



## Microencapsulação de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e nisina em leiteiro

### Microencapsulation of *Melaleuca alternifolia* essential oil and nisin in buttermilk

#### RESUMO

O consumidor atual busca por melhor qualidade dos produtos alimentícios, incluindo redução no uso de conservantes químicos. Dentro desse contexto, o objetivo do presente trabalho é utilização de encapsulação de óleo de *Melaleuca alternifolia* e nisina revestido com leiteiro, verificando a atividade antimicrobiana do material encapsulado contra bactérias veiculadas por alimentos. O óleo e nisina foram encapsulados com leiteiro utilizando as técnicas de liofilização e *spray dryer*. A atividade antimicrobiana do material encapsulado foi testada pela técnica de poço de difusão em ágar. O óleo puro e em solução a 10% apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, já o óleo microencapsulado perdeu essa capacidade. A nisina apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas. O melhor resultado de encapsulação foi com a técnica de liofilização. Não obtivemos resultados favoráveis com a técnica de *spray dryer*. A inibição das bactérias ocorreu mesmo após 30 e 60 dias de armazenamento do encapsulado. O microencapsulado de nisina e leiteiro apresentou rendimento de 86%, solubilidade de 20% e umidade de 43%. Com o resultado obtido, foi possível observar que a nisina microencapsulada com leiteiro apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias potencialmente patogênicas veiculadas por alimentos, podendo ser uma estratégia de conservação.

**PALAVRAS-CHAVE:** bacteriocina; subproduto da manteiga; *spray dryer*; liofilização

#### ABSTRACT

The current consumer is looking for better quality of food products, including reducing the use of chemical preservatives. Within this context, the objective of the present work is to use encapsulation of *Melaleuca alternifolia* oil and nisin coated with buttermilk, verifying the antimicrobial activity of the encapsulated material against bacteria transmitted by food. The oil and nisin were encapsulated with buttermilk using lyophilization and spray drying techniques. The antimicrobial activity of the encapsulated material was tested using the agar diffusion well technique. The pure oil and in 10% solution showed antimicrobial activity against all tested microorganisms, whereas the microencapsulated oil lost this ability. Nisin showed antimicrobial activity against the tested bacteria. The best encapsulation results were obtained with the lyophilization technique. We did not obtain favorable results with the spray dryer technique. The inhibitory remaining active after 30 and 60 days of storage. The microencapsulated nisin and buttermilk showed a yield of 86%, solubility of 20% and moisture of 43%. With the result obtained, it was possible to observe that nisin microencapsulated with buttermilk showed antimicrobial activity against potentially pathogenic bacteria transmitted by food, which could be a conservation strategy.

**KEYWORDS:** bacteriocin; butter by-product; spray dryer; lyophilization

#### INTRODUÇÃO

Muitos consumidores optaram por alimentos com baixas concentrações de aditivos químicos, ou até mesmo por nenhuma adição, porém o risco de não se utilizar aditivos químicos e conservantes é a alta contaminação bacteriana ou baixa vida útil do alimento (BAKKALI et al., 2008). O uso de compostos naturais (peptídeos antimicrobianos e óleos essenciais) tem sido uma opção de substituição aos agentes químicos (BALLESTEROS, et al.,



2017). Porém os óleos apresentam sensibilidade quando expostos a presença de luz, calor e oxigênio, sendo oxidados e degradados com certa facilidade, sendo esse aspecto o principal responsável pela baixa utilização de óleos em indústrias alimentares (BALLESTEROS, et al., 2017).

Portanto, há necessidade da criação ou aprimoramento de técnicas que proporcionam uma maior estabilidade, proteção e que assegure as principais propriedades do óleo. Uma técnica já conhecida, é o encapsulamento, apropriando-se de compostos considerados resistentes ao calor, e que possua atrações física e química com os principais ativos (BALLESTEROS et al., 2017).

A bacteriocina mais conhecida é a nisina, utilizada contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. As inter-relações entre nisina e componentes da matriz alimentar, como proteínas, lipídios, íons e surfactantes, podem reduzir a ação antimicrobiana. Para mitigar essa ação, os protocolos de microencapsulação tem sido o tratamento de escolha (RODRÍGUEZ et al., 2000).

