

## MORFOLOGIA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOFIBRAS DE AMIDO DE BATATA INCORPORADAS COM CARVACROL

LAURA MARTINS FONSECA<sup>1</sup>; CLAUDIO EDUARDO DOS SANTOS CRUXEN<sup>2</sup>;  
GRAZIELLA PINHEIRO BRUNI<sup>3</sup>; FRANCINE TAVARES DA SILVA<sup>4</sup>;  
ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE<sup>5</sup>, ALVARO RENATO GUERRA DIAS<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas– laura\_mfonseca@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas– cbrcruzen@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas– graziellabruni@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas– francine-ts@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas– elessandrad@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas– alvaro.guerradias@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Embalagens ativas são utilizadas na indústria alimentícia com o objetivo não somente de conter e proteger alimentos, mas também de mantê-los seguros e prolongar sua vida útil. Essas embalagens podem interagir com o alimento de maneira direta ou indireta, como, por exemplo, pela ação de compostos voláteis como agentes antimicrobianos. Devido a grande demanda por inovações no setor alimentício, técnicas para produção dessas embalagens ativas vem sendo estudadas. A técnica de *electrospinning* apresenta grande potencial para encapsulação de compostos voláteis, protegendo-os contra elementos deletérios prolongando sua ação como bioativo. Essa técnica apresenta vantagens, como não serem utilizadas altas temperaturas durante o processo (o que é importante ao se incorporar compostos voláteis ao material polimérico) e produzir materiais em escala nanométrica (com grande relação área superficial/volume). Além disso, as nanofibras podem ser provenientes de polímeros naturais, como o amido, formando uma embalagem ativa biodegradável não causando danos ambientais quando descartadas (BHUSHANI & ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; WEN et al., 2016).

Entre os compostos voláteis com propriedades bioativas, os óleos essenciais ou seus compostos são largamente utilizados como agentes antimicrobianos. O carvacrol é o principal componente dos óleos de orégano ou tomilho. Sua ação ocorre ao acumular-se na membrana celular de uma bactéria, resultando em um aumento de cerca de 90% na permeabilidade celular do microrganismo, impedindo assim seu desenvolvimento e causando desidratação nas células bacterianas. Assim, seu uso em embalagens ativas como agente antimicrobiano pode ser eficaz na inibição de microrganismos patogênicos e que causam doenças transmitidas por alimentos (ALTAN, AYTAC, & UYAR, 2018).

Neste contexto visando a produção de um material biodegradável com atividade antimicrobiana para potencial formação de uma embalagem ativa que possa vir a ser aplicada no setor alimentício, o objetivo deste estudo foi produzir nanofibras de amido de batata solúvel incorporadas com carvacrol e a avaliação de sua morfologia, distribuição de tamanho e atividade antimicrobiana.

### 2. METODOLOGIA

Para produção das nanofibras foi preparada uma solução polimérica com 5 g (50%, p/v) de amido de batata solúvel (Sigma-Aldrich, CAS 9005-25-8) em 10 mL de ácido fórmico (75% em Milli-Q, v/v) sob agitação por 24 h. Após, o carvacrol ( $\geq 98\%$  pureza, Sigma-Aldrich, CAS 499-75-2) foi incorporado à solução

