero e a massa total de ficocianina adicionada na solução polimérica no início do processo de *electrospinning* (ZHU et al., 2015).

### 2.4 MORFOLOGIA, DIÂMETRO MÉDIO E TAMANHO DE PORO DAS FIBRAS

A morfologia das nanofibras foi analisada utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL, JSM-6610 LV, Japão) com tensão de aceleração de 10 kV. As amostras foram recobertas com ouro (20 nm) utilizando o metalizador *diiode sputtering* (Denton Vacuum, CAR001-0038, USA). O diâmetro médio das fibras e o tamanho dos poros (medido ao longo do comprimento da fibra) foi determinado através da medida de 50 e 30 pontos diferentes na imagem obtida pelo MEV, respectivamente, e analisado por *software* de

processamento de imagem (Image Pro-Plus 6.0, Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA). As amostras também foram visualizadas em microscópio confocal de fluorescência (Leica, TCS SP8, Germany).

## 2.5 ESTABILIDADE TÉRMICA

A medida da estabilidade térmica do PEO, PLA, ficocianina e nanofibras foi realizada em analisador termogravimétrico (Shimadzu, DTG-60, Japão) de acordo com a metodologia ASTM D3850-12 (2013). As análises foram conduzidas a temperatura ambiente até alcançar 500 °C, em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo 30 mL.min<sup>-1</sup> e taxa de aquecimento constante de 10 °C.min<sup>-1</sup>.

## 2.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE *FOURIER* (FTIR)

As nanofibras desenvolvidas foram avaliadas em espectrômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (IR Prestige-21, Shimadzu Corp., Japão), com refletância total atenuada (ATR). Varreduras na faixa espectral de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> foram realizadas e recolhidas 45 leituras a resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram analisadas na forma sólida, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr). Os dados foram analisados usando Origin software (OrginLab, USA).

#### 2.7 MOLHABILIDADE DAS FIBRAS

A hidrofilicidade e hidrofobicidade das nanofibras foram avaliadas pela análise do ângulo de contato utilizando microscópio digital Blue (x60), no qual uma gota de água destilada foi colocada sobre a superfície das fibras. A partir do software Surftens 3.0, cinco medições de cada imagem foram realizadas utilizando cinco pontos de medição dispostos ao redor da gota (FOMBUENA et al., 2013).

### 2.8 PARÂMETROS DE COR E ESPESSURA DAS NANOFIBRAS

As nanofibras com 2 e 3% (m.m<sup>-1</sup>) de ficocianina foram cortadas em 2 x 2 cm e imersas em aproximadamente 20 mL de soluções tampão (pH 1 a 10), por 1-2 min a 20 °C. A cor foi avaliada em quintuplicata, utilizando colorímetro (Minolta, CR400, Japão)d. Os dados obtidos foram: L\* que indica a leveza da amostra e varia de 0 (preto) a 100 (branco) e coordenadas de croma a\* variando de verde (-) a vermelho (+) e croma b\* variando azul (-) para amarelo (+). Os resultados de L\*, a\* e b\* foram utilizados para o cálculo da mudança de cor ( $\Delta E$ ) de acordo com a Equação 2 (PRIETTO et al., 2017).

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$
(2)

Em que:  $\Delta L^* = L - L_0$ ;  $\Delta a^* = a - a_0$ ;  $\Delta b^* = b - b_0$ .

A espessura das nanofibras foi determinada em quintuplicata utilizando micrômetro (Insize modelo 3109-25 Electronic Outside Micrometer 0 - 22 mm).

#### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 3.1 MORFOLOGIA, DIÂMETRO MÉDIO DAS NANOFIBRAS E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)

Quando desenvolvidas com PLA/PEO sem a ficocianina, as nanofibras apresentaram morfologia uniforme. Ao adicionar a ficocianina as nanofibras, o diâmetro médio foi reduzido em 43 % comparado a fibra sem adição do pigmento (Tabela 1). Os diâmetros das nanofibras de PLA/PEO com ficocianina foram menores provavelmente devido ao aumento do peso do jato de polímero à medida que ele foi expulso da ponta do capilar. Como resultado, a solução foi submetida a maior alongamento, produzindo fibras mais finas do que as preparadas sem partículas de ficocianina (WU, 1987). A redução de diâmetro de nanofibras poliméricas com adição de compostos também foi observada por Dai e Lim (2015). Esses autores verificaram redução de 1089 para 810 nm nas fibras desenvolvidas sem e com o composto, respectivamente.

As nanofibras de PLA/PEO com 2 e 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina apresentaram eficiência de encapsulação, em média, de 80,7 e 71,4 %, respectivamente. As nanofibras nestas condições apresentaram melhor definição dos poros em relação as nanofibras com maiores concentrações do composto, e por isso, foram analisados. Os tamanhos dos poros encontrados para as fibras desenvolvidas com 2 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina foram, em média, 187 e 203 nm, quando utilizado os coletores estático e rotatório, respectivamente. Com 3 % (m.v<sup>-1</sup>) do pigmento, o tamanho dos poros obtidos nas nanofibras foram, em média, 194 nm com o coletor estático e 201 nm, com o rotatório. Além disso, as nanofibras desenvolvidas com os maiores conteúdos de ficocianina (4, 5 e 6 %, m.v<sup>-1</sup>) apresentaram morfologia e diâmetros desuniformes, com a predominância de aglomerados do composto encapsulado (Figura 2).

Ficocianina	Coletor	Diâmetro	Ti (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	Tmáx (°C)
(%, m.v <sup>-1</sup> )		médio (nm)			
Sem ficocianina	Estático	$1606\pm283$	329,1	373,3	351,5
2	Estático	$1166 \pm 199$	310,2	349,3	329,5
2	Rotatório	$1318\pm350$	303,8	343,0	320,9
3	Estático	$1265\pm170$	309,0	348,2	328,0
3	Rotatório	$921\pm369$	306,9	350,0	327,5
4	Estático	$1282\pm142$	316,3	346,4	327,9
4	Rotatório	$1357\pm208$	306,3	345,3	326,3
5	Estático	$1102\pm128$	305,7	346,7	325,3
5	Rotatório	$971 \pm 145$	309,1	326,3	326,3
6	Estático	$937 \pm 144$	309,4	345,0	326,2
6	Rotatório	$981\pm401$	307,5	339,0	325,3
PLA	-	-	347,6	379,8	362,9
PEO	-	-	345,7	423,3	382,6
Ficocianina	-	-	229,0	294,3	245,1

 Tabela 1 - Características das nanofibras de PLA/PEO contendo diferentes concentrações de ficocianina.

 $T_i$ : temperatura inicial de degradação;  $T_{f}$ : temperatura final de degradação;  $T_{max}$ : temperatura máxima de degradação.

De acordo com Bhardwaj e Kundu (2010), existem diversos fatores que afetam o processo de *electrospinning*. Esses fatores são classificados como parâmetros do processo, da solução e ambientais. Os parâmetros do processo incluem o potencial elétrico aplicado, a taxa de alimentação e a distância entre o capilar e o coletor. Os parâmetros da solução incluem a concentração do polímero, a viscosidade, a tensão superficial e a condutividade da solução. Os parâmetros ambientais incluem a umidade relativa e a temperatura. Cada um desses parâmetros afeta significativamente a morfologia e diâmetro das fibras. Pela manipulação adequada desses parâmetros obtêm-se nanofibras de morfologia e diâmetros desejados.

