



Área: Tecnologia de Alimentos

PROPRIEDADES TÉRMICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CARVACROL (5-isopropil-2-metilfenol) ENCAPSULADO EM NANOFIBRAS DE AMIDO DE BATATA

Elder Pacheco da Cruz*, Laura Martins Fonseca, Elessandra da Rosa Zavareze, Alvaro Renato Guerra Dias

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas (UFPel), RS, Brasil

**E-mail: elderpachecodacruz@gmail.com*

RESUMO – O carvacrol é o componente principal dos óleos essenciais de orégano e tomilho, e, seu uso em embalagens ativas pode ser eficaz na inibição de reações oxidativas, atuando como um agente antioxidante em alimentos. Deste modo, objetivou-se produzir nanofibras de amido/carvacrol pela técnica de *electrospinning* e analisá-las quanto à eficiência de encapsulação (EE) (por cromatografia gasosa), estabilidade térmica quando submetidas a diferentes tratamentos térmicos (100 °C e 180 °C), propriedade térmica (por análise termogravimétrica) e quanto a sua atividade antioxidante (pela eliminação radical ABTS•+). A EE foi de 26,8% para as nanofibras com 30% (v/p) de carvacrol e 27% para as nanofibras com 40% (v/p) de carvacrol que apresentaram comportamentos distintos quanto à estabilidade térmica. As nanofibras apresentaram alta quantidade do carvacrol mesmo após a aplicação dos tratamentos térmicos. Apesar da eficiência de encapsulação mostrar-se baixa, o carvacrol quando incorporado nas nanofibras foi protegido retardando a sua temperatura de degradação. A atividade antioxidante das nanofibras foi alta variando de 18,9 a 83,1% aumentando à medida que as concentrações de carvacrol aumentaram. Portanto, é possível sugerir que as nanofibras de amido incorporadas com carvacrol produzidas apresentaram grande potencial para elaboração de embalagens ativas de alimentos.

Palavras-chave: *Electrospinning*; composto bioativo; Encapsulação.

1 INTRODUÇÃO

Impulsionado pela alta demanda, a ciência e tecnologia de alimentos tem buscado inovações em vários setores. Dentre diversas inovações, as embalagens ativas de alimentos têm sido bastante promissoras, por serem projetadas não somente para conter e proteger os alimentos, mas também para interagir de maneira positiva, promovendo benefícios, seja para os alimentos ou para o consumidor. Diante desse contexto, as embalagens ativas ou inteligentes aparecem como uma alternativa para atender às demandas do setor alimentício (ALMEIDA et al., 2015; HALAL; COLUSSI, 2017; FONSECA et al., 2019a). Para obtenção de uma embalagem ativa geralmente utiliza-se processos tecnológicos via técnicas de nanoencapsulação e microencapsulação de compostos bioativos e de imobilização enzimática (HALAL; COLUSSI, 2017). Deste modo, estudos no desenvolvimento de embalagens usando a nanotecnologia estão crescendo na ciência e na indústria de alimentos.

A técnica de *electrospinning* é considerada uma excelente alternativa para nanoencapsulação de bioativos alimentares em matrizes poliméricas de origem natural. Essa técnica apresenta vantagens como processamento simples, alta eficiência de encapsulação, baixo custo e não envolve altas temperaturas ou pressões ao produzir materiais em escala nanométrica (GARCÍA-TEJEDA et al., 2013; MOOMAND; LIM, 2014). Os óleos essenciais ou seus compostos isolados são muito utilizados como agentes antioxidantes e antimicrobianos, dentre esses compostos, destaca-se o carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol). O carvacrol é o componente principal dos óleos essenciais de orégano e tomilho, e, seu uso em embalagens ativas pode ser eficaz na inibição de patógenos que causam doenças de origem alimentar. Além disso, este composto pode atuar como um agente antioxidante em embalagens para produtos alimentícios suscetíveis à oxidação durante o armazenamento (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; ALTAN; AYTAC; UYAR, 2018; TAMPAU; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ; CHIRALT, 2018; STOJANOVIC et al., 2019).

