

Nanoemulsão de cinamaldeído assistida por ultrassom: otimização das variáveis operacionais, propriedades coloidais e atividade antibacteriana *in-vitro*

Ultrasound-assisted cinnamaldehyde nanoemulsion: optimization of operational variables, colloidal properties and *in-vitro* antibacterial activity

Nanoemulsión de cinamaldehído asistida por ultrasonidos: optimización de las variables operativas, propiedades coloidales y actividad antibacteriana *in vitro*

Recebido: 24/06/2022 | Revisado: 01/07/2022 | Aceito: 06/07/2022 | Publicado: 15/07/2022

Alane Rafaela Costa Ribeiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6452-2455>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: alane4ribeiro@gmail.com

Taíla Veloso de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5444-9530>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: taila.oliveira@ufv.br

José Carlos Baffa Júnior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4194-1328>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: jose.baffa@ufv.br

Maria do Socorro Rocha Bastos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5648-5241>
Embrapa Agroindústria Tropical, Brasil
E-mail: socorro.bastos@embrapa.br

Lais Fernanda Batista

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9967-2381>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: lais.batista@ufv.br

Samiris Côcco Teixeira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8224-9683>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: samiris.teixeira@ufv.br

Nilda de Fátima Ferreira Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9506-6130>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: nfsoares@ufv.br

Resumo

Nanoemulsões de cinamaldeído (NNC) assistidas por ultrassom, surgem como uma alternativa energeticamente viável e potencialmente promissora para a entrega controlada desse composto orgânico bioativo. Nesse contexto, o objetivo central do estudo consistiu na otimização das variáveis operacionais do processo de produção assistida por ultrassom de NNC, a fim de avaliar o efeito dos elementos operacionais na estabilidade cinética, composição bioativa e atividade antibacteriana das NNC obtidas. A metodologia de superfície de resposta (MSR), via delineamento composto central rotacional foi utilizada para o ajuste, quando possível, dos modelos polinomiais de segunda ordem. O tempo de sonicação (TS) e a amplitude da potência (AP) ultrassônica foram os fatores estudados, enquanto as variáveis respostas corresponderam, respectivamente ao diâmetro hidrodinâmico (D_H), ao índice de polidispersidade (PDI), ao potencial zeta (PZ), a turbidez (T) e a composição fenólica total (CFT). A atividade antibacteriana *in-vitro* dos sistemas obtidos foi realizada por meio da metodologia analítica de difusão em ágar-poço. Os resultados mostraram que independentemente do TS utilizado no processo, os menores valores para o D_H e a T das nanoemulsões foram obtidos em condições otimizadas com baixa amplitude da potência ultrassônica. Os valores de PDI revelaram que as NNC eram monodispersas, com teores de CFT preservados durante o processo de obtenção e considerável atividade antibacteriana. Logo, foi possível, por meio da MSR propor as condições operacionais ideais durante o preparo e assim obter NNC com características físico-químicas que reforçam a sua elevada estabilidade cinética e manutenção da composição bioativa e antimicrobiana durante o processamento.

Palavras-chave: Cinamaldeído; Nanoemulsão; Ultrassom; Atividade antibacteriana; Otimização.

Abstract

Ultrasound-assisted cinnamaldehyde nanoemulsions (CNN) emerge as an energetically viable and potentially promising alternative for the controlled delivery of this bioactive organic compound. This context, the main objective of the study was to optimize the operational variables of the ultrasound-assisted production process of CNN in order to evaluate the effect of operational elements on the kinetic stability, bioactive composition and antibacterial activity of the obtained CNN. Response surface methodology (RSM) via rotational central composite design was used for fitting, when possible, second-order polynomial models. The sonication time (TS) and the amplitude of ultrasonic power (AP) were the studied factors, while the response variables corresponded to the hydrodynamic diameter (DH), the polydispersity index (PDI), the zeta potential (ZP), the turbidity (T) and the total phenolic composition (TCP), respectively. The in-vitro antibacterial activity of the obtained systems was carried out by means of the analytical methodology of diffusion on agar-well. The results showed that regardless of the TS used in the process, the lowest values for the DH and T of the nanoemulsions were obtained under conditions of low amplitude of ultrasonic power. The PDI values revealed that the NNC were monodisperse, with preserved TCP contents during the obtaining process and considerable antibacterial activity. Therefore, it was possible, by means of MSR, to propose the ideal operational conditions during the preparation and thus obtain NNC with physicochemical characteristics that reinforce their high kinetic stability and maintenance of bioactive and antimicrobial composition during processing.

Keywords: Cinnamaldehyde; Nanoemulsion; Ultrasound; Antibacterial activity; Optimization.

Resumen

Las nanoemulsiones de cinamaldeído (CNN) asistidas por ultrasonidos surgen como una alternativa energéticamente viable y potencialmente prometedora para la administración controlada de este compuesto orgánico bioactivo. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo principal del estudio fue optimizar las variables operativas del proceso de producción de CNN asistida por ultrasonidos para evaluar el efecto de los elementos operativos sobre la estabilidad cinética, la composición bioactiva y la actividad antibacteriana de la CNN obtenida. Se utilizó la metodología de la superficie de respuesta (RSM), empleando un diseño compuesto central rotativo para ensamblar, cuando fuera posible, modelos polinómicos de segundo orden. El tiempo de sonicación (TS) y la amplitud de la potencia ultrasónica (AP) fueron los factores estudiados, mientras que las variables de respuesta correspondieron al diámetro hidrodinámico (DH), el índice de polidispersidad (PDI), el potencial zeta (ZP), la turbidez (T) y la composición fenólica total (TCP), respectivamente. La actividad antibacteriana in vitro de los sistemas obtenidos se llevó a cabo mediante una metodología analítica de difusión en agar de pozo. Los resultados mostraron que, independientemente del TS utilizado en el proceso, los valores más bajos de DH y T de las nanoemulsiones se obtuvieron en condiciones de baja amplitud de la potencia ultrasónica. Los valores de PDI revelaron que los NNCs eran monodispersos, con contenidos de TCP retenidos durante el proceso y una considerable actividad antibacteriana. De este modo, fue posible, a través de la MSR, proponer las condiciones óptimas de operación durante la preparación y así obtener NNCs con características fisicoquímicas que potencian su alta estabilidad cinética y el mantenimiento de la composición bioactiva y antimicrobiana durante el procesamiento.

Palabras clave: Cinamaldeído; Nanoemulsión; Ultrasonido; Actividad antibacteriana; Optimización.

1. Introdução

O cinamaldeído (C₉H₈O; CAS: 104-55-2.) é um composto orgânico natural (Balaguer et al., 2013) com elevada hidrofobicidade (Cui et al., 2022) e comercialmente conhecido como cinnamal; aldeído cinâmico; fenilacroleína; 3-fenilpropenal; 3-fenil-2-propen-1-al; 2-propenal, 3-fenil. A sua ocorrência natural o categoriza como o composto químico majoritário do óleo essencial da canela e de outras espécies do gênero *Cinnamomum* sp., como cânfora e cássia (Cocchiara et al., 2005; Shreaz et al., 2012; Bhattacharya et al., 2021). Aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e reconhecido como GRAS (21 CFR 182.60), o cinamaldeído integra ainda uma lista de substâncias consideradas seguras pelo Conselho Europeu, portanto, pode ser utilizado em alimentos (COE No. 102) (Cocchiara et al., 2005).

O perfil fitoquímico do cinamaldeído o coloca como um potente composto nutracêutico, com propriedades amplamente reconhecidas e consolidadas na literatura científica, despertando o interesse de vários setores da economia e de pesquisadores. Doyle e Stephens (2019); Shreaz, et al. (2016); Wan et al. (2022); Kim et al. (2004); Thirapanmethee et al. (2021); Chen et al. (2022); Buglak e Bahnsen (2018); Karim et al. (2021); Song et al. (2013), estão entre os pesquisadores que reportaram a expressiva atividade antimicrobiana, antioxidante, efeitos farmacológicos, além de potencial substituto dos conservantes sintéticos na indústria alimentícia (Karim et al., 2021). No entanto, esse composto apresenta relativa instabilidade às condições ambientais e de processamento, tais como calor, luz, umidade, oxigênio, aliada à sua elevada volatilidade, e reduzida

hidrossolubilidade, que impactam negativamente nas potencialidades apresentadas por ele, o que pode limitar seu espectro de aplicação tecnológica, sobretudo na indústria farmacêutica, química, cosmética e alimentícia (Shreaz, et al., 2016; Karim et al., 2021).

Como recurso proposto para minimizar tais inconvenientes e ampliar as potencialidades fitoquímicas e nutracêuticas do cinamaldeído, tem sido proposto a sua retenção em sistemas de entrega, dentre os quais as nanoemulsões tem se apresentado como uma alternativa viável, eficiente e promissora para preservar e até mesmo maximizar as propriedades desse composto, sobretudo em termos de sua biodisponibilidade, bioacessibilidade, estabilidade térmica e química frente a condições ambientes e de processamento adversas (Doost et al., 2020; Gauthier & Capron, 2021; Sun et al., 2021).