Segundo Khan et al. (2013), a morfologia e o diâmetro das nanofibras podem ser relacionados com a concentração da solução polimérica. Elevar a concentração de biocompostos na solução acarreta aumento na viscosidade (PRIETTO et al., 2017), o que contribui para o emaranhamento entre as cadeias de polímero (HAIDER et al., 2013). Entretanto, se elevar a concentração do polímero acima do valor crítico, o fluxo de solução
através do capilar não ocorre, obstruindo-o. Assim ao utilizar concentrações maiores que 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina tal fato pode ter acontecido no decorrer do processo, gerando fibras com diâmetros desuniformes.

Figura 2 - Nanofibras de PLA/PEO sem ficocianina (a) e com 2 % (m.v<sup>-1</sup>) (b), 3 % (m.v<sup>-1</sup>) (c), 4 % (m.v<sup>-1</sup>) (d), 5 % (m.v<sup>-1</sup>) (e) e 6 % (m.v<sup>-1</sup>) (f) do pigmento produzidas por *electrospinning* em coletor estático.



Com a concentração de 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina observou-se que ao realizar o processo de *electrospinning* com o coletor rotatório foi possível obter nanofibras com diâmetro médio 27 % menor que as obtidas pelo coletor estático. As morfologias das fibras desenvolvidas em ambos os tipos de coletores foram semelhantes. Ao incrementar o conteúdo de ficocianina

na solução polimérica foi constatado que houve a formação de aglomerados nas fibras, que mostra ser o encapsulamento do biocomposto adicionado (Figura 3).

Figura 3 - Nanofibras de PLA/PEO contendo 2 % (m.v<sup>-1</sup>) (a), 3 % (m.v<sup>-1</sup>) (b), 4 % (m.v<sup>-1</sup>) (c), 5 % (m.v<sup>-1</sup>) (d) e 6 % (m.v<sup>-1</sup>) (e) do pigmento produzidas por *electrospinning* em coletor rotatório.



A porosidade observada nas fibras ultrafinas de PLA/PEO e ficocianina pode ser explicada pelos solventes utilizados no preparo da solução polimérica. Park, Han e Lee (2007) mostraram que ao adicionar um segundo solvente com pressão de vapor mais alta como o DMF (475 hPa) em relação ao solvente primário clorofórmio (213 hPa), é formado um sistema binário em que o solvente com maior volatilidade evapora rapidamente durante o processo de *electrospinning* e os poros são formados na superfície da fibra. Essa afirmação é confirmada

quando visualizado as micrografias das fibras de PLA/PEO desenvolvidas com e sem a ficocianina, que foram preparadas com os solventes clorofórmio:DMF, na proporção 9:1, respectivamente. A capacidade de produzir poros de tamanho nano ao longo do comprimento da fibra, oferece oportunidades para esses materiais em diversas aplicações (HONARBAKHSH; POURDEYHIMI, 2011), tais como sensores de pH para embalagens de alimentos.

A ficocianina é um pigmento que absorve luz a 620 nm e emite fluorescência na cor vermelha a cerca de 650 nm (GREGOR; MARSALEK 2004; GREGOR et al., 2007). Desta forma, a microscopia confocal (Figura 4) comprova o encapsulamento da ficocianina, ilustrando a distribuição do pigmento ao longo das fibras ultrafinas.

**Figura 4** - Microscopia confocal das nanofibras de PLA/PEO sem ficocianina (a) e com 2 %  $(m.v^{-1})$  (b), 3 %  $(m.v^{-1})$  (c), 4 %  $(m.v^{-1})$  (d), 5 %  $(m.v^{-1})$  (e) e 6 %  $(m.v^{-1})$  (f) do pigmento.



As micrografias apresentaram intensidades na cor vermelha, no entanto distribuídas em forma desigual. De acordo com Prietto et al. (2017), isso pode ser relacionado a formação dos aglomerados, possivelmente devido a solubilização incompleta do pigmento durante o preparo da solução polimérica.

## 3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA

O encapsulamento da ficocianina nas fibras de PLA/PEO conferiram estabilidade térmica ao biocomposto. No mínimo, as nanofibras contribuíram com aumento de 74,8; 48,7 e 75,8 (°C) nas temperaturas inicial (T<sub>i</sub>), final (T<sub>f</sub>) e de degradação máxima (T<sub>max</sub>) da ficocianina. Esses resultados foram obtidos das nanofibras desenvolvidas em coletor rotatório e 2 % (m.v<sup>-1</sup>) do corante (Tabela 1).

Peinado et al. (2016) comprovaram que a preservação de antioxidantes, como  $\beta$ caroteno pode ser realizada incorporando o composto em nanofibras de PEO, prolongando a vida útil e estabilidade térmica do antioxidante. Braga et al. (2016), também provou que o encapsulamento em nanofibras é a melhor alternativa para conservação da ficocianina frente a outros meios de preservação tais como utilização de agentes estabilizantes como sorbitol e glicose.

# 3.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE *FOURIER* (FTIR)

O PLA é um poliéster alifático que contém ligações de ésteres, assim todas as nanofibras desenvolvidas apresentaram as bandas de absorção de carbonila (C=O) a 1758 cm<sup>-1</sup>, enquanto que as bandas de alongamento C-O-C apareceram a 1087 cm<sup>-1</sup> (Figura 5). As bandas em 1455 e 1363 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas a vibração deformacional assimétrica e simétrica de C-H em grupos CH<sub>3</sub> do PLA. O PEO é um polímero com a fórmula molecular (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)<sub>n</sub>. Banda características de absorção C-O-C foram localizadas em 1090 e 1134 cm<sup>-1</sup> (JASH; LIM, 2018; LIM; DAI, 2015).

Uma vez que as nanofibras de PLA/PEO foram enriquecidas com ficocianina, que é uma ficobiliproteína, picos em 1653 e 1543 cm<sup>-1</sup> também foram encontrados, correspondendo aos grupamentos amida I e II, respectivamente (VERDUGO et al., 2014). Além disso, não foi observada alteração para as grandes bandas de absorção de PLA e PEO após a incorporação da ficocianina, sugerindo que o composto foi aprisionado na matriz polimérica (JASH; LIM, 2018).





#### 3.4 MOLHABILIDADE

O ângulo de contato encontrado para as nanofibras de PLA/PEO desenvolvidas sem adição de ficocianina foi 92,2 $\pm$ 2,6°. De acordo com Yuan e Lee (2013), materiais com ângulos de contato maiores que 90° são considerados hidrofóbicos, desfavorecendo a molhabilidade da superfície e formando uma gota de líquido compacta. Por outro lado, para as nanofibras de PLA/PEO adicionadas de ficocianina os valores obtidos foram 84,7 $\pm$ 1,8°; 81,3 $\pm$ 2,5°; 66,4 $\pm$ 1,4°; 43,6 $\pm$ 0,7° e 20,1 $\pm$ 1,3° para as amostras com 2, 3, 4, 5 e 6 % (m.v<sup>-1</sup>) do pigmento, respectivamente.

A hidrofilicidade das nanofibras pode ser atribuída à morfologia da superfície, porosidade das fibras e aos compostos hidrofílicos adicionados na solução polimérica. A diferença de hidrofilicidade entre as amostras (Figura 6) pode ser atribuída, principalmente, à concentração de ficocianina utilizada para a produção das fibras.

No geral, foi observado que quanto maior a concentração de ficocianina, maior foi a molhabilidade da nanofibra. O aumento da molhabilidade pode ser útil para aplicações em indicadores de embalagem de alimentos para facilitar a difusão de H<sup>+</sup> ou OH<sup>-</sup> na membrana, permitindo que esses íons interajam com a ficocianina, gerando uma resposta de cor rápida como função do pH (PRIETTO et al., 2017). Desta forma, para realização dos experimentos relativos a indicador de pH, as nanofibras com 2 e 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina foram selecionadas, devido ao fato de que a gota de água depositada sobre a superficie das demais nanofibras se espalharam rapidamente de forma com que o ângulo de contato tendesse a zero. Além disso, as nanofibras de PLA/PEO com 2 e 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina apresentaram melhor morfologia e uniformidade no diâmetro das nanofibras.