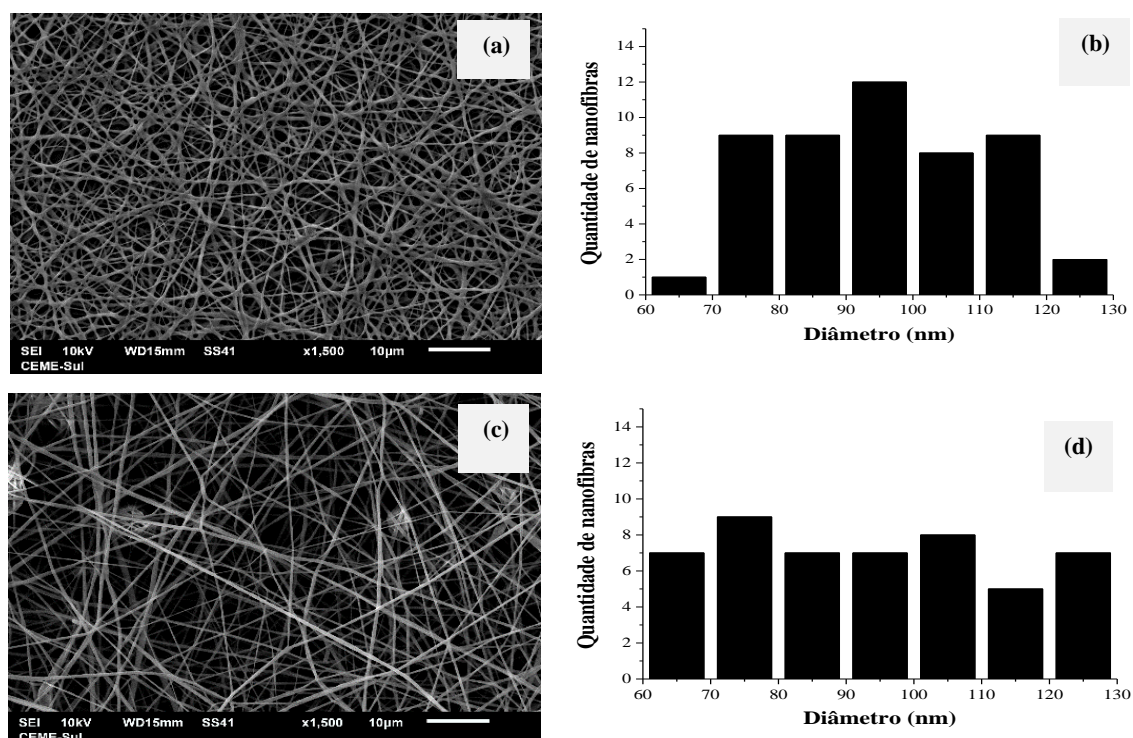
na concentração de 30% (v/p, em base seca), permanecendo sob agitação por 15 min. As nanofibras foram produzidas pela técnica de *electrospinning* utilizando-se um fluxo de alimentação de 0,6 mL/h, alta voltagem de 25kV e distância de 20 cm do coletor a ponta da agulha. Nanofibras sem o carvacrol (0%) foram utilizadas como controle. A avaliação da morfologia das nanofibras foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Jeol, JSM-6610LV, EUA) e utilizando as micrografias obtidas foi medida a distribuição de tamanho em 50 nanofibras pelo *software* ImageJ (versão 2015).

Para avaliação antimicrobiana do carvacrol foi realizado um ensaio em micro atmosfera de acordo com GHABRAIE et al. (2016), com modificações. *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* O:157 H:7 (NCTC 12900) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933) foram inoculadas em *Trypticase Soy Agar* (TSA, K25-610052, KASVI, Itália). O carvacrol foi então inoculado nas concentrações de 20, 30 e 40% em discos estéreis posicionados em placas de petri que foram incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana do carvacrol foi expressa em mm de zona de inibição. Para avaliação das nanofibras de amido com carvacrol na concentração de 30%, foi utilizada a mesma metodologia sendo agora as nanofibras colocadas na tampa das placas de petri e os resultados expressos em porcentagem redução de crescimento das bactérias, calculada pela diferença entre as células viáveis no ensaio das nanofibras controle (Nanofibras 0%) e das nanofibras com carvacrol (Nanofibras 30%).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia e a distribuição de tamanho das nanofibras de amido de batata solúvel com e sem carvacrol são apresentadas na Figura 1. Pode-se observar que as nanofibras sem carvacrol (controle, 0%) apresentaram-se fundidas e na forma de fita. Isso pode ser atribuído ao curto estiramento da solução durante o processo de formação de nanofibras por *electrospinning*. Já as nanofibras com incorporação de carvacrol (30%) apresentaram morfologia homogênea, com forma cilíndrica e orientadas aleatoriamente. Assim, pode-se dizer que a adição de carvacrol aprimorou a morfologia das nanofibras ocorrendo uma melhor volatilização do solvente no processo. A adição de carvacrol não influenciou na distribuição de tamanho das nanofibras, sendo que as sem carvacrol apresentaram valores de diâmetro mínimo de 69,1 nm, máximo de 123,9 nm e médio de 95,1 nm. As nanofibras com carvacrol apresentaram valores mínimo, máximo e médio de 60,9, 124,5 e 93,5 nm, respectivamente. Assim, podem ser consideradas nanofibras uma vez que apresentam diâmetros de até 100 nm.

