



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## AVALIAÇÃO DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMO CARREADOR DE NISINA PARA PROLONGAR A VIDA DE PRATELEIRA DE QUEIJOS CAPRINOS

C. R. V. de Sousa<sup>1</sup>, M. do S. R. Bastos<sup>2</sup>, M. de F. Borges<sup>2</sup>, M. de A. Oliveira<sup>3</sup>, F. R. S. Mendes<sup>4</sup>, A. Rosenthal<sup>5</sup>, S. D. Benevides<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Engenharia de Alimentos – Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Ceará – Fortaleza – CE – Brasil – e-mail: (ruan\_asdf@hotmail.com)

<sup>2</sup>Embrapa Agroindústria Tropical – CEP: 60.511-110 – Fortaleza – CE – Brasil, +55 (85) 3391 7100 – Fax: +55 (85) 3391 7109 – e-mails: (selene.benevides@embrapa.br; socorro.bastos@embrapa.br, maria.fatima@embrapa.br)

<sup>3</sup>Bolsista de Pós-doutorado – Capes/Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza – CE – Brasil – e-mail: (mariliaaoliveira7@gmail.com)

<sup>4</sup>Bolsista de Doutorado – Renorbio/UECE: Rede Nordeste de Biotecnologia filiada à Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza- CE – Brasil – e-mail: (rogenio10@yahoo.com.br)

<sup>5</sup>Embrapa Agroindústria de Alimentos – CEP: 23020-470– Rio de Janeiro-RJ – Brasil, Telefone: +55 (21) 3622-9600 – Fax: +55 (21) 3622-9713– e-mail: (amauri.rosenthal@embrapa.br)

**RESUMO** – A quitosana possui propriedades formadoras de filme e associada a nisina, peptídeo antimicrobiano, torna-se uma embalagem com boa aplicabilidade em alimentos. O revestimento (60 µL) foi depositado em poços nas placas com ágar Mueller-Hinton, inoculadas com 10<sup>6</sup> células/mL e incubadas a 35 °C/24 h. O revestimento com resposta (75.000 UI) contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* foi caracterizado quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, reologia e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) visando ser utilizado em queijos caprinos. A nisina não afetou expressivamente o tamanho de partícula. Os picos apresentaram perfil monodisperso (IP=0,6). O potencial zeta indicou características de dispersão estável (carga superficial positiva de +57,5 mV) e comportamento de fluido não-newtoniano (índice de comportamento n=0,8). O espectro do revestimento apresentou bandas características tanto da quitosana como da nisina, indicando que houve uma sobreposição de bandas. Os resultados mostraram possibilidade de uso dessa embalagem em queijos caprinos.

**ABSTRACT** – Chitosan have good film forming properties and associated nisin, antimicrobial peptide, becomes a good applicability to packaging food. The coating (60 µL) was deposited in wells in plates with Mueller-Hinton agar inoculated with 10<sup>6</sup> cells/mL and incubated at 35 °C/24 h. Coating with response (75,000 IU) against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* was characterized as to particle size, zeta potential and rheology spectroscopy Fourier transform infrared (FTIR) in order to be used in goat cheese. Nisin not significantly affected the particle size. The peaks showed monodisperse profile (IP=0.6). The zeta potential showed stable dispersion characteristics (positive surface charge of +57.5 mV) and behavior Non-Newtonian fluid (behavior index n=0.8). The coating spectrum showed bands features both chitosan as nisin, indicating that there was an overlapping bands. The results showed the possibility of using this package in goat cheeses.

**PALAVRAS-CHAVE:** polímero, biodegradável, antimicrobiano, lácteos caprinos.

**KEYWORDS:** polymer, biodegradable, antimicrobial, dairy goat products.



## 1. INTRODUÇÃO

O revestimento é uma emulsão formada a partir de um polímero e pode ser aplicado diretamente na superfície do alimento, ou por imersão e, após a secagem forma uma fina película que sobre o alimento, protegendo-o contra contaminação.

A quitosana, um biopolímero derivado da quitina por desacetilação em meios alcalinos, é produzido a partir de cascas de crustáceos, não é tóxico, é biocompatível e muito útil para embalagem de alimentos, além de ser um dos mais abundantes amino polissacarídeos existentes no ambiente. Possui características biodegradáveis e suas propriedades antimicrobianas em conjunto com a cationicidade e as propriedades formadoras de filme, torna-se uma excelente embalagem contra a contaminação por microrganismos. Uma das razões da característica antimicrobiana da quitosana é o seu grupo amino com carga positiva, o qual interage com as membranas das células microbianas carregadas negativamente, levando à dispersão dos constituintes protéicos dos microrganismos (Rivero et al., 2009; Elsabee e Abdou, 2013).