Atualmente, o uso de compostos bioativos é limitado devido ao seu impacto sensorial em produtos alimentícios e sua baixa estabilidade. No entanto, esse problema pode ser solucionado quando encapsulado, visando impedir as interações negativas dos compostos com os produtos alimentícios, bem como promover sua liberação controlada e específica e impedir sua degradação. Assim, ao nanoencapsular o carvacrol, é possível manter sua eficiência como agente antioxidante, quando aplicado diretamente no produto alimentício, na superfície do alimento ou quando incorporado em embalagem ativas (TAS et al., 2019). O uso de polímeros naturais para encapsular compostos bioativos é uma tendência inovadora, pois os estes polímeros reduzem o impacto ambiental causado pelo descarte de polímeros sintéticos frequentemente usados na produção de embalagens de alimentos (FONSECA et al., 2018).



O amido é um material biodegradável e renovável extraído de fontes naturais, como batata, e apresenta grande potencial para aplicações como matriz polimérica devido à sua biocompatibilidade, baixo custo e versatilidade (HALAL et al., 2015; LI; CHEN; YANG, 2016).

Frente ao exposto, objetivou-se no presente estudo, produzir nanofibras de amido/carvacrol pela técnica de *electrospinning* e analisá-las quanto à eficiência de encapsulação (EE), estabilidade térmica quando submetidas a diferentes tratamentos térmicos e quanto a sua atividade antioxidante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Utilizou-se amido de batata solúvel ($C_6H_{10}O_5$, Sigma-Aldrich, CAS 9005-25-8) com $32,5 \pm 3,6\%$ de teor de amilose, conforme determinado por Fonseca et al. (2019b), como matriz polimérica para formação de fibras. O ácido fórmico foi utilizado como solvente (85% de pureza, Synth, CAS 01A1034.01) e o carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) adquirido da Sigma-Aldrich (pureza $\geq 98\%$, CAS 499-75-2).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação das soluções amido/carvacrol e processo de *electrospinning*

As soluções solúveis de amido/carvacrol foram preparadas conforme descrito em nosso estudo anterior (FONSECA et al., 2019a) pela gelatinização de amido em ácido fórmico (75% em água Milli-Q, v/v) na concentração de 50% (5 g de amido (p/v) em 10 mL de ácido fórmico). O carvacrol foi adicionado à solução nas concentrações de 30 e 40% (v/p, base seca) e agitado por 15 min para completa dissolução.

As soluções foram utilizadas para produção das nanofibras de amido para encapsular o carvacrol pela técnica de *electrospinning*. As soluções foram preparadas, em seguida, colocadas em uma seringa plástica de 3 mL com agulha de aço inoxidável de 0,7 mm de diâmetro e bombeadas a uma taxa de fluxo constante de $0,60 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ por uma bomba de infusão de seringa (KD Scientific, Model 100, Holliston, Inglaterra). Uma placa coletora de aço inoxidável aterrada foi posicionada a 20 cm da ponta da agulha. Uma fonte de alimentação (Instor, INSES-HV30, Brasil) foi utilizada para aplicar uma tensão de 25 kV no sistema. As nanofibras de amido/carvacrol foram produzidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e a umidade relativa ajustada em $45 \pm 2\%$ com um desumidificador. A solução de amido sem carvacrol (0%, p/v) foi utilizada como controle.

2.2.2 Eficiência de encapsulação (EE) e estabilidade térmica

A EE das nanofibras de amido/carvacrol foi analisada por cromatografia gasosa. As nanofibras (15 mg) foram dissolvidas em água Milli-Q, v/v (0,5 mL) e agitadas em vórtex. Em seguida, foram adicionados 300 μL de hexano, novamente a mistura foi agitada no vórtex e centrifugada por 2 min a 1500 g. A fração apolar foi injetada em um espectrômetro de massa padrão para cromatografia em fase gasosa Shimadzu GCMS QP2010 Ultra (Shimadzu TM, Kyoto, Japão) equipado com o injetor automático AOC-20i e a biblioteca espectral de massa do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST 2011). As amostras foram injetadas (1 μL) com a temperatura do injetor definida em $200 \text{ }^\circ\text{C}$, em modo dividido (1:50), usando hélio como gás de arraste a uma taxa de fluxo de $54 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e velocidade linear como modo de controle de fluxo. Uma coluna capilar OV-5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm) foi usada com a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial ajustada em $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 min, temperatura de aceleração de $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $180 \text{ }^\circ\text{C}$, manutenção da temperatura a $180 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 min, temperatura de aceleração adicional de $40 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $280 \text{ }^\circ\text{C}$, seguida pela manutenção da temperatura por 1,5 min, totalizando uma corrida de 30 min. Os parâmetros de espectrometria de massa (MS) foram os seguintes: fonte de íons e interface definidas em $260 \text{ }^\circ\text{C}$ e $270 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. A faixa de massa foi digitalizada de 40 a 450 m/z a uma taxa de 0,2 varreduras por segundo. A identificação foi realizada comparando-se massa molecular, fórmula molecular e perfil de fragmentação com os disponíveis na biblioteca espectral de massas, NIST 2011. Além disso, n-alcenos (C8-C30) foram usados para determinar um índice de tempo de retenção calculado automaticamente pelo Shimadzu Programas.