**Figura 6** - Ângulo de contato das nanofibras de PLA/PEO sem ficocianina (a) e com 2 %  $(m.v^{-1})$  (b), 3 %  $(m.v^{-1})$  (c), 4 %  $(m.v^{-1})$  (d), 5 %  $(m.v^{-1})$  (e) e 6 %  $(m.v^{-1})$  (f) do pigmento.



#### 3.5 ESPESSURA E ANÁLISE DE COR

Ao comparar as espessuras obtidas a partir do mesmo volume de solução polimérica utilizado foi observado diferença nos valores encontrados (Tabela 2). As diferenças podem ser atribuídas ao processo, que pode ter ocasionado perda de amostra de nanofibra com 3 % ( $m.v^{-1}$ ) de ficocianina depositada fora do coletor rotatório. No entanto, houve coerência nos resultados de espessura, ao se observar que o aumento do volume de solução polimérica foi proporcional ao valor de espessura obtido.

De acordo com Tassanawat et al. (2007), valor de  $\Delta E$  superior a 5 indica mudança de cor perceptível pelo olho humano, e  $\Delta E$  superior a 12 indica diferença absoluta de cor. As nanofíbras de PLA/PEO com 3 % (m.v<sup>-1</sup>) do pigmento foram as que apresentaram as melhores

respostas quanto a percepção de mudança de cor ( $\Delta E$ ). A maioria (60 %) dos valores de  $\Delta E$ encontrada para essas nanofibras foram superiores a 12 (Tabela 3). Quando as nanofibras com 2 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina foram imersas nos diferentes pH foi verificado que 36 % dos valores de mudança de cor ( $\Delta E$ ) foram superiores a 5, e 47 % dos  $\Delta E$  apresentaram resultado acima de 12 (Tabela 4). O fato pode ser atribuído ao menor teor do pigmento presente nas nanofibras de 2 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina. Além disso, as nanofibras com 2 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina não apresentaram coerência na variação de cor quando comparadas as duas condições de espessuras testadas. Prietto et al. (2017) desenvolveram indicadores de pH a partir de encapsulamento de antocianina extraída de repolho vermelho. Os autores também observaram que a maior concentração do composto resultou em maior variação de cor entre pH 1,0 e 10,0.

Na faixa de pH 1,0 a 3,0 as nanofibras de PLA/PEO contendo 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina mostraram tendência a coloração esverdeada (Tabela 2). Segundo Silva et al. (2009), a ficocianina extraída de *Spirulina platensis* é instável a valores extremos de pH, sendo mais estável em pH 5 a 7,5. Além disso, os autores também relataram coloração verde a pH 3,0.

Em pH alcalino, acima de 8,0 as nanofibras tenderam a perder bruscamente o tom azul e verde, resultando em cor com tendência ao branco. As respostas obtidas de mudança de cor nos diferentes pHs também podem ser influenciadas pela interação polímeros e pigmento com o solvente, uma vez que em solução a ficocianina apresenta coloração azul mais intensa, do que em solução polimérica, e em nanofibras. Neste contexto, as nanofibras desenvolvidas neste estudo são promissoras para atuarem como indicadores de pH, uma vez que há perceptível mudança de coloração com a alteração deste parâmetro.

Além disso, foi constatado influência da espessura na resposta da fibra como indicador de pH. Com a maior espessura das nanofibras desenvolvidas a partir de 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina foi possível obter 20 % dos resultados de  $\Delta E$  superiores a 5 e 76 % acima de 12. Ao reduzir a espessura para aproximadamente a metade, foi constatado que 44 % dos valores de  $\Delta E$  foram maiores que 12.

Ficocianina (%, m.v <sup>-1</sup> )	Volume de solução (mL)	Espessura (µm)	рН									
			1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
2	1,5	53,4 ± 3,9										
2	3,0	91,4 ± 6,5					33				12	
3	1,5	36,0 ± 2,1										
3	3,0	69,2 ± 6,5										

 Tabela 2 – Membranas de nanofibras de PLA/PEO contendo diferentes concentrações de ficocianina e espessuras frente a variação de pH.

pН	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0			
1,5 mL de solução polimérica (espessura de 36,0 μm)												
1,0	2,21	3,19	9,11	26,48	11,84	19,91	9,83	12,87	9,10			
2,0		2,46	9,92	26,28	12,03	20,90	11,71	12,78	8,80			
3,0			7,74	25,69	9,66	18,81	10,06	10,85	6,67			
4,0				19,44	5,12	12,09	3,18	14,12	5,59			
5,0					17,55	7,60	32,80	32,80	24,29			
6,0						10,41	3,09	15,61	7,65			
7,0							9,38	25,28	16,76			
8,0								16,07	7,48			
9,0									8,66			
	3,0 mL de solução polimérica (espessura de 69,2 μm)											
1,0	11,0	11,74	29,73	37,49	23,35	25,12	6,18	22,71	19,49			
2,0		18,31	34,88	37,49	25,24	25,54	19,33	23,05	14,86			
3,0			18,85	26,14	13,41	15,72	13,27	12,62	16,62			
4,0				8,40	12,32	16,25	21,34	13,17	27,24			
5,0					18,66	21,15	19,30	19,30	33,59			
6,0						5,15	9,27	1,74	15,16			
7,0							8,07	4,27	13,09			
8,0								8,53	5,93			
9,0									14,33			

**Tabela 3** - Mudança de cor ( $\Delta E$ ) das membranas de nanofibras de PLA/PEO contendo 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina com diferentes espessuras em

рН	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0		
1,5 mL de solução polimérica (espessura de 53,4 μm)											
1,0	9,95	3,69	6,40	6,83	7,29	10,25	17,39	8,96	13,49		
2,0		6,83	10,84	6,83	14,49	15,72	19,23	8,96	20,07		
3,0			5,18	4,20	8,06	10,11	20,07	6,39	14,32		
4,0				2,57	4,13	5,23	15,44	4,87	10,29		
5,0					6,69	7,47	3,95	3,95	12,58		
6,0						3,49	12,24	8,08	7,20		
7,0							10,29	7,66	5,64		
8,0								17,42	6,56		
9,0									11,87		
	3,0 mL de solução polimérica (espessura de 91,4 μm)										
1,0	11,46	9,15	28,19	21,95	24,99	19,13	14,97	20,72	19,36		
2,0		6,29	17,67	21,95	14,77	9,58	20,67	20,66	9,21		
3,0			23,15	15,86	19,66	13,02	14,77	13,98	12,34		
4,0				7,65	4,94	11,98	12,18	10,29	12,46		
5,0					5,69	6,65	4,09	4,09	6,15		
6,0						7,43	7,30	6,44	8,31		
7,0							2,36	3,18	2,37		
8,0								4,71	4,13		
9,0									2,25		

**Tabela 4 -** Mudança de cor ( $\Delta E$ ) das membranas de nanofibras de PLA/PEO contendo 2 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina com diferentes espessuras emfunção do pH.

Assim, as nanofibras mais espessas de PLA/PEO contendo ficocianina, independentemente da concentração do pigmento, poderiam ser aplicadas como etiquetas em embalagem de sucos cítricos. O  $\Delta E$  entre pH 3 e 4 foi maior que 12, demonstrando diferença absoluta entre as cores (TASSANAWAT et al., 2007). De acordo com Corrêa-Neto e Faria (1999) e Vegara et al. (2014), a faixa de pH característica de frutas cítricas varia de 3,40 a 4,0 e, o aumento da acidez em sucos armazenados (especialmente por surgimento de ácido acético ou lático) é um indicador de contaminação por leveduras e/ou bactérias.