Nanoemulsões, podem ser definidas como sistemas coloidais obtidos a partir de dois líquidos imiscíveis, logo o processo é termodinamicamente desfavorável, com tamanhos médios na escala nanométrica entre 20 a 200 nm (Komaiko & McClements, 2015; Doost et al., 2020; Gauthier & Capron, 2021), assim, a extensão da sua estabilidade cinética é usualmente mensurada por meio da análise do seu diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta (PZ) e tensão interfacial (McClements & Jafari, 2018). De acordo com McClements (2011), a estabilidade cinética das nanoemulsões resultam de um equilíbrio dinâmico e tende a ser melhorada pela redução da tensão interfacial, monodispersidade e redução do diâmetro hidrodinâmico das gotículas do composto lipofílico para o caso de sistema O/A (óleo/água), retidas na fase contínua, minimizando dessa forma, possíveis e eventuais mecanismos de desestabilização coloidal, como a coalescência, o amadurecimento de Ostwald, a floculação, a cremação e a sedimentação (Gupta et al., 2016; Gauthier & Capron, 2021). Dentre os fatores intimamente correlacionados com as características e propriedades físico-químicas das nanoemulsões, o método de obtenção pode ser considerado crítico e determinante para o desenvolvimento amplo das nanoemulsões como sistemas coloidais promissores e efetivos na proteção e entrega de compostos bioativos. Além do mais, a composição em termos mássicos de seus componentes químicos, bem como a natureza química destes, são imprescindíveis no desempenho final desses sistemas.

Alguns métodos de obtenção de nanoemulsões, como a emulsificação assistida por ultrassom, tem se destacado, por apresentar benefícios como baixo custo energético produtivo para a obtenção de sistemas coloidais monodispersos e cineticamente mais estáveis, além da facilidade operacional e de controle do processo (Abbas et al., 2013).

A obtenção de nanoemulsões assistida por ultrassom envolve mecanismos dinâmicos e complexos que produzem forças de cisalhamento, estresse mecânico, cavitação acústica (formação, crescimento e implosão de bolhas de gás/vapor) (Suslick, 1989) e efeitos químicos indiretos, análogos à radiação ionizante, dentro os quais a formação de espécies reativas, sobretudo em suspensões e dispersões aquosas (Miller, 1950). Todos esses fenômenos repercutem como efeitos adversos e de magnitudes variadas, as quais impactam de forma muito particular e direta na estabilidade cinética do sistema, estabilidade química do composto retido na fase contínua e eficiência (Gogate & Kabadi, 2009), por isso a importância de estudos que enfoquem nos métodos de preparo e variáveis operacionais envolvidas no processo, a fim de manter ou até mesmo potencializar a qualidade biológica do composto bioativo e estabilidade cinética do sistema coloidal para entrega controlada.

Frente a escassez de estudos cujo foco seja a avaliação simultânea dos efeitos que as condições de processo, a exemplo do tempo de sonicação e o aporte energético exercem no desempenho, propriedades e estabilidade particular para as nanoemulsões de cinamaldeído, surge a necessidade de pesquisas que promovam uma convergência centralizada no desenvolvimento de metodologias analíticas e protocolos experimentais otimizados e que ao mesmo tempo essas condições operacionais sejam representativas para os sistemas coloidais desenvolvidos, contemplando as suas particularidades, como estrutura química, mecanismos e prováveis sítios de interação entre os componentes, especialmente aquelas contendo compostos termolábeis, como o cinamaldeído. A fim de obter um sistema coloidal de entrega que mantenha as propriedades químicas, biológicas e nutracêuticas em máxima integridade durante o processo de obtenção e armazenamento.

Desse modo, o presente estudo objetivou otimizar as variáveis do processo envolvidas na elaboração de nanoemulsões de cinamaldeído (NNC) assistida por ultrassom com o auxílio da metodologia de superfície de resposta via delineamento composto central rotacional e avaliar o impacto que esses elementos operacionais exercem simultaneamente nas propriedades coloidais, composição fenólica total e atividade contra bactérias patogênicas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

O Cinamaldeído, pureza 99,67%, foi adquirido da *Quinari* (Ponta Grossa, Brasil). O tensoativo polissorbato 80 foi fornecido pela Vetec (tween 80, Duque de Caxias, Brasil). O Ácido gálico e folin-ciocalteau, foram adquiridos da Sigma–Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Todos os demais reagentes químicos utilizados neste estudo eram de grau analítico. As nanoemulsões, soluções e dispersões foram preparadas com água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25°C ± 2) em sistema Milli-Q Plus da Millipore (Bedford, MA, EUA).

2.2 Delineamento Experimental e Modelagem de Superfície de Resposta

A MSR foi utilizada via DCCR na obtenção das nanoemulsões de cinamaldeído assistida por ultrassom como ferramenta estatística para estudar o efeito combinado das variáveis operacionais TS e AP (Tabela 1) nas variáveis respostas D_H , PZ, PDI, CFT e T, respectivamente. O domínio experimental investigado para cada um dos fatores foi proposto com base em testes preliminares, contribuições da literatura científica análogas ao sistema coloidal estudado e especialmente nos limites instrumentais e operacionais do desruptor de células ultrassônico utilizado. As variáveis independentes foram codificadas de acordo com a equação 1.

$$X = \frac{X_i - X_0}{\Delta X}, i = 1, 2, 3 \quad (1)$$

Em que: X é o valor codificado da variável independente; X_i é o valor da variável independente na escala real correspondente; X_0 é o valor na escala real de X_i no ponto central e ΔX é o incremento de X_i correspondente a variação de 1 unidade na escala codificada.

Tabela 1. Variáveis independentes nas escalas codificadas e reais e seus respectivos níveis no DCCR para a otimização da nanoemulsão de cinamaldeído.

Variáveis Independentes	Unidade	Código	Níveis codificados e reais das variáveis independentes				
			-2	-1	0	+1	+2
Amplitude da Potência (AP)	%	X_1	20	30	55	80	90
Tempo de Sonicação (TS)	min	X_2	5	15	38	60	70

Fonte: Autores.

A matriz do DCCR com 2 fatores em 3 níveis, consistiu em uma parcela fatorial composta por 4 tratamentos, axial composta por 4 tratamentos e 5 repetições no ponto central (para estimativa do erro experimental), totalizando 13 ensaios, os quais foram conduzidos em ordem randômica. O modelo polinomial de segunda ordem descrito abaixo Eq. (2), foi utilizado a priori para o ajuste das equações de regressão:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=0}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon_i \quad (2)$$

Substituindo os parâmetros da função resposta verdadeira pelas suas estimativas, obteve-se o modelo estimado pela Eq. (3):

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=0}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

Em que: \hat{y} é a variável resposta; b_0 , b_i , b_{ii} e b_{ij} são os parâmetros do modelo e representam respectivamente o termo constante e os coeficientes dos termos lineares, quadráticos e de interação do modelo; X_i , X_i^2 e $X_i X_j$ são respectivamente os níveis lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes; K corresponde ao número de fatores estudados no experimento e ϵ_i representa o erro aleatório (Myers et al., 2016).

2.3 Formulação e Preparo da Emulsão e Nanoemulsões de Cinamaldeído

As nanoemulsões O/A (óleo/água) obtidas no presente estudo continham de modo geral, percentuais mássicos fixos dos seus componentes, os quais corresponderam, respectivamente a 95,95% (m/m) de água desionizada; 0,61% (m/m) de tensoativo tween 80 e 3,44% (m/m) de cinamaldeído. Essa composição foi previamente otimizada pelos autores deste trabalho em pesquisa anterior (dados não publicados).

O protocolo experimental para o preparo das nanoemulsões contemplou basicamente três etapas diferentes e complementares. Este foi baseado na metodologia experimental descrita por Hou et al. (2021), com modificações. Em todas as fases de preparo, as amostras foram mantidas sob o abrigo da luz e controle da temperatura.

Água desionizada e tween 80, foram inicialmente dispersados sob agitação magnética a 14,400 rpm durante 30 min a 25 ± 2 °C. À fase aquosa foi adicionado lentamente gota-a-gota o composto lipofílico cinamaldeído com auxílio de pipetador automático. O sistema permaneceu sob agitação magnética por mais 30 minutos, perfazendo um tempo total de preparo de 60 min. Nessa fase do processo designada como etapa 1, foi obtida a emulsão grosseira utilizada posteriormente para fins comparativos e denominada de controle A.

Na segunda etapa do processo, emulsões grosseiras previamente preparadas em condições idênticas a etapa 1 foram homogeneizadas em ultra-turrax (Ultraturrax T-25, IKA, Staufen, Germany) por 5 min a 20,000 rpm com temperatura em torno de 5 ± 2 °C controlada com banho de gelo. Ao final, foi obtida a nanoemulsão designada como controle B.