O leiteiro é um subproduto da produção de manteigas, onde com a formação de grandes aglomerados de gordura, resulta na inversão de fases de uma emulsão óleo/água (creme) para uma emulsão água/óleo (manteiga). Essas propriedades do leiteiro torna-o um coproduto da fabricação da manteiga valioso para a utilização como ingrediente em diferentes produtos, contudo, não há relatos de sua utilização como agente microencapsulante. (SANTA ROSA et al., 2021).

Em vista do exposto, este trabalho propôs microencapsular nisina e óleo de melaleuca em leiteiro, visando sua utilização como conservante de alimentos.

## MATERIAIS E METODOS

### MATERIAL QUIMICO E BIOLÓGICO

O leiteiro foi doado por uma empresa da cidade de Londrina/Pr. Todos os meios de cultura e reagentes utilizados pertencem ao laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LAmBA) da UTFPR, campus Londrina. O óleo de *M. alternifolia* (TTO) (Madon & Amp; Betché) foi adquirido no comércio local; a nisina utilizada foi da marca Bela Vista. As bactérias indicadoras foram *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*),



*Salmonela*, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). As culturas estão estocadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol e armazenados em freezer no LAmBA da UTFPR.

#### ENSAIO ANTIMICROBIANO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

A atividade antibacteriana do óleo de *M. alternifolia* foi realizado pela técnica de difusão em ágar. Em placas com meio Brain Heart Infusion (BHI) foi semeado  $1 \times 10^7$  ufc/mL das bactérias testadas. Posteriormente, foram feitos poços no agar e em cada um adicionado 30  $\mu$ L do óleo essencial concentrado e em solução a 10%, ou solução de nisina a 2,5 mg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. O diâmetro da zona de inibição foi medido. Água destilada estéril foi utilizada como controle negativo.

#### MICROENCAPSULAÇÃO E TESTE DE ESTABILIDADE

A microencapsulação de óleo de *M. alternifolia* e nisina foi realizada da seguinte forma: 100 mL de uma solução de leiteiro (20%) foi preparada com água destilada e agitada até dissolução completa. Posteriormente, foi seguido o protocolo de emulsão com óleo de *M. alternifolia* ou mistura de solução de nisina seguido dos processos de encapsulação. No processo de liofilização, as soluções foram distribuídas em placas de Petri e congeladas por 24 hs, seguido de liofilização por 24 hs. Já o processo de *spray dryer*, seguiu-se os parâmetros de 190 °C na temperatura de entrada; temperatura de saída 100°C; pressão de ar 5,0 kgf/cm<sup>2</sup> e taxa de fluxo 0,8 L/h. Após o processo de encapsulação, uma solução de 5 mg/mL de cada produto encapsulado foi preparada em água destilada estéril e testado a atividade antimicrobiana como descrito acima.

O material microencapsulado (pó) foi armazenado sobre refrigeração e após 30 e 60 dias foi repetido o teste de antagonismo para verificar a estabilidade do material encapsulado. A concentração da solução testada foi de 80 mg/mL.

#### RENDIMENTO, SOLUBILIDADE E TEOR DE UMIDADE

O rendimento foi calculado como a razão entre o peso do pó coletado após a liofilização e a quantidade inicial de sólidos na suspensão inicial (BRAND, 2019).



A solubilidade seguiu protocolo descrito por Carneiro (2011). Amostras de pó (2,5 g) foi colocado em 50 mL de água destilada, após centrifugação o sobrenadante foi seco em estufa incubadora a 100 °C até obtenção de peso seco constante. A solubilidade foi calculada conforme a equação 1

$$\text{solubilidade (\%)} = \text{solido soluvel} \div \text{solido total} \times 100 \quad (1)$$

O teor de umidade das amostras foi medido secando 1 g de amostra em uma incubadora a 102 °C até peso constante ser atingido.