O indicador desenvolvido também poderia ser aplicado em alimentos mais alcalinos, como a carne bovina. As nanofibras apresentaram  $\Delta E$  superior a 12 entre pH 5,0 e 6,0. Segundo Guerrero e Chabela (1999) a deterioração da carne ocorre entre pH 5,61 a 6,23. Desta forma, a utilização da ficocianina em sistemas de nanofibras como indicador de pH em embalagem de sucos cítricos ou carne bovina é alternativa para aplicação do pigmento que é restrita devido à instabilidade da cor frente a mudanças no valor do pH.

#### 4 CONCLUSÃO

Nanofibras de PLA/PEO de diâmetro médio de 921 nm e espessura de 69,2  $\mu$ m, contendo 3 % (m.v<sup>-1</sup>) de ficocianina podem ser produzidas a fim de desenvolver indicadores de pH para potencial aplicação em embalagem de alimentos. Com estas condições, foi possível obter 76 % dos valores de mudança de cor ( $\Delta$ E) acima de 12, indicando mudança absoluta de cor das nanofibras. Para a variação de pH 3-4 o valor de  $\Delta$ E obtido foi 18,85 e para pH 5-6, foi 18,66. Desta forma, indicadores de pH a partir de nanofibras contendo ficocianina são materiais inovadores que podem ser utilizados para fornecer *feedback* dinâmico ao consumidor sobre a qualidade de produtos alimentícios.

## **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**ASTM D3850 – 12. American Society for Testing and Materials**. Standard test method for rapid thermal degradation of solid electrical insulating materials by thermogravimetric method. West Conshohocken. 2013.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. **Biochemistry**, 10(19), 3625-34, 1971.

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

BRAGA, A. R. C.; FIGUEIRA, F. S.; SILVEIRA, J. T.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Improvement of thermal stability of C-phycocyanin by nanofiber and

preservative agents. Journal of Food Processing and Preservation, v. 40, p. 1264–1269, 2016.

BRIZIO, A. P. D. R. Embalagens ativas e inteligentes: Tecnologias emergentes para o controle dinâmico da qualidade de alimentos. Ed. da FURG, Rio Grande, 110p, 2014.

CORRÊA-NETO, R.S.; FARIA. J.A.F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 153-160, 1999.

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

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

GREGOR, J., MARŠÁLEK, B.; ŠÍPKOVÁ, H. Detection and estimation of potentially toxic cyanobacteria in raw water at the drinking water treatment plant by in vivo fluorescence method. **Water Research**, v. 41, p. 228–234, 2007.

GREGOR, J.; MARŠÁLEK, B. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. **Water Research**, v. 38, p. 517–522, 2004.

GUERRERO, I.; CHABELA, L. P. Meat and poultry/Spoilage of cooked meats and meat products. In R. K. Robinson (Ed.), **Encyclopedia of food microbiology** (pp. 1266-1272). Oxford: Elsevier, 1999.

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

HONARBAKHSH, S.; POURDEYHIMI, B. Scaffolds for drug delivery, part I: electrospun porous poly(lactic acid) and poly(lactic acid)/poly(ethylene oxide) hybrid scaffolds. **Journal of Materials Science**, v. 46, p. 2874-2881, 2011.

JASH, A.; LIM, L,-T. Triggered release of hexanal from an imidazolidine precursor encapsulated in poly(lactic acid) and ethylcellulose carriers. **Journal of Materials Science**, v. 53, p. 2221–2235, 2018.

KHAN, W. S.; ASMATULU, R.; CEYLAN, M.; JABBARNIA, A. Recent Progress on Conventional and Non-Conventional Electrospinning Processes. **Fibers and Polymers**, v. 14, p. 1235-1247, 2013.

MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 154-159, 2014.

PARK, J. Y.; HAN, S. W.; LEE, I. H. Preparation of electrospun porous ethyl cellulose fiber by THF/DMAc binary solvent system. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 13, p. 1002-1008, 2007.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 248–255, 2005.

PEINADO, I.; MASON, M.; ROMANO, A.; BIASIOLI, F.; SCAMPICCHIO, M. Stability of  $\beta$ -carotene in polyethylene oxide electrospun nanofibers. **Applied Surface Science**, v. 370, p. 111-116, 2016.

PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; HALAL, S. L. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DIAS, A. R. G.; ZAVEREZE, E. R. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 1, p. 1-9, 2017.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, H.; PEDRAZA-CHAVERR, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 375-392, 2014.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p. 1989-2006, 2008.

SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Experimental Design as a Tool for Optimization of C-Phycocyanin Purification by Precipitation from *Spirulina platensis*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 20, p. 5-12, 2009.

TASSANAWAT, S.; PHANDEE, A.; MAGARAPHAN, R.; NITHITANAKUL, M.; MANUSPIYA, H. pH-sensitive PP/clay nanocomposites for beverage smart packaging, in: **Proceedings of the 2nd IEEE International, Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems**, 2007.

VAZ, C. M.; VAN TUIJL, S.; BOUTEN, C. V. C.; BAAIJENS, F. P. T. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. Acta **Biomaterialia**, v. 1, p. 575–582, 2005.

VEGARA, S.; MARTI, N.; LORENTE, J.; COLL, L.; STREITENBERGER, S.; VALERO, M.; SAURA, D. Chemical Guide Parameters for Punica granatum cv. 'Mollar' Fruit Juices Processed at Industrial Scale. **Food Chemistry**, v. 147, p. 203-208, 2014.

VERDUGO, M.; LIM, L.-T.; RUBILAR, M. Electrospun protein concentrate fibers from microalgae residual biomass. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 22, p. 373–383, 2014.

VONSHAK A. *Spirulina platensis (Arthrospira*): Physiology Cell-Biology and Biotechnology. Londres: Taylor & Francis, 1997.

WU, S. Entanglement, friction, and free volume between dissimilar chains in compatible polymer blends. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 25, p. 2511–2529, 1987.

YUAN, Y.; LEE, T. R. Contact Angle and Wetting Properties. Surface Science Techniques. (1st ed), 51, 3-34, 2013.

ZHOU, Y.; LIM, L. -T. Activation of lactoperoxidase system in milk by glucose oxidase immobilized in electrospun polylactide microfibers. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 170-176, 2009.

ZHU, W.; ASOOD, F.; O'BRIEN, J.; ZHAN, G. Highly aligned nanocomposite scaffolds by electrospinning and electrospraying for neural tissue regeneration. **Regenerative Nanomedicine**, v. 11, p. 693-704, 2015.

CAPÍTULO IV

#### **CONCLUSÃO GERAL**

Nanofibras com 5 e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 foram desenvolvidas com concentração mínima de 0,8 % (m.m<sup>-1</sup>) de PEO, em solução ácida. Ao incrementar o conteúdo proteico houve aumento no diâmetro das nanofibras. Com 5 % (m.m<sup>-1</sup>), obteve-se diâmetro de 118  $\pm$  27 nm e com 10 % (m.m<sup>-1</sup>), 452  $\pm$  102 nm. O aquecimento do PEO mostrou influência apenas quando aplicado a menor concentração de proteína, reduzindo a formação de gotas, aglomerados e nanopartículas. Em solução ácida, nanofibras uniformes foram formadas com 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de microalga, independentemente do aquecimento do PEO.