A terceira fase do protocolo experimental foi caracterizada pela produção assistida por ultrassom das nanoemulsões utilizadas na otimização das variáveis operacionais descritas como tempo de sonicação (TS) e amplitude da potência ultrassônica (AP). Essa fase contemplou simultaneamente amostras oriundas das etapas 1 e 2, respectivamente, ou seja, sistemas coloidais preparados conforme etapas 1 e 2 seguiram para a etapa 3. Nesta, as amostras foram submetidas a novo processo de emulsificação, porém com o auxílio de disruptor de células ultrassônico (Potência de entrada 500 W, Modelo DES500, Unique Group), com micro-ponta na frequência ultrassônica de 40 kHz, com valores de TS e AP determinados conforme a matriz do delineamento composto central rotacional. Durante o ST as amostras foram mantidas com temperatura em torno de 5 ± 2 °C controlada com auxílio do banho de gelo. Ao final de cada intervalo de tempo foram obtidas as nanoemulsões assistidas por ultrassom.

2.4 Estudo Comparativo

As nanoemulsões designadas controles A e B, obtidas nas etapas 2 e 3, respectivamente, do protocolo experimental descrito no item 2.2 foram utilizadas para fins comparativos dos produtos em cada etapa do processo global. Cada fase do processo de emulsificação recebeu um aporte energético diferente, de acordo com o método e tempo aplicado ao sistema. Na etapa 1, o controle A foi emulsionado sob agitação magnética. Na etapa 2, o controle B previamente emulsionado na etapa 1, foi re-emulsionado com auxílio de homogeneizador mecânico ultra-turrax.

2.5 Variáveis Respostas

2.5.1 Distribuição do Tamanho Hidrodinâmico, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta

A distribuição do tamanho hidrodinâmico (D_H) e o índice de polidispersidade (PDI) foram estimados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz – DLS utilizando a equação de Stokes-Einstein e a medida do potencial elétrico superficial (potencial zeta, PZ) foi calculado pela equação de Henry a partir da mobilidade electroforética das nanoestruturas estudadas, utilizando o Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Zen Instrument Ltd, United Kingdom) a 25 ± 2 °C, com laser a 633 nm e ângulo de leitura de 173° (Nascimento et al., 2020). Para evitar o efeito de múltiplos espalhamentos de luz as amostras foram dispersas (1:12 v/v) em água desionizada (25 ± 2 °C; viscosidade 0.8872 cP; índice de refração de 1,330 e constante dielétrica de 78,5) na proporção de 1:12 (v/v). Os valores médios do D_H , PDI e PZ foram expressos como a média \pm desvio padrão, obtidos a partir da leitura em triplicata de três alíquotas de amostras retiradas da mesma unidade experimental.

2.5.2 Teor de Compostos fenólicos Totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT) das emulsões controles A e B e das nanoemulsões do DCCR foram determinados de acordo com o método analítico descrito por Singleton e Rossi (1965). O ácido gálico foi utilizado como padrão para a construção da curva analítica (Equação: $y = 0,0969X + 0,0023$, $R^2 = 0,999$) e as absorvâncias foram mensuradas em comprimento de onda de 760 nm com o auxílio de espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão). Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g de amostra.

2.5.3 Turbidez

A turbidez (T) das amostras previamente diluídas (1:20 v/v) em água desionizada, foi determinada indiretamente pela quantificação da densidade óptica a 600 nm a 25 ± 2 °C com auxílio de espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão). A água desionizada foi utilizada como branco e o comprimento do caminho das cubetas de quartzo foi de 1,0 cm (Sharma et al., 2021; Falleh, et al., 2022). A análise foi conduzida com 2 repetições em cada repetição em triplicata. Os resultados (cm^{-1}) foram expressos em como a média \pm desvio padrão referente a cada determinação analítica. O cálculo da T foi realizado de acordo com a equação 4 (Pearce & Kinsella, 1978).

$$T = \frac{2,303AV}{L} \quad (4)$$

Em que: T = turbidez (cm^{-1}); A = absorvância da amostra a 600 nm; V = fator de diluição e L= comprimento do caminho óptico da cubeta utilizada (cm).

2.6 Ensaios Biológicos *In Vitro*

2.6.1 Bactérias

Culturas puras obtidas da American Type Culture Collection de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 10708) foram utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana *in-vitro* das emulsões controles (A e B) e nanoemulsões obtidas a partir do DCCR. A fase contínua dos sistemas coloidais, constituída por água desionizada e tween 80, assim como os seus componentes individuais foram utilizados como controles positivos.

2.6.2 Preparo do Inóculo

As culturas estoques das cepas bacterianas foram ativadas de acordo com a metodologia analítica descrita por De Oliveira et al. (2020) com modificações. As bactérias, previamente armazenadas a -80 °C foram ativadas em caldo Mueller-

Hinton (MH) (Difco Laboratories) e posteriormente incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após esse intervalo de tempo, uma alíquota correspondente a cada bactéria foi estriada em placa contendo meio não seletivo para contagem padrão (PCA, Plate Count Agar, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e novamente incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Em seguida, colônias correspondentes a cada uma das bactérias isoladas foram ressuspensas em solução salina a 0.85% (m/v) e a densidade óptica da suspensão foi ajustada (0,09 a 0,11) conforme padrão da escala de 0,5 de McFarland a 600 nm com auxílio de espectrofotômetro uv/vis (GBC Scientific Equipment, Austrália) para uma concentração final de 10^8 unidades formadoras de colônia/mL (UFC·mL⁻¹). Foram realizadas diluições seriadas até atingir a concentração final de 10^2 UFC·mL⁻¹, posteriormente confirmadas por contagem padrão em placa.

2.6.3 Medição do Diâmetro da Zona de Inibição

O método de difusão em ágar-poço (CLSI, 2012), com algumas modificações, foi utilizado para avaliar a efetividade *in-vitro* das emulsões controles A-E e nanoemulsões do DCCR na inibição do crescimento bacteriano.

As suspensões dos inóculos padronizados, conforme item 2.6.1, foram inoculados (100 uL) na concentração de 10^5 UFC·mL⁻¹ sobre a superfície das placas e esgotados com auxílio de alça de Dygalski. As placas contendo ágar Mueller-Hinton (MHA) (Difco Laboratories) foram utilizadas para a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), a *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 10708) e para o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Ágar Tryptic Soy (TSA) (Acumedia, EUA) foi utilizado para a *Escherichia coli* (ATCC 11229) e ágar Brain Heart Infusion (BHIA) (Kasvi, Brasil) foi utilizado em *Listeria innocua* (ATCC 33090). Após inoculação, o centro de cada uma das placas foi perfurado assepticamente, com o auxílio de ponteiros para formação dos poços com diâmetro aproximadamente correspondentes a 6 mm. Os poços foram preenchidos com 20 uL correspondente a cada tratamento estudado. Em seguida, as placas foram incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas e após esse intervalo de tempo, procedeu-se com a realização das medidas das zonas de inibição em torno do poço com o auxílio de régua milimetrada. O experimento foi conduzido em 2 repetições e cada repetição foi realizada em duplicata para todos os tratamentos estudados. Os resultados foram expressos em cm como média \pm desvio padrão, $n = 2$.

2.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Software Statistica, versão 14.0.

A adequacidade do modelo estimado para cada variável resposta no DCCR foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) incluindo a averiguação simultânea da falta de ajuste e das estimativas dos coeficientes do modelo por meio da probabilidade de F e do teste t de Student ($p > 0,05$), respectivamente. Além disso, a qualidade do ajuste dos modelos teve como critério adotado o coeficiente de determinação (R^2). Os modelos ajustados foram compostos apenas pelos coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$), quando possível.

As comparações qualitativas referentes aos tratamentos controles A e B, e a análise microbiológica foram submetidas à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

As medidas de dispersão (amplitude, média, desvio padrão e variância) foram utilizadas para avaliação dos resultados analíticos em que não foi possível a realização do ajuste estatístico ($p < 0,05$).

As análises de correlação entre as variáveis respostas foram estabelecidas pelo método de Pearson a $p < 0,05$.

Análise descritiva visual das imagens fotográficas foi utilizada nos resultados da atividade biológica *in-vitro*, como recurso complementar aos valores matemáticos médios referentes às zonas de inibição bacteriana.

3. Resultados e Discussão

3.1. Otimização das variáveis operacionais do processo de obtenção da nanoemulsão com cinamaldeído assistida por ultrassom e estudo comparativo

Os resultados das variáveis respostas em cada ensaio executado em ordem randômica foram expressos como o valor médio de duas repetições conduzidas em triplicata com o seu correspondente desvio padrão (média \pm desvio padrão).

