



Anais do VIII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio

2014

Editores:
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Caue Ribeiro de Oliveira
Humberto de Mello Brandão
Marlene de Barros Coelho
Daniel Souza Corrêa
Maria Alice Martins

Embrapa

REFERÊNCIAS

ASTM- Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting (1997). D882-97. In Annual book of American Standard Testing Methods. Philadelphia, USA, PA: ASTM.

CALVO, P.; REMUNÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers Journal Applied Polymer Science, v.63, p.125-132, 1997.

ESPITIA, P. J. P.; DU, W.; AVENA-BUSTILLOS, R. DE J.; SOARES, N. DE F. F.; MCHUGH, T. H. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. Food Hydrocolloids, v. 35, p.287-296, 2014.

LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R. de; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Development of Novel Guava Puree Films Containing Chitosan Nanoparticles. Journal of Nanoscience and NanoTechnology, v.12, p.2711 - 2718, 2012.

LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R. de; MATTOSO, L. H. C. Nanocompósito de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagens. Química Nova. No Prelo, 2014.

MARTELLI M. R.; BARROS, T. T.; MOURA, M. R. de; MATTOSO, L. C. H.; ASSIS, O. B. G. Effect of chitosan nanoparticles and pectin content on mechanical properties and water vapor permeability of banana puree films. Journal of Food Science, v.78, N98 – N103, 2013.

MOURA, M. R. de; AOUADA, F.A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methyl-cellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles Journal of Food Engineering, v.92, p. 448 - 453, 2009.

OTONI, C. G.; MOURA, M. R. de; AOUADA, F. A.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, R. S.; LOREVICE, M. V.; SOARES, N. de F. F.; MATTOSO, L. H. C. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. Food Hydrocolloids, v.41, p.188-194, 2014.

MINIATURIZAÇÃO DE PARTÍCULAS EM NANOEMULSÕES DE CINAMALDEÍDO NA MELHORIA DO DESEMPENHO ANTIMICROBIANO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS ATIVOS

*Caio G. Otoni^{1,2}, Márcia R. de Moura^{1,2,4}, Fauze A. Aouada⁴, Geany P. Camilloto⁵, Renato S. Cruz⁵, Marcos V. Lorevice^{1,6}, Nilda de F. F. Soares³, Luiz H. C. Mattoso^{1,2,6}

¹LNNA, Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. ²PPG-CEM, Departamento de Engenharia de Materiais, UFSCar, São Carlos, SP. ³LABEM, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, MG. ⁴Departamento de Física e Química, FEIS, UNESP, Ilha Solteira, SP. ⁵Departamento de Tecnologia, UEFS, Feira de Santana, BA. ⁶PPGQ, Departamento de Química, UFSCar, São Carlos, SP.
*caiogomide@gmail.com

Classificação: Filmes, revestimentos comestíveis e embalagens funcionais para alimentos

Resumo

A crescente demanda por inovação motiva o desenvolvimento de embalagens ativas para alimentos. Cinamaldeído, componente antimicrobiano majoritário do óleo essencial de canela, pode ser liberado por filmes ativos e substituir conservantes sintéticos. O presente trabalho teve por objetivo produzir nanoemulsões de cinamaldeído com partículas de diferentes tamanhos e avaliar este efeito no desempenho antimicrobiano de filmes de pectina e polpa de mamão. Maiores velocidades de agitação reduziram mais o tamanho das partículas. Cinamaldeído exibiu efeito antimicrobiano contra *Escherichia coli*,

Salmonella enterica, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. A miniaturização das partículas potencializou o efeito inibitório devido à maior área superficial e à maior migração.

Palavras-chave: Embalagens Ativas; Nanoemulsão; Cinamaldeído; Pectina

DROPLET MINIATURIZATION OF CINNAMALDEHYDE NANOEMULSIONS IMPROVES THE ANTIMICROBIAL PERFORMANCE OF ACTIVE BIOPOLYMER FILMS

Abstract

The rising demand for innovation encourages the development of active packaging for food. Cinnamaldehyde, the major antimicrobial component of cinnamon essential oil, may be released by active films and replace synthetic preservatives. This work aimed at producing cinnamaldehyde nanoemulsions of different droplet sizes, as well as assessing its effect on the antimicrobial performance of pectin/papaya puree films. Increased stirring energies reduced droplet diameter to higher extents. Cinnamaldehyde inhibited *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. The reduction on droplet size improved bacterial inhibition due to the increased surface area and migration.