Nanofibras uniformes contendo 2 % (m.m<sup>-1</sup>) de ficocianina, com diâmetros de 269, 314 e 542 nm foram desenvolvidas, quando utilizado 5, 7,5 e 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada de *Sipirulina* sp LEB 18, respectivamente. Além disso, nanofibras desenvolvidas com 10 % (m.m<sup>-1</sup>) de proteína concentrada e ficocianina (2 %, m.v<sup>-1</sup>) podem ser empregadas como materiais antioxidantes em embalagem de alimentos.

Nanofibras de PLA/PEO contendo ficocianina foram desenvolvidas com diâmetro médio entre 921 e 1357 nm. As fibras que apresentaram morfologia e diâmetros uniformes foram obtidas com adição das menores concentrações do corante (2 e 3 %, m.v<sup>-1</sup>). As fibras de PLA/PEO com 3 % (m.v<sup>-1</sup>) do pigmento foram as que apresentaram as melhores respostas quanto a percepção de mudança de cor ( $\Delta E$ ). A maioria (60 %) dos valores de  $\Delta E$  encontrada para essas nanofibras foram superiores a 12. Além disso, a mudança de cor foi mais perceptível com as nanofibras de maior espessura. Desta forma, nanofibras de PLA/PEO, contendo ficocianina na concentração 3 % (m.v<sup>-1</sup>) e espessura de 69,2 µm é alternativa promissora para aplicação na área de embalagem inteligentes.

CAPÍTULO V

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, p. 109-120, 1998.

AGARWAL, A.; RAHEJA, A.; NATARAJAN, T. S.; CHANDRA, T. S. Development of universal pH sensing electrospun nanofibers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 161, p. 1097–1101, 2012.

AGUIRRE-CHAGALA, Y. E.; ALTUZAR, V.; LEÓN-SARABIA, E.; TINOCO-MAGAÑA, J. C.; YAÑEZ-LIMÓN, J. M.; MENDOZA-BARRERA C. Physicochemical properties of polycaprolactone/collagen/elastin nanofibers fabricated by electrospinning. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 897-907, 2017.

AHMED, I.; LIN, H.; ZOU, L.; BRODY, A. L.; LI, Z.; QAZI, I. M.; PAVASE, T. R.; LV, L. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. **Food Control**, v. 82, p. 163–178, 2017.

AKCELRUD, L. Fundamentos da Ciência dos Polímeros. Barueri: Manole Ltda, 2007.

AL-DEYAB, S. S.; EL-NEWEHY, M. H.; NIRMALA, R.; ABDEL-MEGEED, A.; KIM, H. Y. Preparation of nylon-6/chitosan composites by nanospider technology and their use as candidate for antibacterial agents. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 422–428, 2013.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E. M.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticle technologies for cancer therapy. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 197, p. 55-86, 2010.

ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 43-47, 2008.

AOAC. THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Gaithersburg, MD, USA: Association of Analytical Communities, 2000.

ASSIS, L.M., ZAVAREZE, E.R., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C., SOUZA-SOARES, L. A. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 99-109, 2012.

**ASTM D3850 – 12. American Society for Testing and Materials**. Standard test method for rapid thermal degradation of solid electrical insulating materials by thermogravimetric method. West Conshohocken. 2013.

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

BAHLOULI, M. I.; BEKKOUR, K.; BENCHABANE, A.; HEMAR Y.; NEMDILI, A. The effect of temperature on the rheological behavior of polyethylene oxide (PEO) solutions. **Applied Rheology**, v.23, p. 1–15, 2013.

BAICHA, Z.; SALAR-GARCÍA, M. J.; ORTIZ-MARTÍNEZ, V. M.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J.; RÍOS, A. P.; LABJAR, N.; ELMAHI, M. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: a promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104–116, 2016.

BAJI, A.; MAI, Y.-W.; WONG, S.-C.; ABTAHI, M.; CHEN, P. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. **Composites Science and Technology**, v. 70, p. 703–718, 2010.

BENELHADJ, S.; FELLI, N.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBLE, D.; GHARSALLAOUI, A. Properties of lysozyme/*Arthrospira platensis* (*Spirulina*) protein complexes for antimicrobial edible food packaging. **Algal Research**, v. 15, p. 43–49, 2016.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. **Biochemistry**, 10(19), 3625-34, 1971.

BERTOLIN, T. E.; FARIAS, D.; GUARIENTI, C, PETRY, F. T. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Antioxidant effect of phycocyanin on oxidative stress induced with monosodium glutamate in rats. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 54, p.733-738, 2011.

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

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycocyanin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 20–25, 2000.

BIKIARIS, D. N.; TRIANTAFYLLIDIS, K. S. HDPE/Cu-nanofiber nanocomposites with enhanced antibacterial and oxygen barrier properties appropriate for food packaging applications. **Materials Letters**, v. 93, p. 1-4, 2013.

BOWLES, M.; LU, J. Removing the blinders: A literature review on the potential of nanoscale technologies for the management of supply chains. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 82, p. 190–198, 2014.

BRAGA, A. R. C.; FIGUEIRA, F. S.; SILVEIRA, J. T.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Improvement of thermal stability of C-phycocyanin by nanofiber and preservative agents. Journal of Food Processing and Preservation, v. 40, p. 1264–1269, 2016.

BRIZIO, A. P. D. R. Embalagens ativas e inteligentes: Tecnologias emergentes para o controle dinâmico da qualidade de alimentos. Ed. da FURG, Rio Grande, 110p, 2014.

CASTRO-AGUIRRE, E.; IÑIGUEZ-FRANCO, F.; SAMSUDIN, H.; FANG, X.; AURAS, R. Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 333-366, 2016.

CHADWICK, R.; HENSON, S.; MOSELEY, B.; KOENEN, G.; LIAKOPOULOS, M.; MIDDEN, C.; PALOU, A.; RECHKEMMER, G.; SCHRÖDER, D.; WRIGHT, A. Functional Foods. New York: Springer, 2003.

CHAIKLAHAN R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 659-664, 2012.

CHEN, C.-Y.; YEH. K.-L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, p.71–81, 2011.

CHEN, H. W.; YANG, T. S.; CHEN, M. J.; CHANG, Y. C.; WANG, E. I. C.; HO, C. L.; LAI, Y. J.; YU, C. C.; CHOU, J. C.; CHAO, L. K. P.; LIAO, P. C. Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1337–1344, 2014.

CHEN, T.; WONG, Y-S. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of seleniumcontaining phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.56, p. 4352–4358, 2008.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. Annual Review of Microbiology, v. 39, p. 503–526, 1985.

CIOFFI, N.; TORSI, L.; DITARANTO, N.; TANTILLO, G.; GHIBELLI, L.; SABBATINI, L.; BLEVE-ZACHEO, T.; D'ALESSIO, M.; ZAMBONIN, P. G.; TRAVERSA, E. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 5255-5262, 2005.

CONN, R. E.; KOLSTAD, J. J.; BORZELLECA, J. F.; DIXLER, D. S.; FILER, L. J.; LADU, B. N.; PARIZA. M. W. Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 273–83, 1995.

CORRÊA-NETO, R.S.; FARIA. J.A.F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 153-160, 1999.

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

DEVARAYAN, K.; KIM, B.-S. Reversible and universal pH sensing cellulose nanofibers for health monitor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, p. 281-286, 2015.

DUANGSEE, R.; PHOOPAT. N.; NINGSANOND, S. Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* and extract stability under various pH and temperature. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 2, p. 819-826, 2009.

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

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, p. 459-469, 2010.

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

EARTHRISE. Available at: http://www.earthrise.com. Acesso em: 20 out. 2017.