A EE foi calculada pela Equação 1, onde a "quantidade teórica de carvacrol" é igual à quantidade total de carvacrol carregado nas nanofibras e a "quantidade real de carvacrol" é o valor medido no experimento de cromatografia em fase gasosa.

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade real de carvacrol em nanofibras de amido}}{\text{Quantidade teórica de carvacrol em nanofibras de amido}} \times 100 \quad (\text{Equação 1}).$$



As nanofibras de amido/carvacrol foram submetidas a tratamentos térmicos em duas temperaturas (100 °C e 180 °C por 20 min) para avaliar a estabilidade térmica. O mesmo método usado para análise de EE foi usado para medir a quantidade restante de carvacrol nas nanofibras após tratamentos térmicos.

2.2.3 Propriedades térmica

A propriedades térmica das nanofibras e seus constituintes (amido de batata solúvel e carvacrol) foi determinada por um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Quioto, Japão). 5 mg das amostras foram aquecidas em cápsulas de platina com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em uma faixa de 30-600 °C e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹. Uma cápsula de platina vazia foi usada como referência.

2.2.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das nanofibras de amido/carvacrol foi avaliada pela eliminação radical ABTS•+ de acordo com a metodologia descrita por Freitas et al. (2018), com pequenas modificações. A solução estoque de ABTS•+ 7,4 mM (5 mL) foi misturada com persulfato de sódio 140 mM (88 µL) e mantida no escuro por 16 h em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após, foi diluído com etanol e ajustado até 0,70 ± 0,05 nm medido a 734 nm. As fibras de amido (10 mg) foram adicionadas em 3,0 mL da solução ABTS•+, misturado no vortex por 30 s e mantido por 6 min no escuro à temperatura ambiente.

A leitura foi realizada a 734 nm e para o controle foi utilizada água destilada. Os resultados foram calculados pela Equação 2, e expressos em porcentagem de inibição, onde ABS_{nanofibras} é a absorvância medida para as nanofibras e ABS_{carvacrol} é a absorvância medida para o carvacrol puro.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{ABS}_{\text{nanofibras}} - \text{ABS}_{\text{carvacrol}}}{\text{ABS}_{\text{nanofibras}}} \times 100 \quad (\text{Equação 2}).$$

2.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi aplicado para comparar as médias ao nível de significância estatística de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A EE do carvacrol em nanofibras de amido está relacionado com a porcentagem de carvacrol retido na matriz de encapsulamento (nanofibras de amido) após o processo de *electrospinning*. A EE (Tabela 1) foi de 26,8% para as nanofibras com 30% (v/p) de carvacrol e 27% para as nanofibras com 40% (v/p) de carvacrol. Esses valores diferiam estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre si.

Tabela 1. Eficiência de encapsulação e estabilidade térmica das nanofibras de amido/carvacrol

Nanofibras de amido/carvacrol ¹	Eficiência de encapsulação (%)	Tratamento térmico		
		Sem exposição	100 °C	180 °C
Carvacrol nas nanofibras (mg.g ⁻¹)				
30 %	26,8 ± 0,1 ^b	80,48 ± 0,23 ^{bb}	83,72 ± 0,37 ^{aa}	64,64 ± 0,47 ^{ac}
40 %	27,0 ± 0,1 ^a	108,00 ± 0,47 ^{aa}	64,88 ± 0,31 ^{bb}	43,53 ± 0,44 ^{bc}