#### CURVAS DE MORTE BACTERIANO

Os isolados bacterianos ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) foram inoculadas em 10 mL de meio BHI líquido e adicionado 2 mL da suspensão dos microencapsulados, incubado a 37 °C por 24 h, sob agitação a 180 rpm em agitador rotativo. A cada tempo, uma alíquota foi retirada se realizou-se a contagem de unidade formadora de colônia.

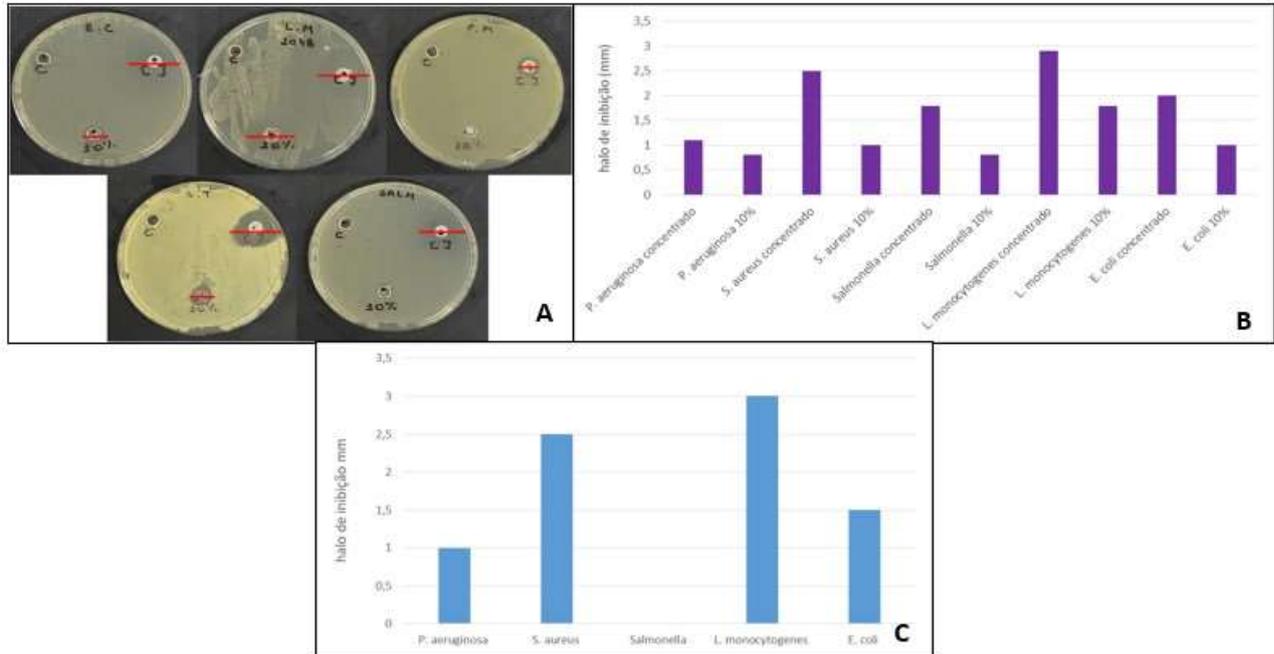
#### RESULTADO E DISCUSSÃO

A figura 1 A e B apresenta o halo de inibição e o tamanho do halo em mm, respectivamente, das bactérias teste *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Salmonella* sp. com o óleo de TTO puro e na solução a 10%. Diversos estudos mostram que o TTO possui efeito bactericida in natura e bacteriostático em baixas concentrações (CARSON et al., 2006). A Figura 1C apresenta o halo de inibição (em mm) da solução de nisina. Podemos observar que o TTO inibiu todas as bactérias testadas e a nisina não apresentou efetividade contra *Salmonella*.

Optou-se pela técnica de liofilização pois o material obtido foi um pó fino e de fácil manipulação. Ao testar a inibição do TOO microencapsulado não houve formação halo; já o microencapsulado leiteiro e nisina houve halo de inibição para as bactérias *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*; porém não tivemos o resultado quanto a bactéria *P.aeruginosa*. O teste antimicrobiano foi feito após 30 e 60 dias após a liofilização, sendo que a atividade antimicrobiana foi mantida na mesma eficiência, mostrando a estabilidade do produto. As propriedades físicas das amostras de pó são apresentadas na Tabela 1.