O uso de revestimentos a base de polímeros naturais aliados à ação de aditivos reconhecidos como seguros tem aumentado na indústria alimentar. A nisina é uma bacteriocina produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis*, amplamente utilizada como um conservante de alimentos em especial queijo. De modo geral, a nisina possui um amplo espectro de ação, atuando sobre *Clostridium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. É ativa frente bactérias Gram-positivas e seus esporos e apenas contra alguns microrganismos Gram-negativos (Delves-Broughton, 2005; Schulz et al. 2005).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano do revestimento a base de quitosana com nisina sobre bactérias patogênicas e caracterizá-lo para uso em queijos caprinos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os revestimentos foram preparados com 2% de quitosana (m/v) (Polymar, Fortaleza, Brasil) com grau de desacetilação de 86,30 % e pH 7,9 dissolvidos em solução de ácido acético a 1% (Vetec, Química Fina Ltda). A solução foi agitada por 4 horas e em seguida, adicionou-se a nisina (Sigma, St. Louis, MO, USA) nas concentrações de 30.000, 45.000, 60.000, 75.000, 90.000 e 105.000 UI. Foram elaborados revestimentos controle (sem nisina).

### 2.1 Avaliação antimicrobiana dos revestimentos

O estudo de avaliação do efeito antimicrobiano foi realizado com cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 3309 (Microbiologics, Sant Cloud, USA). Células ( $10^6$  UFC/mL) de *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram inoculadas em placas de Petri com ágar Mueller Hinton e ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI), respectivamente e, incubadas a 35 °C/24 h. Em seguida, as placas foram perfuradas com pipeta Pasteur esterilizada, formando poços de 5mm de diâmetro e o volume de 60µL das soluções filmogênicas com cada concentração de nisina foi depositado nos poços. O mesmo volume da solução controle foi adicionado nas mesmas placas, as quais foram incubadas a 35 °C/24 h. A atividade antimicrobiana foi determinada pela medida do halo de inibição (mm) em volta de cada poço. A solução filmogênica com melhor resultado nos testes de difusão foi selecionada para a caracterização, assim como a solução controle (sem nisina). As análises foram realizadas em triplicata.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## 2.2 Potencial Zeta

A carga superficial das partículas foi analisada pelo equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido), utilizando o princípio da difração do raio laser. As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 e as medidas realizadas em triplicata a 25 °C.

## 2.3 Tamanho de Partícula

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada nos revestimentos, utilizando um Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido), pelo princípio da difração do raio laser. As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 e as medidas realizadas em triplicata a 25 °C.

## 2.4 Reologia

A reologia das soluções foi realizada a temperatura de 25 °C, em um reômetro de marca Brookfield RVDV-IIICP, do tipo cilindros concêntricos, com modelos de spindle's do tipo ULA, SC4-21, SC4-27 e SC4-28. O reômetro é equipado com banho termoestabilizado para controle da temperatura, além de ser acoplado em computador para utilização do Software Rheocalc 32.

## 2.5 Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os dados de FTIR foram obtidos em espectrômetro Shimadzu, modelo IRTracer-100, onde 2 mg das amostras de quitosana e nisina foram analisados em pastilha de KBr com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 26 scans por segundos na faixa de 400-4000 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram analisadas por FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR), com os mesmos parâmetros descritos anteriormente.

## 2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, a um nível de significância de 5% (p<0,05), para determinar diferença entre as médias. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico Statistic® versão 10 para Windows.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Atividade antimicrobiana

O efeito antimicrobiano dos revestimentos de quitosana para ambos os microrganismos foi comprovado pela média dos diâmetros dos halos (mm), em todas as concentrações testadas de nisina, assim como pelo controle, comprovando o poder antimicrobiano natural da quitosana, conforme mostra a tabela 1. Batista et al. (2011) também relatou o potencial antimicrobiano da quitosana, evidenciado pelo halo de inibição formado por meio do revestimento controle (sem nisina), mesmo que não tenha apresentado diferença significativa para *S.aureus* com relação aos revestimentos com 30.000 e 45.000 UI.