3.1.1 Potencial Zeta (PZ)

O potencial zeta (PZ) das nanoemulsões produzidas de acordo com as condições operacionais descritas pelo DCCR e a análise de variância para essa resposta, encontram-se sumarizados na Tabela 2.

A nanoemulsão quando submetida a intervalos de amplitudes de potência (AM) e tempo de sonicação (TS) para do domínio experimental investigado no presente estudo e para o nível de significância estabelecido como $p < 0,05$, não sofreu impacto estatisticamente significativo ($p > 0,05$) dessas variáveis preditoras quanto ao PZ, cujo valor médio correspondeu a -13,69 mV independentemente da AM e TS utilizada em seu processo de obtenção. Desse modo, as variações em termos de PZ para os ensaios realizados (Tabela 2), não puderam ser descritas por um modelo estatístico estimado que fosse capaz de explicar e prever possíveis efeitos da AP e ST sobre essa resposta.

Tabela 2. Matriz decodificada do DCCR e Análise de Variância para o ajuste do modelo estatístico referente a resposta experimental PZ. Os dados são média \pm desvio padrão, $n = 2$.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Variável Resposta**
	AP (%)	TS (min)	PZ (mV)
1	55	38	-13,2 \pm 0,44
2	55	38	-13,4 \pm 0,80
3	55	38	-14,2 \pm 1,50
4	30	15	-11,9 \pm 1,46
5	55	70	-12,9 \pm 0,00
6	80	15	-13,1 \pm 0,73
7	55	38	-14,8 \pm 1,93
8	90	38	-15,4 \pm 3,51
9	30	60	-13,7 \pm 0,73
10	55	38	-14,6 \pm 0,28
11	80	60	-13,0 \pm 0,30
12	20	38	-12,7 \pm 1,15
13	55	5	-15,1 \pm 0,20
Análise de variância para a resposta potencial zeta.			
Resposta PZ (mV)	Modelo PZ = - 13,69 \pm 1,04	F _{aj} *** -	R ² -

* AP: Amplitude da potência; TS: Tempo de sonicação. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Software Statistica, versão 10.4 com a matriz decodificada do DCCR e os ensaios foram executados em ordem randômica.

** PZ: Potencial zeta.

*** Valor de p para a falta de ajuste do modelo estatístico (não significativo para $p > 0,05$).

Source: Authors.

É importante salientar que todas as nanoemulsões produzidas no presente estudo, apresentaram potencial zeta negativo (Tabela 2), indicando a presença de moléculas portadoras de carga negativa na interface das gotículas de cinamaldeído que compõem a fase dispersa do sistema. Esse comportamento pode ser considerado atípico em sistemas coloidais cuja composição é restrita apenas a presença de uma fase orgânica predominantemente lipofílica e uma fase contínua constituída por água ultrapura e um tensoativo de natureza exclusivamente aniônica, a exemplo do tween 80. Valor semelhante foi reportado por Uthumpa,

Indranupakorn e Asasutjarit (2013), que ao produzirem nanoemulsões com extrato de gengibre utilizando tensoativo aniônico, obtiveram PZ de $-20,8 + 0,4$ mV.

A presença dessas cargas pode estar relacionada a adsorção na interface O/A de possíveis impurezas e /ou ácidos graxos livres, a exemplo do ácido oleico, derivado do tween 80, assim como hidroxilas (^-OH) resultantes da dissociação da água que ao orientarem-se próximo a interface da micela, contribuem para a redução da carga superficial do sistema (Gomes, Costa e Cunha 2018). Estudos da literatura clássica que contemplam e investigam os efeitos e mecanismos envolvidos na sonoquímica (Wood & Loomis 1927; Suslick, 1989; Riesz & Kondo, 1992; Mason & Lorimer, 2002), dentre os quais, a formação de espécies químicas reativas, tais como hidroxilas (^-OH) e átomo de hidrogênio (H^+) em soluções aquosas sob aplicação de energia ultrassônica, discorrem acerca da dissociação das moléculas de água via indução por cavitação acústica, dado ao aumento de temperatura (500-15,000K) e pressão (100-5,000 atm) altamente localizadas durante os ciclos de implosão das microbolhas de gás e/ou vapor na fase contínua.

Nesse contexto, as medidas de dispersão amostral, podem ser utilizadas como recurso estatístico adicional para refinamento da compreensão dos fenômenos físico-químicos associados a distribuição matemática dos resultados. Dentre as medidas utilizadas, a amplitude, a variância e o desvio padrão estimados para o PZ dos ensaios corresponderam respectivamente aos valores 3.5, 1.09 e 1.04, os quais indicaram um grau de variabilidade sutil para o PZ entre os tratamentos obtidos sob diferentes combinações das variáveis operacionais (TS e AP) e porcentagens fixas dos componentes mássicos dos sistemas coloidais obtidos. Esse comportamento reforça a pressuposição de que a distribuição das cargas na superfície das nanoestruturas resultam de um conjunto de fatores e balanço de forças atrativas e repulsivas que encontram-se intimamente relacionadas a natureza em termos qualitativos (estrutura química e propriedades físico-químicas) e quantitativos (percentual mássico total) dos componentes da fase dispersa (composto lipofílico) e da fase contínua (tensoativo e água, por exemplo) do sistema coloidal, associada ainda aos efeitos químicos induzidos indiretamente nas estruturas pela cavitação acústica.

Logo, nos sistemas coloidais tipificados por composição fixa e ao mesmo tempo restrito a presença de tensoativos de natureza química aniônica, possíveis variações da combinação binomial do TS e da AP, passa a ser menos expressiva para o balanço final das cargas presentes na interface O/A, comparativamente a natureza química dos componentes do sistema, os quais possuem uma contribuição mais efetiva e expressiva no balanço final das cargas na interface O/A.

3.1.2 Diâmetro hidrodinâmico (D_H)

As medidas de espalhamento de luz para a determinação do D_H das nanoemulsões foram influenciadas estatisticamente ($p < 0,05$) pelo efeito linear positivo e quadrático negativo da AP, no qual o modelo empírico ajustado encontra-se disposto na Tabela 3.

Tabela 3. Matriz decodificada do DCCR e Análise de Variância para o ajuste do modelo estatístico referente a resposta experimental D_H . Os dados são média \pm desvio padrão, $n = 2$.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Variável Resposta**
	AP (%)	TS (min)	D_H (nm)
1	55	38	152,1 \pm 0,19
2	55	38	140,0 \pm 4,00
3	55	38	140,0 \pm 3,51
4	30	15	115,2 \pm 1,15
5	55	70	137,3 \pm 0,23
6	80	15	134,3 \pm 0,42
7	55	38	139,8 \pm 1,15
8	90	38	125,6 \pm 1,13
9	30	60	132,6 \pm 0,25
10	55	38	136,6 \pm 0,30
11	80	60	139,6 \pm 0,63
12	20	38	110,3 \pm 0,35
13	55	5	136,6 \pm 3,55

Análise de variância para a resposta diâmetro hidrodinâmico			
Resposta	Modelo***	F_{aj} ****	R^2
D_H (nm)	$D_H = 64,97 + 2,82 AP - 4,85 AP^2$	0,54	0,76

* AP: Amplitude da potência; TS: Tempo de sonicação. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Software Statistica, versão 10.4 com a matriz decodificada do DCCR e os ensaios foram executados em ordem randômica.

** D_H : Potencial zeta.

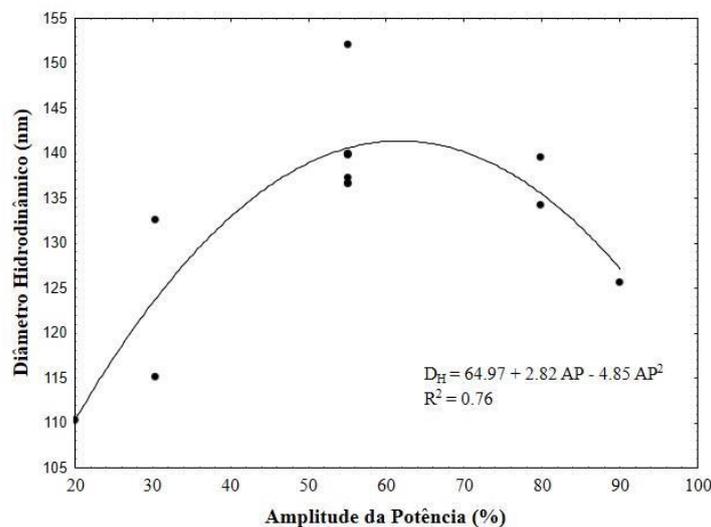
*** AP: Amplitude da potência; AP: Coeficiente linear; AP^2 : Coeficiente quadrático. As equações ajustadas e utilizadas para fins preditivos, quando possível, incluíram apenas os coeficientes significativos pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

**** Valor de p para a falta de ajuste do modelo estatístico (não significativo para $p > 0,05$).

Source: Authors.