Figura 1 – (A) Halos de inibição formado com óleo de *Melaleuca alternifolia*; (B) tamanho do halo (mm) de inibição.



Fonte: Autoria própria (2023).

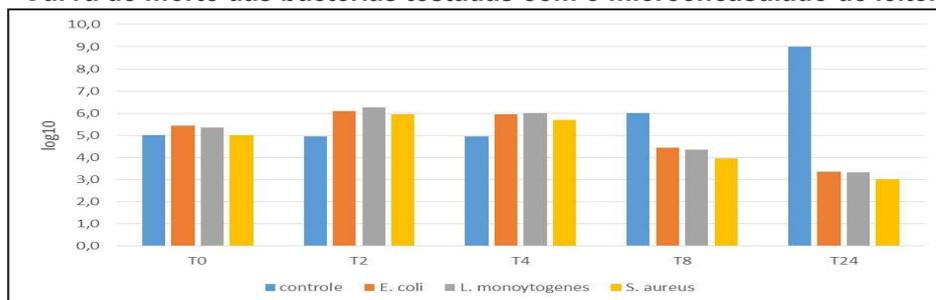
Tabela 1 - propriedades físicas das amostras

Amostras	Rendimento (%)	Solubilidade (%)	Umidade (%)
Controle	87	14	47
Nisina microencapsulada	86	20	43

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

A figura 2 apresenta a curva de morte das bactérias testadas e a nisina encapsulada. Observamos que após 8 hs de incubação já havia redução das bactérias testada, mantendo a inibição com 24 hs. Esses resultados são muito promissores para utilizar a nisina encapsulada no controle de patógenos alimentares.

Figura 2 – Curva de morte das bactérias testadas com o microencasulado de leiteinho e nisina.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).



## CONCLUSÃO

A nisina foi encapsulada em leiteiro pela técnica de liofilização, mantendo estabilidade e atividade antimicrobiana após 60 dias de armazenamento. Desta forma, poderiam ser potenciais conservantes naturais em alimentos, contribuindo para a prevenção da contaminação dos alimentos por microrganismos nocivos à saúde humana.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à UTFPR pelo incentivo à pesquisa (edital PROPPG 07/2022). Luana de Carvalho agradece à Capes pela concessão de bolsa do mestrado.

## CONFLITO DE INTERESSE

“Não há conflito de interesse”.

## REFERÊNCIAS

BAKKALI, Fadil et al. Efeitos biológicos dos óleos essenciais – uma revisão. **Toxicologia alimentar e química**, v. 46, n. 2, pág. 446-475, 2008.

BALLESTEROS, Lina F. et al. Encapsulamento de compostos fenólicos antioxidantes extraídos de borra de café por liofilização e atomização utilizando diferentes materiais de revestimento. **Química Alimentar**, v. 237, pág. 623-631, 2017.

RODRÍGUEZ, Eva et al. Diversidade de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de leite cru. **Revista Internacional de Laticínios**, v. 1-2, pág. 7-15, 2000.

CARSON, Christine F.; HAMMER, Katherine A.; RILEY, Thomas V. Óleo de *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá): uma revisão das propriedades antimicrobianas e outras propriedades medicinais. **Revisões de microbiologia clínica**, v. 19, n. 1, pág. 50-62, 2006.

SANTA ROSA, LÍVIA NEVES; PIRES, EANACDOS. Leiteiro: um coproduto versátil. MilkPoint, 2021.

BRAND, Rafaela Dal'Prá. Aplicação de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado com diferentes materiais de parede em preparado sólido para refresco. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

CARNEIRO, H. C. F. Microencapsulação de óleo de linhaça por spray drying: influência da utilização de diferentes combinações de materiais de parede. (Dissertação de Mestrado). Campinas – SP. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2011.