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

FDA. 2002. **Inventory of Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications No. 178**. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=fcsListing&id=178. Acesso em: 10 de dez. 2017.

FELLOWS, P.J. Tecnologia do processamento de alimentos. Artmed, 2006.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, H.; PEDRAZA-CHAVERR, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 375-392, 2014.

FIGUEIRA, F. S.; GETTENS, J. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Production of nanofibers containing the bioactive compound C-phycocyanin. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, p. 944-949, 2016.

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

GOIRIS, K.; VAN COLEN, W.; WILCHES, I.; LEÓN-TAMARIZ, F.; COOMAN, L. D.; MUYLAERT, K. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. **Algal Research**, v. 7, p. 51–57, 2015.

GREGOR, J., MARŠÁLEK, B.; ŠÍPKOVÁ, H. Detection and estimation of potentially toxic cyanobacteria in raw water at the drinking water treatment plant by in vivo fluorescence method. **Water Research**, v. 41, p. 228–234, 2007.

GREGOR, J.; MARŠÁLEK, B. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. **Water Research**, v. 38, p. 517–522, 2004.

GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. **Angewandte Chemie**, 46, 5670–5703, 2007.

GUERRERO, I.; CHABELA, L. P. Meat and poultry/Spoilage of cooked meats and meat products. In R. K. Robinson (Ed.), **Encyclopedia of food microbiology** (pp. 1266-1272). Oxford: Elsevier, 1999.

GUO, L.; CHEN, F.; ZHOU, Y.Z.; LIU, X.; XU, W. The influence of interface and thermal conductivity of filler on the nonisothermal crystallization kinetics of polypropylene/natural protein fiber composites. **Composites Part B: Engineering**, v. 68, p. 300–309, 2015.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I.-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal Chemistry**, 2015, https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015

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

HAN, J. H. Innovations in food packaging. San Diego: Academic Press, 2005.

HEISING, J. K.; DEKKER, M.; BARTELS, P. V.; VAN BOEKEL, M. A. Monitoring the quality of perishable foods: opportunities for intelligent packaging. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 645-654, 2014.

HEY, M.J.; ILET, S.M.; DAVIDSON, G. Effect of temperature on poly(ethylene oxide) chains in aqueous solution. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, v. 91, p. 3897–3900, 1995.

HONARBAKHSH, S.; POURDEYHIMI, B. Scaffolds for drug delivery, part I: electrospun porous poly(lactic acid) and poly(lactic acid)/poly(ethylene oxide) hybrid scaffolds. **Journal of Materials Science**, v. 46, p. 2874-2881, 2011.

HOSSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of spirulina microalgae. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 1231–1237, 2013.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621–639, 2008.

HUANG, Z.-M., ZHANG, Y. Z., RAMAKRISHNA, S., LIM, C.T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. **Polymer**, v. 45, p. 5361–5368, 2004.

HUSSEIN, M. M. A.; ALI, H. A.; AHMED, M. M. Ameliorative effects of phycocyanin against gibberellic acid induce hepatotoxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 119, p. 28-32, 2015.

JASH, A.; LIM, L,-T. Triggered release of hexanal from an imidazolidine precursor encapsulated in poly(lactic acid) and ethylcellulose carriers. **Journal of Materials Science**, v. 53, p. 2221–2235, 2018.

YANG, K.; LEJEUNE, J.; ALSDORF, D.; LU, B.; SHUM, C.K.; LIANG, S. Global distribution ofoutbreaks of water-associated infectious diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.6, p. e1483, 2012.

KARAMANLIOGLU, M.; PREZIOSI, R.; ROBSON, G. D. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 137, 122-130, 2017

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: a review. **Meat Science**, 74, p. 113-130, 2006.

KHAN, W. S.; ASMATULU, R.; CEYLAN, M.; JABBARNIA, A. Recent Progress on Conventional and Non-Conventional Electrospinning Processes. **Fibers and Polymers**, v. 14, p. 1235-1247, 2013.

KIM, H. K.; SATHAYE, S. D.; HWANG, Y. K.; JHUNG, S. H.; HWANG, J. S.; KWON, S. H.; PARK, S. E.; CHANG, J. S. Humidity sensing properties of nanoporous TiO<sub>2</sub>–SnO<sub>2</sub> ceramic sensors. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 26, p. 1881-1884, 2015.

KOH, J. J.; ZHANG, X.; HE, C. Fully biodegradable Poly(lactic acid)/Starch blends: A review of toughening strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 99–113, 2018.

KONG, B.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6059–6068, 2006.

KOTHADIA, A. D.; SHENOY, A. M.; SHABARAYA, A. R.; PATEL, N. H. Evaluation of cataract preventive action of phycocyanin. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 3, p. 42-44, 2011.

KRIMM, S.; BANDEKAR, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 38, p. 181–364, 1986.

LARKUM, A. W.; ROSS, I. L.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v, 30, p. 198–205, 2012.

LI, B.; GAOK, M. H.; ZHANG, X. C.; CHU, X. M. Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells *in vitro*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 43, p. 155–164, 2006.

LI, D.; XIA, Y. lectrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? Advanced Materials, v. 16, p. 1151–1170, 2004.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 815–820, 2008.

LI, Z.; WANG, C. Effects of Working Parameters on Electrospinning, in: LI, Z., WANG, C., (Eds.), **One-Dimensional Nanostructures**. Heidelberg: Springer, 2013.

LIM, L.-T. Active and intelligent packaging materials. In <u>Comprehensive biotechnology</u>, 2. ed. The Netherlands: Elsevier 2011.

LIU, C.; MA, X. Study on the mechanism of microwave modified wheat protein fiber to improve its mechanical properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 99–107, 2016.

LIU, J.; MENG, C.; LIU, S.; KAN, J.; JIN, C. Preparation and characterization of protocatechuic acid grafted chitosan films with antioxidant activity. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 457-466, 2017.

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

LOPEZ-RUBIO, A., LAGARON, J. M. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 13, p. 200-206, 2012.

LU, D. R.; XIAO, C. M.; XU, S. J. Starch-based completely biodegradable polymermaterials. **Express Polymer Letters**, v. 3, p. 366-375, 2009.

MACCOLL, R. Cyanobacterial Phycobilisomes. Journal of Structural Biology, v. 124, p. 311-334, 1998.

MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; YINGHUA, L.; KEJU, J. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 282-296, 2016.

MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 154-159, 2014.

MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by the cyanobacterium *Spirulina* strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p.1-6, 2014.

MASCHERONI, E.; FUENMAYOR, C. A.; COSIO, M. S.; DI SILVESTRO, G.; PIERGIOVANNI, L.; MANNINO, S.; SCHIRALDI, A. Encapsulation of volatiles in nanofibrous polysaccharide membranes for humidity-triggered release. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 17–25, 2013.

MASUDA, T.; MARUYAMA, H.; ARAI, F.; ANADA, T.; FUKUDA, T.; SUZUKI, O. Development of a pH indicator immobilized-gel-sheet for microenvironment analysis, **IEEE**, p. 362-368, 2009.

MATABOLA, K. P.; MOUTLOALI, R. M. The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly (vinyledene fluoride) nanofibers-effect of sodium chloride. **Journal of Materials Science**, v. 48, p. 5475-5482, 2013.

MEIXNER, K.; FRITZ, I.; DAFFERT, C.; MARKL, K.; FUCHS, W.; DROSG, B. Processing recommendations for using low-solids digestate as nutrient solution for poly-ß-hydroxybutyrate production with *Synechocystis salina*. **Journal of Biotechnology**, v. 240, p. 61–67, 2016.

MIHINDUKULASURIYA, S. D. F.; LIM, L.-T. Nanotechnology development in food packaging: A review **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 149-167, 2014.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plants extract. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1036–1043, 2012.