Keywords: Active Packaging; Nanoemulsion; Cinnamaldehyde; Pectin

Publicações relacionadas:

Caio G. Otoni, Márcia R. de Moura, Fauze A. Aouada, Geany P. Camilloto, Renato S. Cruz, Marcos V. Lorevice, Nilda de F. F. Soares, Luiz H. C. Mattoso. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. Food Hydrocolloids 41:188-194, 2014.

1 INTRODUÇÃO

Matrizes biopoliméricas têm sido amplamente exploradas no desenvolvimento de embalagens para alimentos. A pectina é um biopolímero que, quando adicionado de polpas de frutas e conservantes, tem grande potencial para a produção de embalagens ativas antimicrobianas comestíveis, as quais liberam gradativamente conservantes para os alimentos. Óleos essenciais de plantas têm sido foco de estudos devido à ocorrência natural e às propriedades antimicrobianas contra micro-organismos patogênicos e deterioradores de alimentos (BURT, 2004). O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) destaca-se como um potencial substituto de conservantes sintéticos em alimentos. Seu componente majoritário, cinamaldeído, é o responsável pelas propriedades antimicrobianas, o que já fora comprovado em embalagens ativas (ROJAS-GRAU; AVENA-BUSTILLOS; FRIEDMAN; HENIKA; MARTÍN-BELLOSO; MCHUGH, 2006). Uma das maneiras de incorporar compostos hidrofóbicos (como o cinamaldeído) em materiais hidrossolúveis sem que haja separação de fase é a produção de emulsões de óleo-em-água. Quanto menores forem as partículas da fase dispersa, maiores serão suas áreas superficiais e suas capacidades de migração (HUANG; YU; RU, 2010). Nanoemulsões, cujas partículas variam em diâmetro de 20 a 500 nm, apresentaram maior acessibilidade e disponibilidade que emulsões convencionais, com partículas entre 1 e 100 µm (SOLANS; IZQUIERDO; NOLLA; AZEMAR; GARCIA-CELMA, 2005). O presente trabalho teve por objetivo produzir nanoemulsões de cinamaldeído com partículas de diferentes tamanhos e avaliar este efeito no desempenho antimicrobiano de filmes ativos de pectina e polpa de mamão contra *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Cinamaldeído (pureza superior a 93%; Petite Marie, Itaquaquacetuba, SP), Tween 80 (Synth, Diadema, SP), pectina (CP Kelco, Atlanta, EUA), polpa de mamão (De Marchi, Jundiá, SP) e água ultrapura foram utilizados nas formulações das emulsões e dos filmes. Caldo TSB (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, EUA) e meios de cultura TSA (Acumedia Manufactures Inc.) e Mueller Hinton (Becton, Dickinson and Co., Sparks, EUA) foram usados nos ensaios microbiológicos.

2.2 Emulsificação

À água ultrapura (fase contínua) foram adicionados 2% (m/m) de cinamaldeído (fase dispersa) e 1,5% (m/m) de Tween 80 (emulsificante), seguidos de agitação a 7000, 12000 ou 16000 rpm por 4 min em *T25 Ultra-Turrax* (IKA Werke GmbH & Co, Staufen, Alemanha).

2.3 Tamanho das partículas

O tamanho médio e o índice de polidispersividade (PdI) das partículas de cinamaldeído em emulsão foram determinados 1 h após a emulsificação através de espalhamento de luz em equipamento *Zetasizer Nano Series* (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, Inglaterra).

2.4 Conformação em filmes

Soluções aquosas contendo 3% (m/m) de pectina e 6% (m/m) de polpa de mamão foram diluídas (1:1) nas emulsões produzidas, produzindo soluções filmogênicas com composições mássicas de 1,5% de pectina, 3% de polpa de mamão, 1,0% de cinamaldeído e 0,75% de Tween 80. Após, foram espalhadas sobre substrato polimérico para polimerização por evaporação do solvente a 25 ± 2 °C por 48 h.