Tabela 1. Média dos diâmetros dos halos de inibição dos revestimentos de quitosana nas diferentes concentrações de nisina.

| CONCENTRAÇÃO<br>(10 <sup>3</sup> UI) | <i>Staphylococcus aureus</i>  | <i>Listeria monocytogenes</i> |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                      | Tamanho halo de inibição (mm) |                               |
| Controle                             | 7,7 ± 0,8 <sup>c</sup>        | 10,5 ± 0,5 <sup>a</sup>       |
| 30                                   | 7,8 ± 0,8 <sup>c</sup>        | 20,0 ± 3,2 <sup>bc</sup>      |
| 45                                   | 8,3 ± 0,5 <sup>ac</sup>       | 19,8 ± 2,2 <sup>bc</sup>      |
| 60                                   | 9,7 ± 0,5 <sup>ab</sup>       | 22,0 ± 2,4 <sup>bc</sup>      |
| 75                                   | 11,3 ± 1,2 <sup>b</sup>       | 23,0 ± 1,5 <sup>b</sup>       |
| 90                                   | 10,8 ± 1,0 <sup>b</sup>       | 20,8 ± 1,7 <sup>bc</sup>      |
| 105                                  | 10,2 ± 1,2 <sup>b</sup>       | 19,3 ± 2,5 <sup>c</sup>       |

\*Médias com letras diferentes na mesma coluna representa diferença significativa a 5% de confiança.

A *L. monocytogenes* revelou maior inibição na concentração de 75.000 UI de nisina, revelada pela média dos diâmetros dos halos, no entanto, diferiu estatisticamente somente do controle e da concentração de 105.000 UI de nisina. Para *S. aureus* também foi revelado maior média de diâmetro do halo com 75.000 UI de nisina, mesmo que a partir de 60.000 UI não tenha havido diferença significativa entre as médias dos diâmetros dos halos de inibição. Portanto, a concentração de 75.000 UI foi selecionada para ser utilizada no revestimento a ser caracterizado.

### 3.2 Potencial Zeta

Avaliando o potencial zeta, o revestimento contendo nisina apresentou características de dispersão estável com média de carga superficial positiva de 52,1 mV. Já o controle apresentou valor similar de carga superficial (+57,5 mV), revelando que a adição de nisina não afetou o valor da carga superficial das partículas. No caso de polímeros carregados (quitosana), as cargas são majoradas, isto é, em relação a sua adsorção, há sítios âncora que fixam a molécula à superfície, mas boa parte das cargas na extensão da molécula ficam solvatadas pelo líquido, que são responsáveis pela geração positiva de cargas e estabilização do sistema (Castro e Golveia, 2000).

### 3.3 Tamanho de partícula

A média do tamanho de partículas segundo o cálculo do D(3,2) para o revestimento contendo nisina foi 540,65 nm e para o controle 546,48 nm, indicando que a proporção de nisina adicionada não afetou expressivamente o tamanho de partícula. Apesar dos picos apresentarem perfil monodisperso, o PDI (índice de polidispersividade) apresentou valores em torno de 0,6, pelo fato da dispersão possuir um polissacarídeo com estrutura ramificada. Em uma escala de 0 a 1, quanto menor o IP, mais próximo à zero, diz-se que mais monodisperso encontra-se o sistema, logo há uma alta homogeneidade (Gaumet et al., 2008).

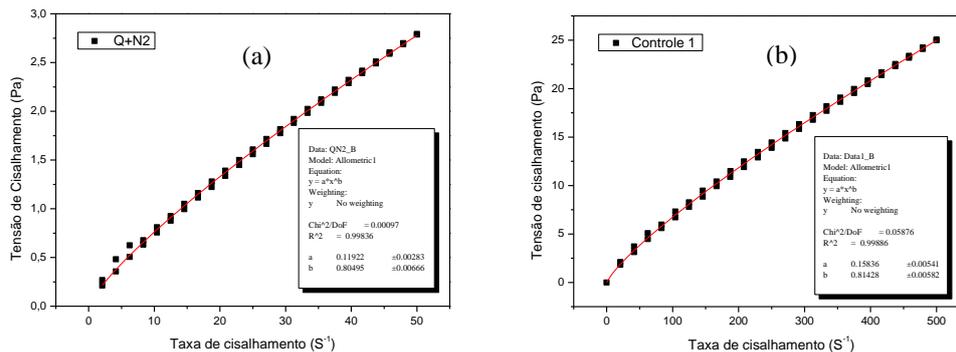
### 3.4 Reologia

Conforme mostra a Figura 1, a reologia das soluções de quitosana com e sem nisina apresentaram comportamento de fluidos não-newtonianos, com índice de comportamento ( $n$ ) em torno de 0,8, valor menor do que 1 (pseudoplástico). Os fluidos pseudoplásticos são fluidos não newtonianos



independentes do tempo, quando se tem a diminuição da viscosidade conforme aumento da taxa de deformação aplicada (Chhabra e Richardson, 2008). A adição de nisina na concentração de 75.000 UI não interferiu sobre a viscosidade do fluido.