MONTEIRO, D. R.; GORUP, L. F.; TAKAMIYA, A. S.; RUVOLLO-FILHO, A. C.; DE CAMARGO, E. R.; BARBOSA, D. B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p.103-110, 2009.

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

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biological effects of *Spirulina (Arthrospira)* biopolymers and biomass in the development of nanostructured scaffolds. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-9. 2014.

MORAIS, M. G., RADDMANN, E. M., ANDRADE, M. R., TEIXEIRA, G. G., BRUSCH, L. R. F., COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; PRANKE, P.; WENDORFF, J. H.; STILLINGS, C.; RUDISILE, M.; DERSCH, R. Biofunctionalized nanofibers using *Arthrospira (Spirulina)* biomass and biopolymer. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015a.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Spirulina* LEB 18 for developing nanofibers. **Polimeros**, v. 25, p. 161-167, 2015b.

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

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Utilization of CO<sub>2</sub> in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 691–698, 2016.

MORENO, I.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, V.; ROMERO-GARCÍA, J. Control release of lactate dehydrogenase encapsulated in poly(vinyl alcohol) nanofibers via electrospinning. **European Polymer Journal**, v. 47, p. 1264-1272, 2011.

MUZZARELLI, R. A. A. Nanochitins and nanochitosans, paving the way to ecofriendly and energy-saving exploitation of marine resources. **Polymer Science: A Comprehensive Reference**, v. 10, p. 153–164, 2012.

OU, Y.; LIN, L.; PAN, Q.; YANG, X.; CHENG, X. Preventive effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on alloxan-injured mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 721–726, 2012.

PARK, J. Y.; HAN, S. W.; LEE, I. H. Preparation of electrospun porous ethyl cellulose fiber by THF/DMAc binary solvent system. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 13, p. 1002-1008, 2007.

PARTHIBAVARMAN, M.; HARIHARAN, V.; SEKAR, C. High-sensitivity, humidity sensorbased on SnO<sub>2</sub> nanoparticles synthesized by microwave irradiation method. **Materials** Science and Engineering: C, v. 31, p. 840–844, 2011.

PASCARIU, P.; AIRINEI, A.; OLARU, N.; PETRILA, I.; NICA, V.; SACARESCU, L.; TUDORACHE, F. Microstructure, electrical and humidity sensor properties ofelectrospun NiO–SnO<sub>2</sub> nanofibers. Sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 222, p. 1024-1031, 2016.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 248–255, 2005.

PEINADO, I.; MASON, M.; ROMANO, A.; BIASIOLI, F.; SCAMPICCHIO, M. Stability of  $\beta$ -carotene in polyethylene oxide electrospun nanofibers. **Applied Surface Science**, v. 370, p. 111-116, 2016.

PENTON-ROL, G;. MARTINEZ-SANCHEZ, G.; CERVANTES-LLANOS, M.; LAGUMERSINDEZ-DENIS, N.; ACOSTA-MEDINA, E. F.; FALCÓN-CAMA, V.; ALONSO-RAMÍREZ, R.; VALENZUELA-SILVA, C.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, E.; LLÓPIZ-ARZUAGA, A.; MARÍN-PRIDA, J.; LÓPEZ-SAURA, P. A.; GUILLÉN-NIETO, G. E.; PENTÓN-ARIAS, E. C-phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomy, elitis and induces regulatory T cells. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 29-38, 2011.

PILLAY, V.; DOTT, C.; CHOONARA, Y. E.; TYAGI, C.; TOMAR, L.; KUMAR, P.; DU TOIT, L. C.; NDESENDO, V. M. K. A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. Journal of Nanomaterials, v. 2013, p. 1-22, 2013.

PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; HALAL, S. L. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DIAS, A. R. G.; ZAVEREZE, E. R. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 1, p. 1-9, 2017.

PYRZYNSKA, K.; PĘKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, p. 4288–4295, 2013.

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

REDDY, C. M.; BHAT, V. B.; KIRANMAI, G., REDDY, M. N.; REDDANNA, P.; MADYASTHA, K. M. Selective inhibition of Cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 277, p. 599–603, 2000.

REMONDETTO, G.; AÑON, M. C.; GONZALEZ, R. J. Hydration properties of soybean protein isolates. **Brazilian Archives Biology and Biotechnology**, v. 44, p. 425–431, 2001.

REZAEI, A.; NASIRPOUR, A.; FATHI, M. Application of Cellulosic Nanofibers in Food Science Using Electrospinning and Its Potential Risk. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 269–284, 2015.

ROBERTSON, G. L. Food packaging: Principles and practice. New York: CRC press, 2005.

RODRIGO, R.; TORO, C. A.; CUELLAR, J. Influence of the geometric factors of the experimental device used in suspension polymerization on the properties of poly(styrene-*co* divinylbenzene) microparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 1431–1446, 2012.

ROGINA, A. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. **Applied Surface Science**, v. 296, p. 221–230, 2014.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, p. 36-41, 1998.

ROMAY, C.; GONZÁLEZ, R.; LEDÓN, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, p. 207-216, 2003.

SAFI, S.; MORSHED, M.; RAVANDI, S. A.; GHIACI, M. Study of electrospinning of sodium alginate, blended solutions of sodium alginate/poly(vinyl alcohol) and sodium alginate/poly(ethylene oxide). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, p. 3245-3255, 2007.

SAINI, M. K.; SANYAL, S. N. Piroxicam and C-phycocyanin prevent colon carcinogenesis by inhibition of membrane fluidity and canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling while up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR $\gamma$ . **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, p. 537-550, 2014.

SALABERRIA, A. M.; DIAZ, R. H.; LABIDI, J.; FERNANDES, S. C. M. Role of chitin nanocrystals and nanofibers on physical, mechanical and functional properties in thermoplastic starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 93-102, 2015.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 229-254, 2011.

SANTIAGO-SANTOS M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp.. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047-2052, 2004.

SASSON, A. Micro Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries. **BIOTEC Publication 1/2542**, p.11–31, 1997.

SCHMATZ, D. A. **Incorporação de nanopartículas com ficocianina em nanofibras poliméricas por** *electrospinning* e *electrospraying*. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

SCHMATZ D. A.; UEBEL, L. S.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.,; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Scaffolds Containing *Spirulina* sp. LEB 18 Biomass: Development, Characterization and Evaluation of *In Vitro* Biodegradation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.16, p. 1050-1059, 2016.

SCHUEREN, L. V.; MEYER, T.; STEYAERT, I.; CEYLAN, Ö.; HEMELSOET, K.; SPEYBROECK, V. V.; CLERCK, K. Polycaprolactone and polycaprolactone/chitosan nanofibres functionalised with the pH-sensitive dye Nitrazine Yellow. **Carbohydrate Polymers**, 91, 284-293, 2013.

SCHUEREN, L.V.; MOLLET, T.; ÖZGÜR, C.; CLERCK, K. D. The development of polyamide 6.6 nanofibers with a pH-sensitive function by electrospinning. **European Polymer Journal**, v. 46, p. 2229-2239, 2010.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p.113-136, 2008.

SHAIBANI, P. M.; JIANG, K.; HAGHIGHAT, G.; HASSANPOURFARD, M.; ETAYASH, H.; NAICKER, S.; THUNDAT, T. The detection of Escherichia coli (E. coli) with the pH sensitive hydrogelnanofiber-light addressable potentiometric sensor (NF-LAPS). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 226, p. 176-183, 2016.