2.5 Propriedades antimicrobianas

Culturas de *E. coli* (ATCC 11229), *S. aureus* (ATCC 6538), *L. monocytogenes* (ATCC 15313) e *S. enterica* serovar Choleraesuis (ATCC 10708) foram inoculadas em tubos contendo caldo TSB e armazenadas por 24 h a 37 °C até serem transferidas para novos tubos contendo caldo TSB, onde cresceram por mais 12 h a 37 °C. As suspensões foram estriadas em meio TSA em placas de Petri, as quais foram incubadas a 37 °C por 18-24 h. Colônias isoladas foram inoculadas em soluções salinas (0,85% m/v) até que a turbidez coincidissem com a do padrão McFarland 0,5 (10^8 UFC·mL⁻¹). As suspensões foram plaqueadas com *swabs* em ágar Mueller Hinton. Os filmes foram cortados em discos de 1 cm de diâmetro, esterilizados superficialmente por radiação UV e posicionados no centro das placas de Petri (1 disco por placa) contendo o meio de cultura inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C por 16-18 h (CLSI, 2012). Os diâmetros das zonas de inibição em torno dos filmes foram medidos com paquímetro (Mitutoyo Corp., Kanogawa, Japão).

2.6 Tratamento estatístico dos dados

Os dados obtidos foram analisados no programa *Minitab* 14.12.0 (State College, EUA) através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tamanho das partículas

A Tabela 1 apresenta os valores de tamanho e PdI das partículas de cinamaldeído em emulsão antes da incorporação às soluções filmogênicas e da conformação destas em filmes.

Tabela 1. Diâmetro médio (*D*) e índice de polidispersividade (PdI) de partículas de cinamaldeído

Velocidade de agitação (rpm)	<i>D</i> (nm)	PdI
7000	271,95 ± 18,70 ^a	0,301 ± 0,020 ^a
12000	121,75 ± 7,47 ^b	0,215 ± 0,023 ^b
16000	41,32 ± 1,05 ^c	0,225 ± 0,014 ^b

^{a-c} numa mesma coluna, valores médios ± desvios padrões diferentes ($p < 0,05$) antecedem letras diferentes

Maiores taxas de cisalhamento impostas por maiores velocidades de rotação durante a etapa de

agitação levaram a partículas menores ($p < 0,05$). Neste estudo, todas as velocidades de agitação miniaturizaram as partículas até a escala nanométrica (Tabela 1).

O Pdl é um indicativo de como a distribuição do tamanho das partículas é espalhada. As partículas de cinamaldeído apresentaram distribuições de tamanho estreitas, já que os valores de Pdl não foram superiores a 0,3 (Tabela 1). É relevante mencionar que os valores médios de Pdl não foram diferentes ($p > 0,05$), exceto no caso da emulsão analisada 1 h após ser preparada a 7000 rpm (Tabela 1). Isto é atribuído ao fornecimento de menor energia ao sistema durante a emulsificação, tornando a distribuição de tamanho mais larga.

3.2 Propriedades antimicrobianas

As áreas das zonas de inibição dos quatro micro-organismos testados, medidas em torno dos discos de filmes produzidos, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Áreas das zonas de inibição de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, e *Staphylococcus aureus* pelos filmes ativos

Filme	Área da zona de inibição (mm ²)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
A	9,2 ± 0,8 ^a	39,5 ± 4,7 ^a	188,9 ± 3,6 ^a	171,3 ± 21,1 ^a
B	24,4 ± 0,5 ^a	63,7 ± 6,9 ^a	271,9 ± 4,3 ^b	314,9 ± 4,3 ^b
C	47,8 ± 1,6 ^b	161,8 ± 63,6 ^b	375,2 ± 0,6 ^c	710,6 ± 60,7 ^c

^{a-c} numa mesma coluna, valores médios ± desvios padrões diferentes ($p < 0,05$) antecedem letras diferentes

Os filmes adicionados de nanoemulsões de cinamaldeído levaram à formação de zonas de inibição (Tabela 2), confirmando seu poder inibitório. Filmes incorporados com partículas menores tiveram melhores ($p < 0,05$) desempenhos antimicrobianos, indicados por maiores ($p < 0,05$) zonas de inibição (Tabela 2). Este comportamento é ilustrado na Figura 1.

Gotículas em nanoemulsões têm áreas superficiais superiores àquelas em emulsões convencionais, levando a maior disponibilidade do composto disperso (HUANG; YU; RU, 2010). Os melhores desempenhos antimicrobianos de partículas menores encontradas no presente estudo são, portanto, atribuídos às maiores habilidades de migração do composto ativo dos filmes para as células microbianas. Esta tese é suportada por Huang, Yu e Ru (2010), que apontam como principal vantagem de nanoemulsões sobre emulsões convencionais o transporte facilitado de compostos fitoquímicos pelas membranas celulares, resultando em maior concentração de fitoquímicos no plasma e, logo, em maior biodisponibilidade.