A Figura 1 representa graficamente o efeito da variação da AP no D_H médio dos ensaios exibidos pela matriz do DCCR. Inicialmente, é possível observar um comportamento tipicamente linear entre o D_H e a AP, previamente evidenciado pela relação empírica descrita anteriormente. Essa linearidade é caracterizada pelo incremento no D_H das nanoemulsões quase que diretamente proporcional ao aumento da AP. No entanto, ao atingir uma AP próxima a 60%, o D_H passa a ser reduzido em função do aumento da AP.

Figura 1. Modelo estatístico polinomial de segunda ordem ajustado ($p < 0,05$) para o D_H das nanoemulsões do DCCR em função da variável preditora AP.



Source: Authors.

Gaikwad e Pandit (2008) relataram que para um intervalo de tempo fixo, à medida que a intensidade da potência nominal aplicada ao sistema coloidal aumenta, ocorre incremento no número de gotículas formadas, ou seja, maior retenção da fase dispersa na fase contínua. Eles atribuíram esse comportamento à extensão da cavitação acústica, uma vez que à medida que a potência aumenta, ocorre aumento direto da amplitude de pressão e temperatura, ambas responsáveis pela quebra, cisalhamento (estresse físico) e turbulência da fase lipofílica, além da redução da tensão interfacial e viscosidade do meio (alteração físico-química), facilitando assim a dispersão de uma fase na outra e com isso a formação de sistemas nanoestruturados.

No entanto, o presente estudo apresentou comportamento contrário, dado que nem sempre a extensão na incidência energética, por meio de maiores AP fornecidas ao sistema coloidal, resultou em nanoestruturas com D_H médios menores.

Uma explicação plausível e consistente com os resultados obtidos para o D_H , foi descrita por Jafari et al. (2008), os quais discutiram acerca do fenômeno de re-coalescência como consequente “over-processing”. Segundo esses autores, o aumento substancial do D_H em sistemas coloidais é induzido pelo fornecimento de energia acima do limiar crítico, o qual ao promover a formação de gotículas sem cobertura interfacial do tensoativo, tendem a reagrupar-se, dada a sua instabilidade termodinâmica intrínseca, associada a alguns fatores, a citar a cobertura incompleta da interface pelo tensoativo presente na fase contínua, a turbulência de alta intensidade gerada pela energia sonoquímica, o que leva essas gotículas a colidirem umas com as outras, reagrupando-se e levando ao aumento do D_H . Eles afirmam ainda que cada colisão pode não levar necessariamente a re-coalescência, porém se o sistema não dispuser de tensoativo suficiente para cobrir toda a área interfacial, incluindo aquelas recém-formadas, estas gotículas tenderão a reagruparem-se, proporcionalmente a AP aplicada ao sistema.

Logo, pode-se concluir que o D_H final do sistema coloidal, consiste em um equilíbrio dinâmico entre a quebra e re-coalescência da fase dispersa (Jafari et al., 2006). Esse equilíbrio é fortemente influenciado diretamente pelo aporte energético fornecido ao sistema, ou seja, em processos que envolvem a nano-emulsificação assistida por ultrassom, a AP é um fator crítico a ser considerado, além dele, vale ressaltar que a quantidade e natureza química do tensoativo também impacta diretamente na extensão desse equilíbrio e demais fatores, tais como a temperatura do sistema, que influenciam propriedades como viscosidade, também impactam indiretamente no estabelecimento ou não desse equilíbrio dinâmico. Esse comportamento foi observado no presente estudo, dado que os menores valores para o D_H foram obtidos com a aplicação de AP correspondente ao extremo inferior (negativo) do DCCR, o qual correspondeu a 20% de AP. Enquanto os maiores D_H foram quantificados nas nanoemulsões produzidas com aplicação de AP próximas ao ponto central do delineamento, o qual correspondeu a 55%.

Isto significa que embora a entrada de energia durante a emulsificação tenha sido aumentada, as emulsões obtidas têm D_H maiores em vez de tamanhos menores esperados em decorrência do “over-processing”.

Sendo assim, pode-se inferir que nanoemulsões produzidas com cinemaldeído, água e tween 80 em proporções mássicas fixas, correspondentes a 3,44%; 95,95% e 0,61%, respectivamente e dentro do domínio experimental (AP 20-90%) investigado, o valor crítico para a AP correspondeu a intensidade da AP próximo a 20%. Com isso, valores de AP acima desse limiar e abaixo de 60%, induziram o “over-processing” levando a re-coalescência das gotículas formadas, os que possivelmente foi o responsável pelo incremento do D_H das nanoemulsões produzidas. Logo, menores valores de AP foram mais interessante para manter o equilíbrio do sistema, pois um aumento adicional da AP possivelmente levou a maiores taxas de re-coalescência com o resultante aumento do D_H , especialmente pelo fato da quantidade de tensoativo utilizada ter sido fixa e possivelmente a formação de novas nanoestruturas acima do equilíbrio dinâmico, não puderem ser estabilizadas pelo tensoativo, dado à ausência de quantidade extra disponível deste e suficiente para cobrir toda a extensão interfacial das nanoestruturas recém formadas com o incremento da AP.

Portanto, quanto mais energia, maior a área interfacial e maior a quantidade de tensoativo necessário para reduzir a tensão e manter o sistema em equilíbrio dinâmico.

3.1.3 Índice de Polidispersidade (PDI)

As variações do PDI em resposta às condições operacionais dentro dos intervalos de AP e TS no processo de obtenção das nanoemulsões não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 4), desse modo, as diferenças nos valores médios de PDI das nanoemulsões correspondentes aos ensaios 1-13 (Tabela 4) não puderam ser modeladas por uma relação empírica que explicasse estatisticamente $p < 0,05$ o efeito que as variáveis preditoras (AP e TS) exerceram na resposta obtida. O PDI apresentou valor médio de 0,181. Valores análogos a esse foram descritos por De Matos et al. (2018), que ao produzirem nanoemulsões com curcumina, obtiveram PDI médio $< 0,20$.

Tabela 4. Matriz decodificada do DCCR e Análise de Variância para o ajuste do modelo estatístico referente a resposta experimental PDI. Os dados são média \pm desvio padrão, $n = 2$.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Variável Resposta**
	AP (%)	TS (min)	PDI
1	55	38	0,179 \pm 0,00
2	55	38	0,198 \pm 0,00
3	55	38	0,176 \pm 0,00
4	30	15	0,176 \pm 0,00
5	55	70	0,176 \pm 0,00
6	80	15	0,168 \pm 0,00
7	55	38	0,185 \pm 0,00
8	90	38	0,171 \pm 0,00
9	30	60	0,184 \pm 0,00
10	55	38	0,179 \pm 0,00
11	80	60	0,185 \pm 0,00
12	20	38	0,186 \pm 0,00
13	55	5	0,194 \pm 0,00
Análise de variância para a resposta índice de polidispersidade			
Resposta	Modelo	F _{aj} ***	R ²
PDI	PDI = 0,181 \pm 0,008	-	-

* AP: Amplitude da potência; TS: Tempo de sonicação. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Software Statistica, versão 10.4 com a matriz decodificada do DCCR e os ensaios foram executados em ordem randômica.

** PDI: Índice de polidispersidade.

*** Valor de p para a falta de ajuste do modelo estatístico (não significativo para $p > 0,05$).

Source: Authors.

Gul et al. (2018) discorreram que valores de PDI próximo de 0,05 correspondem a amostras com distribuição monodispersas, enquanto valores superiores a 0.70 apresentam forte indicativo de que o sistema coloidal apresenta uma distribuição de tamanho muito ampla.

A amplitude, a variância e o desvio padrão estimados para o PDI dos ensaios (Tabela 4) corresponderam respectivamente aos valores 0,026; 0,000073 e 0,0085, os quais indicaram um grau de variabilidade bastante estreito para o PDI entre os tratamentos. Diante do exposto, os resultados mostraram que as nanoemulsões elaboradas sob diferentes condições de AP e TS, independentemente do binômio AP versus TS utilizado em seu preparo, apresentaram de modo geral distribuição monomodais, indicando assim que essa propriedade não sofreu interferências das condições operacionais durante o preparo.

3.1.4 Compostos fenólicos Totais (CFT)

Assim como o PZ e o PDI, não foi possível propor um modelo para o CFT que ajustasse às variações dos dados experimentais obtidos e pudesse ser usado para fins preditivos. O valor médio do CFT correspondeu a 0,021 \pm 0,001 mg GAE/100 g de amostra.