Os resultados são expressos como média (n=3) ± desvio padrão

¹ Concentração de carvacrol (v/p) nas nanofibras amido

^{a,b,c} Os valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

^{A,B,C} Os valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

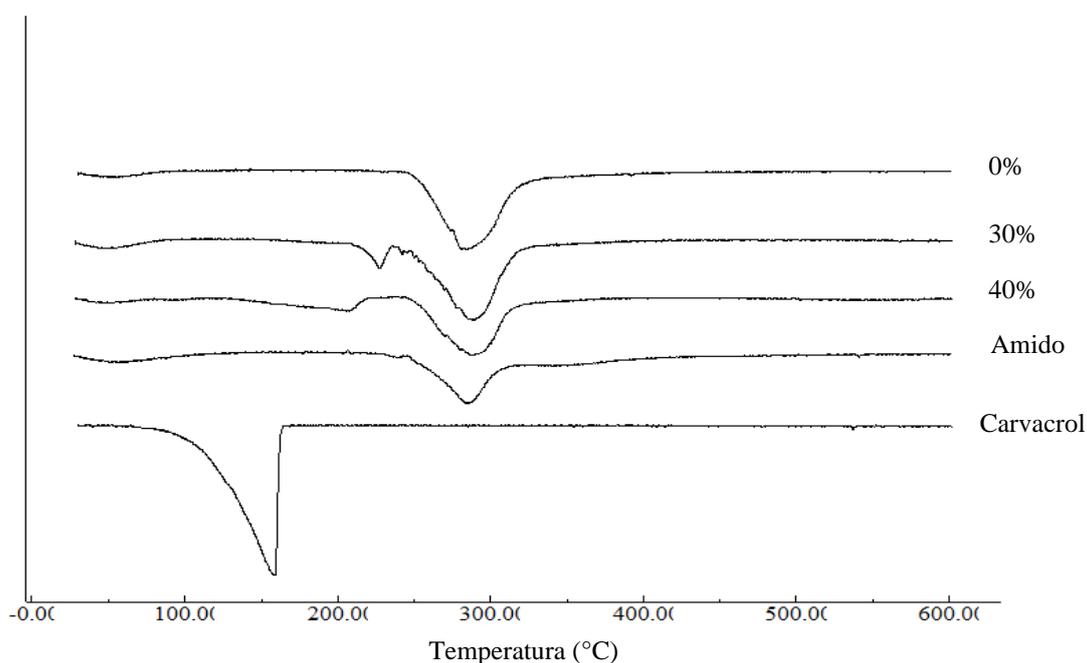
As nanofibras apresentaram comportamentos distintos para cada concentração de carvacrol quanto à estabilidade térmica (Tabela 1).



As nanofibras com 30% (v/p) de carvacrol mostraram um leve aumento na quantidade de carvacrol de 80,48 mg.g⁻¹ para 83,72 mg.g⁻¹ quando aplicado o tratamento de 100 °C e reduzindo para 64,64 mg.g⁻¹ quando aplicado o tratamento de 180 °C. Já as nanofibras com 40% (v/p) de carvacrol apresentaram quantidade reduzida do composto de 108,00 mg.g⁻¹ para 64,88 mg.g⁻¹ e logo para 43,53 mg.g⁻¹, quando aplicados os tratamentos de 100 e 180 °C, respectivamente. Entretanto, mesmo com quantidades reduzidas, as nanofibras de amido mostraram proteger o carvacrol apresentando altas quantidades do composto mesmo após a aplicação dos tratamentos térmicos.

Quanto à propriedade térmica, ilustrada na Figura 1 pela primeira derivada (DTG) dos termogramas, é possível observar que o carvacrol mostrou um estágio de degradação com temperatura inicial de aproximadamente 160 °C. Já quando encapsulado nas nanofibras esta degradação se iniciou na faixa de 200–250 °C. Esse resultado demonstra que os carvacrol (mesmo com baixos valores de EE) foi protegido nas nanofibras retardando a sua temperatura de degradação. Além disso, as nanofibras de amido/carvacrol mostraram três estágios de degradação (Figura 1) sendo um referente à perda de água em aproximadamente 100 °C, um relacionado à degradação do carvacrol (200–250 °C) e, por fim, um em 250–300 °C, da degradação do amido de batata solúvel.