SHI, X.; ZHOU, W.; MA, D.; MA, Q.; BRIDGES, D.; MA, Y.; HU, A. Electrospinning of Nanofibers and Their Applications for Energy Devices. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 1-20, 2015.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p. 1989-2006, 2008.

SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Experimental Design as a Tool for Optimization of C-Phycocyanin Purification by Precipitation from *Spirulina platensis*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 20, p. 5-12, 2009.

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

SOHEILI, M.; KHOSRAVI-DARANI, K. The potential health benefits of algae and micro algae in medicine: a review on *Spirulina platensis*. **Current Nutrition and Food Science**. v. 7, p. 279–285, 2011.

SONI, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 188-194, 2008.

SONI, B.; KALAVADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2017-2023, 2006.

SOTIROUDIS, T. G.; SOTIROUDIS, G. T. Health aspects of *Spirulina (Arthrospira)* microalga food supplement. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 78, p. 395–405, 2013.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V.; REDDY, M. C.; MALLIKARJUNA, R. M.; RACHAMALLU, A.; REDDANNA, P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 453-62, 2004.

SULLIVAN, S. T.; TANG, C.; KENNEDY, A.; TALWAR, S.; KHAN, S. A. Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 36-50, 2014.

SUN, B.; LONG, Y. Z.; ZHANG, H. D.; LI, M. M.; DUVAIL, J. L.; JIANG, X. Y.; YIN, H. L. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 862–890, 2014.

SUN, Y.; ZHANG, J.; YAN, Y.; CHI, M.; CHEN, W.; SUN, P.; QIN, S. The protective effect of C-phycocyanin on paraquat-induced acute lung injury in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 168-174, 2011.

TALAGHAT, M. R. Intensification of the performance of kinetic inhibitors in the presence of polyethylene oxide and polypropylene oxide for simple gas hydrate formation in a flow miniloop apparatus. **Fluid Phase Equilibria**, v. 289, p. 129–134, 2010.

TASSANAWAT, S.; PHANDEE, A.; MAGARAPHAN, R.; NITHITANAKUL, M.; MANUSPIYA, H. pH-sensitive PP/clay nanocomposites for beverage smart packaging, in: **Proceedings of the 2nd IEEE International, Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems**, 2007.

TAYLOR, T. M.; GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, P. M.; BRUCE, B. D.; WEISS, J. Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ-potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. **Food Biophysics**, v. 2, p. 1-9, 2007.

THANGAM, R.; SURESH, V.; PRINCY. A. W.; RAJKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, N.; GUNASEKARAN, P.; RENGASAMY, R.; ANBAZHAGAN, C.; KAVERI, K.; KANNAN S. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> cell cycle arrest. **Food Chemistry**, v.140, p. 262-272, 2013.

TU, S.; UKNALIS, J.; IRWIN, P.; YU, L.S.L. The use of streptavidin coated magneticbeads for detecting pathogenic bacteria by light addressable potentiometricsensor (LAPS). Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, v. 8, p. 95–109, 2000.

UEBEL, L. S.; SCHMATZ, D. A.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.; MUCCILO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. uercetin and curcumin in nanofibers of polycaprolactone and poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate): Assessment of in vitro antioxidant activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, p. 1–7, 2016.

VAZ, C. M.; VAN TUIJL, S.; BOUTEN, C. V. C.; BAAIJENS, F. P. T. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. **Acta Biomaterialia**, v. 1, p. 575–582, 2005.

VEGA-LUGO, A.-C.; LIM, L.-T. Electrospinning of soy protein isolate nanofibers. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, v, 2, p. 223–230, 2008.

VEGARA, S.; MARTI, N.; LORENTE, J.; COLL, L.; STREITENBERGER, S.; VALERO, M.; SAURA, D. Chemical Guide Parameters for Punica granatum cv. 'Mollar' Fruit Juices Processed at Industrial Scale. Food Chemistry, v. 147, p. 203-208, 2014.

VERDUGO, M.; LIM, L.-T.; RUBILAR, M. Electrospun protein concentrate fibers from microalgae residual biomass. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 22, p. 373–383, 2014.

VINK, E. T. H.; RÁBAGO, K. R.; GLASSNER, D. A.; SPRINGS, B.; O'CONNOR, R. P.; KOLSTAD, J.; GRUBER P. R. The sustainability of NatureWorks polylactide polymers and Ingeo polylactide fibers: an update of the future. **Macromolecular Bioscience**. v. 4, p. 551-564, 2004.

VINK, E.T.; DAVIES, S. Life cycle inventory and impact assessment data for 2014 Ingeo<sup>™</sup> polylactide production. **Industrial Biotechnology**, v. 11, p. 167–180, 2015.

von BULTZINGSLOWEN, C.; MCEVOY, A. K.; MCDONAGH, C.; MACCRAITH, B. D.; KLIMANT, I.; KRAUSE, C.; WOLFBEIS, O. S. Sol-gel based optical carbon dioxide sensor employing dual luminophore referencing for application in food packaging technology. **Analyst**, v. 127, p. 1478-1483, 2002.

VONSHAK A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology Cell-Biology and Biotechnology. Londres: Taylor & Francis, 1997.

VRIEZE, S. D.; CAMP, T. V.; NELVIG, A.; HAGSTRÖM, B.; WESTBROEK, P.; CLERCK, K. D. The effect of temperature and humidity on electrospinning. Journal of Materials Science, v, 44, p. 1357–1362, 2009.

WANG, C.; HSU, C.-H., HWANG, I.-H. Scaling laws and internal structure for characterizing electrospun poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers. **Polymer**, v. 49, p. 4188–4195, 2008.

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

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

WNEK, G. E.; CARR, M. E.; SIMPSON, D. G.; BOWLIN, G. L. Electrospinning of nanofiber fibrinogen structures. *Nano Letters*, v. 3, p. 213–216, 2003.

WOJCIK, M.; BURZYNSKA-PEDZIWIATR, I.; WOZNIAK, L. A. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. **Current medicinal chemistry**, v. 17, p. 3262–3288, 2010.

WU, L. C.; HO, J. A.; SHIEH, M. C.; LU, I. W. Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4207-4212, 2005.

WU, S. Entanglement, friction, and free volume between dissimilar chains in compatible polymer blends. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 25, p. 2511–2529, 1987.

XIU, Z-M.; ZHANG, Q-B.; PUPPALA, H. L.; COLVIN, V. L.; ALVAREZ, P. J. J. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nanotechnology Letters**, v. 12, p. 4271-4275, 2012.

YAM, K. L.; TAKHISTOV, P. T.; MILTZ, J. Intelligent packaging: concepts and applications. Journal of Food Science, v. 70, R1-R10, 2005.

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

YUAN, Y.; LEE, T. R. Contact Angle and Wetting Properties. Surface Science Techniques. (1st ed), 51, 3-34, 2013.

ZHANG, G.; ZENG, X.; LI, P. Nanomaterials in cancer-therapy drug delivery system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, p. 741-750, 2013.

ZHOU, Y.; LIM, L. -T. Activation of lactoperoxidase system in milk by glucose oxidase immobilized in electrospun polylactide microfibers. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 170-176, 2009.

ZHU, W.; ASOOD, F.; O'BRIEN, J.; ZHAN, G. Highly aligned nanocomposite scaffolds by electrospinning and electrospraying for neural tissue regeneration. **Regenerative Nanomedicine**, v. 11, p. 693-704, 2015.
## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a utilização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 como indicador de pH a partir de nanofibras;
- Avaliar se a mudança de cor com variação de pH obtida pelos indicadores de ficocianina e biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 é reversível;
- Aplicar os indicadores desenvolvidos a partir de nanofibras em alimentos;
- Avaliar a aceitação e intenção de compra dos indicadores.