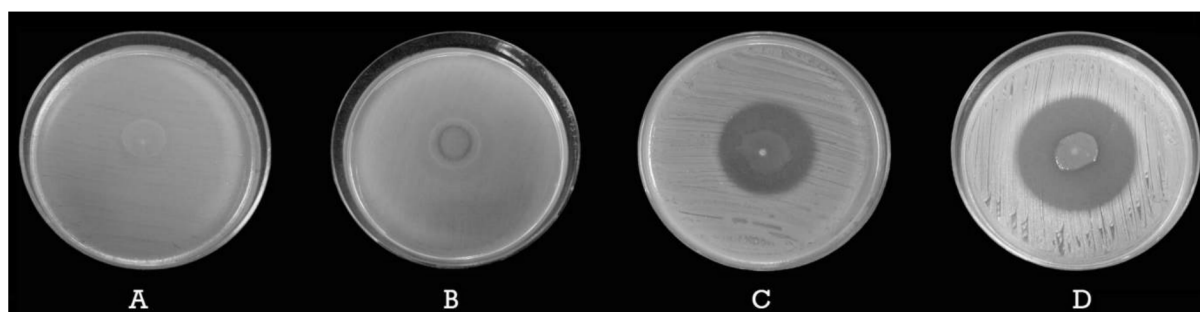


Figura 2. Zonas de inibição de *Salmonella enterica* em torno dos filmes sem cinamaldeído (A) e com emulsões aquosas de cinamaldeído obtidas por agitações a 7000 (B), 12000 (C) e 16000 rpm (D).

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir, com base no presente estudo, que o tamanho das partículas em nanoemulsões de cinamaldeído pode ser controlado pelo nível de energia mecânica fornecido durante a emulsificação

e que a miniaturização destas partículas potencializa seus desempenhos antimicrobianos quando incorporados em filmes ativos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem CAPES, FAPESP 2013/14366-7, CNPq, UNESP-FEIS, LABEM-UFV e EMBRAPA.

REFERÊNCIAS

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk Susceptibility tests; approved standard (11th ed). Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M02-A11, 2012. www.clsi.org.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery on nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 1, p. R50-R57, 2010.

ROJAS-GRAÜ, M. A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MARTÍN-BELLOSO, O.; MCHUGH, T. H. Mechanical, barrier and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 24, p. 9262-9267, 2006.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.

REFINAMENTO DE EMULSÕES DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO ATRAVÉS DE ULTRASONICAÇÃO INFLUENCIA AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES DE METILCELULOSE

*Caio G. Otoni^{1,2}, Sylvania F. O. Pontes³, Eber A. A. Medeiros³, Nilda de F. F. Soares³

¹LNNA, Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. ²PPG-CEM, Departamento de Engenharia de Materiais, UFSCar, São Carlos, SP. ³LABEM, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, MG.

*caiogomide@gmail.com

Classificação: Filmes, revestimentos comestíveis e embalagens funcionais para alimentos.

Resumo

Como os consumidores demandam cada vez mais alimentos livres de conservantes sintéticos, o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) (OEO) tem sido incorporado através de emulsões a matrizes poliméricas hidrossolúveis. A estabilidade das emulsões é aumentada miniaturizando-se as partículas até a escala nanométrica. Este trabalho objetivou produzir filmes de metilcelulose (MC) adicionados de emulsões de OEO refinadas por ultrasonicação, assim como avaliar o efeito do OEO e de seu refinamento nas propriedades mecânicas dos filmes. A ultrasonicação miniaturizou as partículas de OEO e estreitou a sua distribuição de tamanhos. O OEO reduziu a rigidez e aumentou a extensibilidade dos filmes de MC. O refinamento da emulsão potencializou este efeito.

Palavras-chave: Embalagens Ativas; Nanoemulsão; Orégano; Metilcelulose; Ultrasonicação

REFINING OREGANO ESSENTIAL OIL EMULSIONS THROUGH ULTRASONICATION AFFECTS THE MECHANICAL PROPERTIES OF METHYLCELLULOSE FILMS

Abstract

As consumers increasingly demand synthetic preservative-free foods, oregano (*Origanum vulgare*) es-