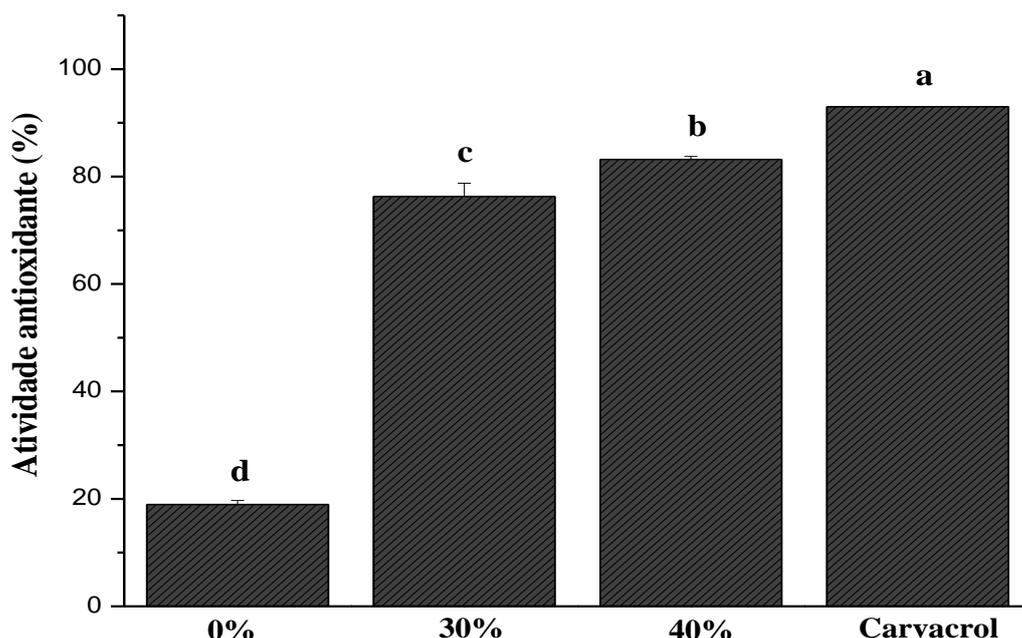
Figura 1. Curvas de DTG das nanofibras de amido/carvacrol.



A atividade antioxidante frente ao radical ABTS do carvacrol livre é apresentada na Figura 2. Este apresentou alta atividade antioxidante com 92,9% de inibição a oxidação, o que está de acordo com o resultado relatado por Ramos et al. (2014).



Figura 2. Atividade antioxidante das nanofibras de amido/carvacrol.



A atividade antioxidante das nanofibras (Figura 2) variou de 18,9 a 83,1% ($p \leq 0,05$) de inibição ao radical $ABTS^{\bullet+}$, aumentando à medida que as concentrações de carvacrol aumentaram de 0 a 40% (v/p). As nanofibras de amido com 30 e 40% (v/p) de carvacrol apresentaram alta atividade antioxidante com 76,2 e 83,1% de inibição a oxidação. Mesmo apresentando valores baixos de EE, as nanofibras apresentaram satisfatória atividade antioxidante frente ao radical avaliado, com valores acima de 76%. Homayouni et al. (2017) avaliaram as atividades antioxidantes de dispersões feitas de tapioca gelatinizadas e amido de tapioca incorporados com carvacrol e também relatou que a adição de carvacrol aumenta a atividade antioxidante. Os mesmos autores afirmaram que a capacidade de eliminação radical do $ABTS^{\bullet+}$ indica presença de átomos de hidrogênio do carvacrol e sua capacidade de doar elétrons para o radical.

Problemas como oxidação lipídica e crescimento microbiano são os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos (MADSEN; BERTELSEN, 1995). Logo, a adição de antioxidantes da indústria visa evitar a degradação térmica durante o processamento, entretanto, antioxidantes sintéticos são os mais usados em produtos alimentícios (GOMEZ-ESTACA et al., 2014). Uma solução plausível para esses problemas seria o uso de antioxidantes naturais, que não são prejudiciais para saúde humana. Portanto, a partir dos resultados da atividade antioxidante, é possível sugerir que as nanofibras de amido incorporadas com carvacrol produzidas no atual estudo apresentaram grande potencial para uso em embalagem de alimentos, especialmente em embalagens ativas.

4 CONCLUSÃO

A eficiência de encapsulação das nanofibras apresentou baixos valores de 26,8% e 27,0% para as nanofibras com 30 e 40% (v/p), respectivamente. Entretanto, o carvacrol foi protegido, o que pode ser sugerido pela quantidade de carvacrol apresentadas mesmo após a aplicação dos tratamentos com altas temperaturas. Assim, as nanofibras de amido/carvacrol mostraram alta estabilidade térmica e um aumento na temperatura de degradação. Foi obtida alta atividade antioxidante com valores acima de 70% de inibição a oxidação do radical $ABTS^{\bullet+}$. Portanto, as nanofibras de amido/carvacrol produzidas apresentaram grande potencial para uso em embalagens ativas de alimentos.