Como recurso complementar, a estatística descritiva apresentou medidas de dispersão amostral para amplitude, a variância e o desvio padrão estimados correspondentes, respectivamente aos valores 0,0052; 0,000002 e 0,0014. Esses resultados denotam a ausência de impacto efetivo das diferentes condições impostas pela combinação das variáveis (AP e TS) operacionais durante o processo de sonicação dos sistemas nanoemulsionados. Desse modo, pode-se inferir que os compostos fenólicos totais presentes no cinemaldeido mantiveram-se eficientemente retidos na fase dispersa, dado a ausência de variações expressivas em seu teor entre os ensaios (Tabela 5). Observação adicional pode ser feita quanto as vantagens na proposta dos mecanismos de entrega, à exemplo das nanoemulsões como sistemas coloidais contendo compostos bioativos termosensíveis, a exemplo dos fenólicos totais presentes no cinemaldeido, os quais foram eficientemente preservados durante o processo de obtenção dessas nanoestruturas.

Tabela 5. Matriz decodificada do DCCR e Análise de Variância para o ajuste do modelo estatístico referente a resposta experimental CFT. Os dados são média \pm desvio padrão, n = 2.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Variável Resposta**
	AP (%)	TS (min)	CFT (mg GAE/100 g)
1	55	38	0,024 \pm 0,00
2	55	38	0,022 \pm 0,00
3	55	38	0,021 \pm 0,00
4	30	15	0,019 \pm 0,00
5	55	70	0,023 \pm 0,00
6	80	15	0,020 \pm 0,00
7	55	38	0,022 \pm 0,00
8	90	38	0,022 \pm 0,00
9	30	60	0,022 \pm 0,00
10	55	38	0,021 \pm 0,00
11	80	60	0,020 \pm 0,00
12	20	38	0,019 \pm 0,00
13	55	5	0,020 \pm 0,00
Análise de variância para a resposta compostos fenólicos totais			
Resposta	Modelo	F _{aj} ***	R ²
CFT	CFT = 0,021 \pm 0,001	-	-

* AP: Amplitude da potência; TS: Tempo de sonicação. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Software Statistica, versão 10.4 com a matriz decodificada do DCCR e os ensaios foram executados em ordem randômica.

** CFT: Compostos fenólicos totais.

*** Valor de p para a falta de ajuste do modelo estatístico (não significativo para $p > 0,05$).

Source: Authors.

3.1.5 Turbidez (T)

A turbidez das nanoemulsões (Tabela 2) pode ser descrita pela relação empírica funcional do efeito linear positivo da AP e efeito quadrático negativo da AP (Tabela 6).

Tabela 6. Matriz decodificada do DCCR e Análise de Variância para o ajuste do modelo estatístico referente a resposta experimental T. Os dados são média \pm desvio padrão, n = 2.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Variável Resposta**
	AP (%)	TS (min)	T (m ⁻¹)
1	55	38	535,448 \pm 5,75
2	55	38	370,399 \pm 14,48
3	55	38	414,540 \pm 15,23
4	30	15	234,138 \pm 14,49
5	55	70	360,803 \pm 8,79
6	80	15	308,986 \pm 11,99
7	55	38	437,570 \pm 19,94
8	90	38	291,713 \pm 13,30
9	30	60	385,753 \pm 11,52
10	55	38	374,238 \pm 9,97
11	80	60	335,854 \pm 18,51
12	20	38	232,219 \pm 11,99
13	55	5	376,157 \pm 25,96
Análise de variância para a resposta índice de polidispersidade			
Resposta	Modelo***	F _{aj} ****	R ²
T	T = 16,77 + 0,57 AP – 3,10 AP ²	0,68	0,55

* AP: Amplitude da potência; TS: Tempo de sonicação. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Software Statistica, versão 10.4 com a matriz decodificada do DCCR e os ensaios foram executados em ordem randômica.

** T: Turbidez (m⁻¹).

*** AP: Amplitude da potência; AP: Coeficiente linear; AP²: Coeficiente quadrático. As equações ajustadas e utilizadas para fins preditivos, quando possível, incluíram apenas os coeficientes significativos pelo teste t de Student (p < 0,05).

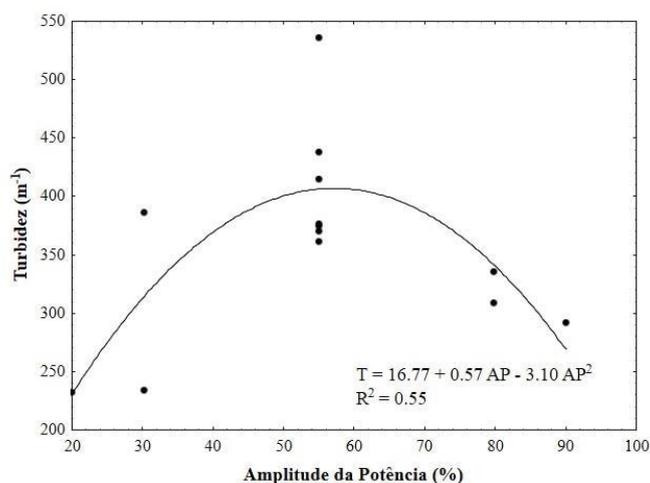
**** Valor de p para a falta de ajuste do modelo estatístico (não significativo para p > 0,05).

Source: Authors.

Apesar do efeito linear da AP não ter sido estatisticamente significativo (p > 0,05) para a resposta T, ele foi adicionado ao modelo em razão do princípio da hierarquia, descrito por Montgomery (2001) como um postulado em que quando um termo de ordem superior for mantido no modelo, o de ordem inferior que o compõem também deverá ser mantido. Logo, o modelo matemático de segunda ordem estimado, ajustado e proposto para T, contemplou concomitantemente o efeito não significativo (p > 0,05) da AP linear, dado a existência de efeito significativo (p < 0,05) no termo de ordem superior, correspondente a AP². A Figura 2A apresenta o comportamento da T expresso graficamente a partir do seu modelo ajustado (p < 0,05). A similaridade em termos de perfil gráfico entre o D_H e a T não é ao acaso, ambas as respostas, supostamente estão fortemente correlacionas. Tendência semelhante foi descrita por Qui et al. (2022), os quais afirmaram que quanto maior o D_H, maior será a T da nanoemulsão. Zhang et al. (2015) explicam que para sistemas coloidais em escala nanométrica, as dimensões da fase particulada são muito menores do que o comprimento de onda da luz (r << λ), ocasionando espalhamento de luz suave e, portanto, baixa turbidez.

Assim, os menores valores médios de T foram obtidos com a aplicação de menor aporte energético ao sistema coloidal, ou seja, valores de AP próximo ao limite inferior do DCCR são mais apropriados para a obtenção de nanoemulsões mais límpidas (Figura 2B) e cineticamente mais estáveis.

Figura 2A. Modelo estatístico polinomial de segunda ordem ajustado ($p < 0,05$) para a T das nanoemulsões do DCCR em função da variável preditora AP.



Source: Authors.

Figura 2B. Imagem das nanoemulsões* dispersas na água desionizada antes da análise de turbidez.



* Ensaios do DCCR com as nanoemulsões organizadas sequencialmente da esquerda para a direita, seguindo a ordem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, respectivamente.

Source: Authors.

3.2 Estudo comparativo dos sistemas coloidais em etapas distintas do protocolo experimental de obtenção

A Tabela 7 apresenta os resultados médios do teste de Tukey aplicado aos resultados físico-químicos (PZ, D_H , PDI, CFT e T) das nanoemulsões intituladas controles A e B, obtidas em etapas sequenciais do processo de emulsificação por homogeneização mecânica de baixo e alto aporte energético, respectivamente.

O teste de Tukey (Tabela 4) revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os controles A e B para os valores médios correspondentes ao PZ, D_H , PDI e T, respectivamente. Esses resultados denotam uma forte evidência do impacto que o aporte energético, assim como as forças de cisalhamento às quais estão diretamente correlacionadas à quantidade de energia fornecida ao sistema durante a homogeneização, resultam em nanoemulsões com perfis físico-químicos distintos e possivelmente com níveis de estabilidade cinética e termodinâmica variáveis. Diante do exposto, é possível inferir que o sistema coloidal correspondente ao controle A, comparativamente ao controle B, apresentou menor espectro para a estabilidade cinética e termodinâmica, dado a sua maior contribuição em termos de D_H , PDI e T, aliado ainda a uma menor contribuição em módulo para o PZ que o controle B.

A ausência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para o teor de TPC entre as nanoemulsões controles A-B estar de acordo com o comportamento esperado, dado ao percentual mássico fixo e idêntico do composto bioativo cinemaldeido na formulação das nanoemulsões. Esses resultados indicam ainda que independente do aporte energético e consequentemente do mecanismo de estresse aplicado ao sistema coloidal, a quantidade do componente lipofílico a ser nano emulsionado permaneceu invariável, não tendo sofrido impacto significativo ($p < 0,05$) do método de obtenção.

Tabela 7. Teste de Tukey a 95% de probabilidade para os valores médios da caracterização físico-química dos sistemas coloidais em diferentes etapas do protocolo experimental de obtenção. Os dados são média \pm desvio padrão, $n = 2$.