**Figura 1.** Morfologia e distribuição de tamanho das nanofibras de amido de batata solúvel sem carvacrol (a, b) e nanofibras com 30% de carvacrol (c, d).



Na Tabela 1 pode ser observada a atividade antimicrobiana avaliada pelo ensaio de micro atmosfera do carvacrol e das nanofibras com 30% de carvacrol. Um aumento gradual no diâmetro das zonas de inibição foi observado com o aumento na concentração de carvacrol. Dentre as concentrações de carvacrol observadas de 20, 30 e 40% a de 30% foi a menor capaz de gerar zonas de inibição contra as quatro bactérias patogênicas estudadas, assim foram produzidas nanofibras de amido com a incorporação de carvacrol nessa contração. Essas fibras reduziram a viabilidade das bactérias em 89,0%, 68,0%, 62,0% e 49,0% para *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. As nanofibras apresentam grande área superficial em relação ao seu volume o que auxilia na liberação controlada do agente antimicrobiano prevenindo ou retardando o crescimento de microrganismos.

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana do carvacrol em diferentes concentrações (20, 30 e 40%) e das nanofibras incorporadas com 30% de carvacrol.

| Carvacrol (%) <sup>1</sup>                   | <i>L. monocytogenes</i><br>(ATCC 7644) | <i>S. aureus</i><br>(ATCC 7644) | <i>S. Typhimurium</i><br>(ATCC 14028) | <i>E. coli</i> O:157 H:7<br>(NCTC 12900) |
|--|--|---------------------------------|---------------------------------------|--|
| Diâmetro das zonas de inibição (mm)          |  |                                 |                                       |  |
| 20   | -                                      | 21,5 ± 2,5                      | 16,8 ± 6,5                            | 20,5 ± 0,5                               |
| 30   | 15,5 ± 0,5                             | 22,5 ± 2,5                      | 20,0 ± 0,0                            | 25,0 ± 2,0                               |
| 40   | 19,0 ± 1,0                             | 24,5 ± 0,5                      | 21,5 ± 0,5                            | 28,0 ± 2,0                               |
| Nanofibras com<br>carvacrol (%) <sup>2</sup> | <i>L. monocytogenes</i><br>(ATCC 7644) | <i>S. aureus</i><br>(ATCC 7644) | <i>S. Typhimurium</i><br>(ATCC 14028) | <i>E. coli</i> O:157 H:7<br>(NCTC 12900) |
| Redução do crescimento bacteriano (%)        |  |                                 |                                       |  |
| 30   | 89,0 ± 8,6                             | 49,0 ± 0,8                      | 68,0 ± 6,6                            | 62,0 ± 4,0                               |

Resultados expressos em médias (n=3) ± desvio padrão

<sup>1</sup> Concentração de carvacrol no ensaio de micro atmosfera

<sup>2</sup> Concentração de carvacrol nas nanofibras de amido no ensaio de micro atmosfera

### 3. CONCLUSÕES

A incorporação de carvacrol em nanofibras de amido aprimorou a morfologia das nanofibras apresentando diâmetros na ordem de nanômetros ( $D_{\text{médio}}$  de 93,5 nm). O carvacrol apresentou elevada atividade antimicrobiana pela ação volátil avaliada em micro atmosfera. Quando incorporado nas nanofibras apresentou percentuais de redução de crescimento bacteriano satisfatórios, principalmente para a bactéria *S. aureus* na qual uma redução de 50% é suficiente para inibir seu crescimento até concentrações que não permitam a formação de enterotoxinas. Assim, as nanofibras de amido com carvacrol apresentam potencial para serem aplicadas na formação de embalagens ativas de alimentos.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHUSHANI J. A., ANANDHARAMAKRISHNAN C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications, **Trends Food Sci. Technol.**, v. 38, p. 21–33, 2014.
- WEN P., ZHU D.-H., WU H., ZONG M.-H., JING Y.-R., HAN S.-Y. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging, **Food Control**, v. 59, p. 366–376, 2016.
- ALTAN A., AYTAC Z., UYAR T. Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly (lactic acid) for active food packaging, **Food Hydrocoll.**, v. 81, p. 48–59, 2018.
- GHABRAIE M., VU K. D., TATA L., SALMIERI S. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat, **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 66, p.332–339, 2016.