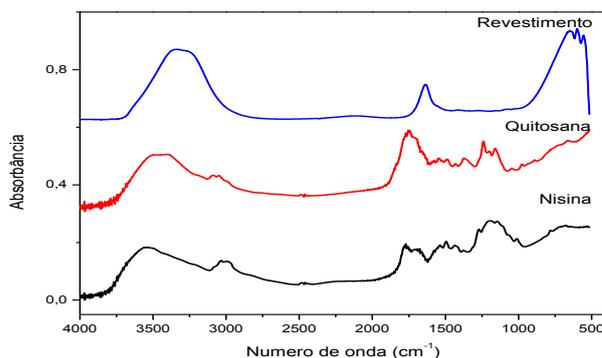
Figura 1. Reologia dos revestimentos: (a) quitosana com nisina e (b) controle (sem nisina).



### 3.5 FTIR

Na análise de infravermelho foi possível avaliar os estiramentos e deformações dos grupos funcionais da quitosana e nisina. O espectro da quitosana em pó mostrou bandas na região em torno de 3400 cm<sup>-1</sup> e 2900 cm<sup>-1</sup>, 1600 a 1500 cm<sup>-1</sup>, 1400 cm<sup>-1</sup> correspondendo a hidroxila, estiramento C-H, grupo amina e grupo carboxila respectivamente, semelhante às bandas encontradas por (Bispo et al. 2009). A nisina por sua vez apresentou bandas características nas regiões de 3300 cm<sup>-1</sup>, 1600 cm<sup>-1</sup> e 1500 cm<sup>-1</sup> (estiramento N-H, N das amidas I e II), conforme mostra a figura 2.

Figura 2. Bandas referentes ao FTIR da quitosana, nisina e do revestimento.



O espectro do revestimento apresentou bandas características tanto da quitosana como da nisina, indicando que houve uma sobreposição de bandas. Os picos em torno de 3400 cm<sup>-1</sup>, são caracterizados pela presença de (-OH e -N-H) (Cerqueira et al. 2012). A banda de absorção em 1600-1637 cm<sup>-1</sup> é atribuída aos grupamentos (-C=O), uma vez que estão presentes nos aminoácidos da nisina.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## 4. CONCLUSÃO

O revestimento contendo 75.000 UI de nisina mostrou-se efetivo na inibição dos patógenos em estudo, além de não ter sido sofrido qualquer alteração nas propriedades estudadas, revelando a possibilidade de uso dessa embalagem como carreador de antimicrobiano visando o aumento da vida de prateleira de queijos caprinos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, A.C.L.; DANTAS, G.C.; SANTOS, J.; AMORIM, R.V.S. Antimicrobial Effects of Native Chitosan against Opportunistic Gram-negative Bacteria. *Microbiology Journal*, v.1, p.105-112, 2011.

BISPO, V. M., MANSUR, A. A. P., MANSUR, H. P. Caracterização por espectroscopia de infravermelho de filmes de quitosana com diferentes quantidades de agente reticulante. Foz do Iguaçu, PR, Brasil, outubro, 2009.

CASTRO, R. H. R., GOUVÊA, D. (2000). Estudo da estabilidade de dispersões de SnO<sub>2</sub> utilizando L-Arginina ou quitosana como dispersantes. *Cerâmica* vol.46 no.300 São Paulo Oct./Nov./Dec. 2000.

CERQUEIRA, MIGUEL A., BARTOLOMEU W S SOUZA, JOSÉ A. TEIXEIRA, AND ANTÔNIO A. VICENTE. 2012. "Effect of Glycerol and Corn Oil on Physicochemical Properties of Polysaccharide Films - A Comparative Study." *Food Hydrocolloids* 27(1): 175–84.

CHHABRA, R. P.; RICHARDSON, J. F. Non-Newtonian flow and applied rheology: engineering applications. 2. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, p. 518, 2008.

DELVES-BROUGHTON, J. 2005. *Nisin as a food preservative*. *Food Australia* 57 (12), 525 e 527.

ELSABEE M.Z.; ABDU, E.S. (2013). *Chitosan based edible films and coatings: A review*. *Materials Science and Engineering C*, 33, 1819–1841.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F.. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V.69, p. 1–9, 2008.

RIVERO, S., GARCIA, M.A., & PINOTTI, A. (2009). *Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan*. *Journal of Food Engineering*, 90, 531–539.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* sp., para conservação e processamento de alimentos. *Alimentos e Nutrição*. Araraquara, v.16, n.4, p. 403-411, 2005.