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.C.S.; FRANCO, E.A.N.; PEIXOTO, F.M.; PESSANHA, K.L.F.; MELO, N.R. Aplicação de nanotecnologia em embalagens de alimentos. **Polímeros**. v.25, p.89-97, 2015.
- ALTAN, A.; AYTAC, Z.; UYAR, T. Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly(lactic acid) for active food packaging. **Food Hydrocolloids**. v.81, p.48-59, 2018.



- FONSECA, L.M.; CRUXEN, C.E.S.; BRUNI, G.P.; FIORENTINI, A.M.; ZAVAREZE, E.R.; LIM, L.-T.; DIAS, A.R.G. Development of antimicrobial and antioxidant electrospun soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.139, p.1182-1190, 2019a.
- FONSECA, L.M.; HENKES, A.K.; BRUNI, G.P.; VIANA, L.A.N.; MOURA, C.M.; FLORES, W.H.; GALIO, A.F. Fabrication and Characterization of Native and Oxidized Potato Starch Biodegradable Films. **Food Biophysics**. v. 13, p. 163–174, 2018.
- FONSECA, L.M.; SILVA, F. T.; ANTUNES, M. D.; HALAL, S. L. M.; LIM, L-T.; DIAS, A. R. G. Aging Time of Soluble Potato Starch Solutions for Ultrafine Fibers Formation by *Electrospinning*. **Starch – Stärke**. v.71, p.1–7. 2019b.
- FREITAS, T. B. de.; SANTOS, C. H. K.; SILVA, M. V.; SHIRAI, M. A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C.F.R.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V. Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packag. Shelf Life**, v.15, p.28-34, 2018.
- GARCÍA-TEJEDA, Y. V.; LÓPEZ-GONZALEZ, C.; PÉREZ-OROZCO, J. P.; RÉNDON-VILLALOBOS, R.; JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; FLORES-HUICOCHEA, E.; SOLORZA-FERIA, J.; BATISDA, A. Physicochemical and mechanical properties of extruded laminates from native and oxidized banana starch during storage. **Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 447–455, 2013.
- GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**. v.35, p.42–51, 2014.
- HALAL, S.L.M.; COLUSSI, R.; DEON, V.G.; PINTO, V.Z.; VILLANOVA, F.A.; CARREÑO, N.L.V.; ZAVAREZE, E.R. Films based on oxidized starch and cellulose from barley. **Carbohydrate Polymers**. v. 133, p. 644–653, 2015.
- HALAL, S.L.M.E.; COLUSSI, R. Inovações em Embalagens para Alimentos. **Labgrãos Magazine**. v.1, n.1, 2017.
- HOMAYOUNI, H.; KAVOOSI, G.; NASSIRI, S.M. Physicochemical, antioxidant and antibacterial with carvacrol. **LWT – Food Science and Technology**. v.77, p.503-509, 2017.
- MADSEN, L.M.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**. v.6, p.271-277. 1995.
- MOOMAND, K.; LIM, L.-T. Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres. **Food Research International**. v. 62, p. 523-532, 2014.
- RAMOS, M.; BELTRÁN, A.; PELTZER, M.; VALENTE, A.J.M.; GARRIGÓS, M.D.C. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. **LWT – Food Science and Technology**. v.58, p.470-477, 2014.
- STOJANOVIC, N. M.; STEVANOVIC, M.; RANDJELOVI, P.; MITIC, K.; PETROVIC, V.; MLADENOVIC, B.; LALIC, J.; RADULOVIC, N. S. Low dose of carvacrol prevents rat pancreas tissue damage after L-arginine application, while higher doses cause pancreatic tissue impairment. **Food and Chemical Toxicology**. v.128, p.280–285, 2019.
- TAMPAU, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Release kinetics and antimicrobial properties of carvacrol encapsulated in electrospun poly- (ϵ -caprolactone) nanofibres. Application in starch multilayer films. **Food Hydrocolloids**. v.79, p.158–169, 2019.
- TAS, B.A.; SEHIT, E.; TAS, C.E.; UNAL, S.; CEBECI, F.C.; MENCELOGLU, Y.Z.; UNAL, H. Carvacrol loaded halloysite coatings for antimicrobial food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**. v. 20, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.004>