Amostra*	Caracterização**				
	PZ (mV)	D _H (nm)	PDI	CFT (mg GAE/100 g)	T (m ⁻¹)
Controle A	-8,64 \pm 0,52 ^b	296,47 \pm 88,97 ^a	0,749 \pm 0,24 ^a	0,014 \pm 0,00 ^a	552,720 \pm 20,76 ^a
Controle B	-15,9 \pm 1,13 ^a	151,48 \pm 11,70 ^b	0,269 \pm 0,01 ^b	0,016 \pm 0,00 ^a	178,483 \pm 11,52 ^b

* Controle A: Nanoemulsão obtida com a aplicação de baixa energia em que a emulsificação resultou da homogeneização do sistema em chapa aquecedora com o auxílio de agitador magnético a 14.400 rpm durante 60 min. Controle B: Nanoemulsão obtida em duas etapas consecutivas de homogeneização, a primeira em chapa aquecedora a 14.400 rpm /60 min (baixa energia), somado a etapa seguinte em ultra-turrax a 20.000rpm/5min (alta energia).

** PZ: Potencial zeta; D_H: Diâmetro hidrodinâmico; PDI: Índice de polidispersidade; CFT: Compostos fenólicos totais; T: Turbidez. Os resultados da caracterização analítica foram obtidos com duas repetições e cada repetição foi realizada em triplicata e expressa como média \pm desvio padrão.

**Valores médios seguidos com letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ao nível de 0,05% de significância pelo teste de Tukey.

Source: Authors.

3.3 Atividade antibacteriana das nanoemulsões *in-vitro*

O cinemaldeido é um composto bioativo descrito na literatura como agente antimicrobiano eficaz na inibição do crescimento microbiológico de bactéria e fungos (Louis et al., 2021). Quando esse antimicrobiano natural é retido na fase contínua das nanoemulsões, a biodisponibilidade dele nos fenômenos de transporte mássico, sobretudo via difusão para o interior da célula microbiana, é maximizado, especialmente em virtude do reduzido D_H desse composto quando presente em sistemas coloidais. Tornando possível essas trocas mássicas através de uma microestrutura porosa presente de modo geral nas células bacterianas, sem que para isso seja necessário demanda energética expressiva. No entanto, é importante salientar que as estruturas de entrega, a exemplo das nanoemulsões tornam o composto lipofílico distribuído ao longo da fase contínua em uma espécie de gotículas cuja tensão interfacial foi reduzida pela presença do tensoativo tween 80. Desse modo, é importante destacar que de modo geral, especialmente nos ensaios microbiológicos *in-vitro*, em que os fatores externos são controlados e possíveis fontes de erro aleatório são minimizadas, os processos difusivos nos sistemas coloidais apresentam uma interdependência cinética maior e a taxa de liberação dos compostos bioativos podem ser consideradas menores logo após a obtenção desses sistemas.

Os valores médios para os diâmetros dos halos de inibição encontram-se dispostos na Tabela 8. De modo geral, esses resultados analíticos serviram para mensurar o quanto cada nanoemulsão foi eficiente na atividade antimicrobiana das bactérias gram positivas e gram negativas utilizadas, e desse modo, indiretamente inferir o quanto a combinação do binômio ST e AP impactou na eficiência antimicrobiana de cada nanoemulsão dos ensaios propostos pelo DCCR e nas nanoemulsões controles A-B.

Tabela 8. Diâmetro médio dos halos de inibição para a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus*, a *Listeria innocua* e a *Salmonella choleraesuis*. Os dados são média \pm desvio padrão, n = 2.

Nanoemulsão	Halo de inibição (cm)*				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>
Ensaio 1	1,65 \pm 0,05 ^{baA}	1,40 \pm 0,10 ^{aB}	2,05 \pm 0,15 ^{aA}	1,50 \pm 0,00 ^{aB}	1,48 \pm 0,03 ^{cbaB}
Ensaio 2	1,75 \pm 0,07 ^{ba}	1,40 \pm 0,00 ^{aA}	1,95 \pm 0,35 ^{aA}	1,63 \pm 0,18 ^{aA}	1,53 \pm 0,18 ^{cbaA}
Ensaio 3	2,05 \pm 0,05 ^{baA}	1,25 \pm 0,05 ^{aC}	1,75 \pm 0,15 ^{baA}	1,65 \pm 0,05 ^{aCBA}	1,60 \pm 0,00 ^{cbaCB}
Ensaio 4	1,90 \pm 0,14 ^{baA}	1,50 \pm 0,28 ^{aA}	1,95 \pm 0,07 ^{aA}	1,55 \pm 0,07 ^{aA}	1,83 \pm 0,04 ^{baA}
Ensaio 5	1,90 \pm 0,00 ^{baA}	1,45 \pm 0,05 ^{aA}	1,80 \pm 0,20 ^{aA}	1,78 \pm 0,03 ^{aA}	1,35 \pm 0,15 ^{cbA}
Ensaio 6	1,95 \pm 0,35 ^{baA}	1,50 \pm 0,28 ^{aA}	1,95 \pm 0,21 ^{aA}	1,65 \pm 0,07 ^{aA}	1,33 \pm 0,11 ^{aA}
Ensaio 7	1,95 \pm 0,05 ^{baA}	1,55 \pm 0,25 ^{aA}	1,80 \pm 0,20 ^{aA}	1,58 \pm 0,27 ^{aA}	1,60 \pm 0,10 ^{cbaA}
Ensaio 8	1,85 \pm 0,07 ^{baBA}	1,20 \pm 0,00 ^{aC}	2,25 \pm 0,07 ^{aA}	1,55 \pm 0,21 ^{aBC}	1,88 \pm 0,11 ^{aBA}
Ensaio 9	2,45 \pm 0,25 ^{aA}	1,30 \pm 0,10 ^{aC}	2,15 \pm 0,05 ^{baA}	1,50 \pm 0,10 ^{aCB}	1,40 \pm 0,15 ^{cbaCB}
Ensaio 10	2,10 \pm 0,14 ^{baBA}	1,70 \pm 0,28 ^{baA}	2,30 \pm 0,14 ^{aA}	1,53 \pm 0,04 ^{aB}	1,48 \pm 0,04 ^{cbaB}
Ensaio 11	2,05 \pm 0,15 ^{baBA}	1,50 \pm 0,00 ^{aB}	2,45 \pm 0,25 ^{aA}	1,63 \pm 0,02 ^{aB}	1,43 \pm 0,03 ^{cbaB}
Ensaio 12	1,60 \pm 0,14 ^{baA}	1,60 \pm 0,00 ^{baA}	2,20 \pm 0,28 ^{aA}	1,60 \pm 0,28 ^{baA}	1,35 \pm 0,07 ^{cbB}
Ensaio 13	1,60 \pm 0,10 ^{baCB}	1,30 \pm 0,00 ^{aC}	2,00 \pm 0,00 ^{aA}	1,73 \pm 0,08 ^{baA}	1,48 \pm 0,03 ^{cbaCB}
Controle A	1,65 \pm 0,07 ^{ba}	1,33 \pm 0,15 ^{aA}	2,10 \pm 0,36 ^{aA}	1,20 \pm 0,28 ^{aA}	1,30 \pm 0,00 ^{aA}
Controle B	1,65 \pm 0,21 ^{baA}	1,35 \pm 0,07 ^{baB}	2,30 \pm 0,17 ^{aA}	1,38 \pm 0,11 ^{aB}	1,15 \pm 0,21 ^{cb}

* Os valores médios dos halos de inibição foram obtidos como a média de 2 repetições conduzidas em duplicada, expressos como mean \pm SD, n = 2.

* Valores médios seguidos com letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ao nível de 0,05% de significância pelo teste de Tukey.

Source: Authors.

Todas as nanoemulsões, independentemente das condições operacionais utilizadas no processo de obtenção, apresentaram zona de inibição para as bactérias avaliadas. O valor médio do halo de inibição para a *Pseudomonas aeruginosa* (PA), a *Escherichia coli* (EC), a *Staphylococcus aureus* (SA), a *Listeria innocua* (LI) e a *Salmonella choleraesuis* (SC), variou entre 1,60 – 2,45; 1,20 – 1,70; 1,75 – 2,45; 1,20 – 1,78 e 1,15 – 1,88 cm, respectivamente. Considerando as perdas do cinamaldeído por volatilização e ou oxidação desprezíveis durante o processo de preparo das nanoemulsões, é importante salientar que este composto contribuiu de maneira fixa com 3,44% (m/m) da massa total das nanoemulsões, logo, é possível mensurar teoricamente, e com base na monodispersidade que as nanoemulsões apresentaram, que cada alíquota de nanoemulsão utilizada para os ensaios antibacterianos, continha aproximadamente cerca de $6,88 \times 10^{-4}$ g de cinamaldeído. O que nos leva a concluir a potência antibacteriana que esse composto exerce, mesmo quando presente em quantidades mínimas.

Em condições *in-vivo*, a exemplo da utilização das nanoemulsões em alimentos, possivelmente essa liberação controlada dos compostos bioativos retidos na fase contínua de uma nanoestrutura de entrega passam a apresentar taxas de transferência mássica variadas e interdependentes diretamente das condições intrínsecas do alimento, a exemplo do pH, acidez total, composição centesimal, assim como também do ambiente, a exemplo da temperatura, umidade relativa, luz, enfim, previsões acerca da efetividade dos compostos antimicrobianos, a exemplo do cinamaldeído em sistemas nanoemulsionados podem e devem ser realizadas levando em consideração as condições operacionais para obtenção desses sistemas e a matriz alimentícia, bem como o ambiente em que esse alimento deverá ser armazenado.

Conforme esperado, todas as nanoemulsões correspondentes aos pontos centrais, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey, para um mesmo grupo de bactérias. Demonstrando dessa forma excelente reprodutibilidade das condições operacionais utilizadas.

Para a *Pseudomonas aeruginosa*, a atividade antibacteriana do sistema de entrega produzido de acordo com o ensaio 9 (30% e 60 min) apresentou o maior valor médio para a zona de inibição, tendo o mesmo correspondido a 2,45 cm e diferido ($p < 0,05$) das amostras correspondentes aos ensaios 1, 2, 12, 13 e controles A-B, respectivamente, enquanto para a *Salmonella*

choleraesuis o ensaio 8 (90% e 38 min) exibiu o maior halo médio, com valor de 1,88 cm e ao mesmo tempo tendo este diferido significativamente ($p < 0,05$) dos ensaios 5, 6, 12 e dos controles A-B. Em contrapartida, não foi observado nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) entre os ensaios para a *Escherichia coli*, o *Staphylococcus aureus* e a *Listeria innocua*. Esses resultados sugerem que a sensibilidade bacteriana para os sistemas de entrega em escala nanométrica obtidos sob diferentes condições operacionais foi praticamente a mesma. Uma explicação plausível para esse comportamento, consiste no fato da pouca ou nenhuma variabilidade no teor de compostos fenólicos totais ao final do processo de produção das nanoemulsões, indicando uma manutenção nos percentuais mássicos teóricos fixos do agente bioativo cinamaldeído para todos os ensaios do delineamento, assim como também dos controles A-B.

Os contrastes analisados para as nanoemulsões obtidas em condições operacionais fixas (dentro de um mesmo ensaio), porém entre os diferentes grupos de bactérias, indicaram de modo geral comportamentos distintos, quanto aos diferentes níveis de sensibilidade bacteriana ao cinamaldeído, o que supostamente está relacionado às particularidades e especificidades de cada bactéria, especialmente no que tange a sua morfologia, composição e estrutura celular, os quais impactam diretamente em seus mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

As nanoemulsões obtidas em condições análogas do processo (ensaios 1, 2, 3, 7 e 10), as quais corresponderam aos pontos centrais do delineamento, apresentaram, como esperado, níveis semelhantes de sensibilidade bacteriana para um mesmo grupo de bactérias. De modo geral, a sensibilidade ao cinamaldeído presente nas nanoemulsões corresponde a esses ensaios, foi maior e indistinguíveis ($p < 0,05$) para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, comparativamente a *Listeria innocua*, *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli*, respectivamente.

Apesar da nanoemulsão obtida conforme o ensaio 4, não ter apresentado diferença significativa ($p < 0,05$) quanto a atividade bacteriana entre as diferentes cepas, foi possível observar níveis de sensibilidade ao cinamaldeído na seguinte ordem decrescente de gradação, tomando como base os valores médios das zonas de inibição: $AS > PA > SC > LI > EC$, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado para a nanoemulsão produzida conforme os ensaios 5, 6 e controle A, respectivamente.

O *Staphylococcus aureus*, a *Salmonella choleraesuis* e a *Pseudomonas aeruginosa* não diferiram ($p > 0,05$) entre se quanto a nanoemulsão obtida conforme ensaio 8, tendo apresentado valores médios das zonas de inibição na seguinte ordem decrescente $SA > SC > PA$, respectivamente, enquanto diferença significativa ($p < 0,05$) para a sensibilidade ao cinamaldeído foi constatada entre o grupo composto por *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*, respectivamente e o grupo formado por *Listeria innocua* e *Escherichia coli*.

As nanoemulsões produzidas de acordo com os ensaios 9, 11 e 15 apresentaram, respectivamente, comportamentos análogos quanto a atividade dessas bactérias contra o cinamaldeído presente nesses sistemas coloidais. De modo geral, não foi possível identificar diferenças entre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* ($p > 0,05$), no entanto, o oposto a isso ($p < 0,05$) ocorreu entre esse grupo de bactérias (AS e PA) e o grupo composto por *Listeria innocua*, *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli*, respectivamente.

A sensibilidade antibacteriana ao cinamaldeído presente na nanoemulsão obtida conforme o ensaio 12, foi identificada como não significativa ($p > 0,05$) para o grupo composto concomitantemente por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua* e *Escherichia coli*. Diferenças ($p < 0,05$) foram constatadas somente entre *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*.

O grupo de bactérias composto por *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua*, não diferiram ($p > 0,05$), quanto a sensibilidade dessas bactérias ao cinamaldeído presente na nanoemulsão produzida conforme o ensaio 13. Comportamento oposto a esse foi identificado ($p < 0,05$) entre *Staphylococcus aureus* e o grupo integralizado por *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*.

Com base nos resultados descritos para as comparações múltiplas qualitativas, entre as diferentes bactérias para as nanoemulsões obtidas em condições idênticas do processo, é possível inferir, de modo genérico, que mesmo entre os diferentes ensaios, as bactérias apresentaram uma tendência na atividade antibacteriana relativamente semelhante. Essa tendência, descrita por uma maior sensibilidade ao cinamaldeído por parte do *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foi praticamente oposta a menor sensibilidade ao cinamaldeído, quase sempre apresentada pela *Listeria innocua*, *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli*. Nos extremos, quase sempre o cinamaldeído incorporado às nanoemulsões promoveu uma maior sensibilidade no *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, tipificados, respectivamente como bactérias gram-positiva e gram-negativa e menor sensibilidade pelas bactérias gram-negativas *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli*, respectivamente.

Com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, esse comportamento corrobora com o esperado, pois em teoria, esperava-se que maiores zonas de inibição, as quais correspondem a uma maior sensibilidade da bactéria ao agente antibacteriano, fossem identificadas em bactérias gram-positivas, sendo o comportamento contrário idealmente suposto para as bactérias gram-negativas. Possivelmente, essa maior sensibilidade à presença do composto antimicrobiano em bactérias gram-positivas pode estar associada às propriedades da parede celular. A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa, devido à presença de uma membrana externa, composta principalmente de lipopolissacarídeos, além de uma fina camada de peptidoglicano (< 10 nm). Em contrapartida, as bactérias Gram-positivas têm parede celular de peptidoglicano espessa, no entanto, porosa (20-80 nm) (Noori et al., 2018; Varghese & Balachandran, 2021). Assim, a membrana externa das bactérias Gram-negativas atua como uma barreira de permeabilidade, de modo que os processos difusivos do cinamaldeído retido nas nanoemulsões para o interior da célula foram reduzidos.

No entanto, comportamento atípico foi observado para a *Pseudomonas aeruginosa*, que apesar de ser uma bactéria gram-negativa e supostamente mais resistente e menos sensível a presença de agente antimicrobianos. Esse comportamento, denota possivelmente a ocorrência de mecanismos de resistência bacteriana muito específicos e intrínsecos a cada microorganismo para o antimicrobiano em estudo, os quais podem não estar relacionados somente as diferenças na composição da parede celular das bactérias e ao mesmo tempo podem ter sido decisivas quanto aos processos difusivos passivos e ativos envolvidos nos mecanismos de resistência antibacteriana na presença das nanoemulsões produzidas.

3.4 Correlação de Pearson

Os resultados para a correlação entre as propriedades coloidais, ópticas, composição bioativa e atividade antibacteriana *in-vitro* das nanoemulsões do DCCR são apresentadas na Tabela 9.

O diâmetro hidrodinâmico (D_H) apresentou uma correlação moderada positiva ($r = 0,676$) com o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e forte positiva ($r = 0,903$) com a turbidez das nanoemulsões. O CFT correlacionou-se com a turbidez de forma positiva e moderada ($r = 0,732$). Esses resultados confirmam de modo satisfatório o comportamento previamente hipotetizado nos itens 3.1.2; 3.1.4 e 3.1.5, pois mostram a relação de interdependência positiva entre as propriedades cinética e óptica e a composição fenólica total das nanoemulsões.

Tabela 9. Correlação de Pearson (r) entre as propriedades** coloidais, ópticas, composição bioativa e atividade antibacteriana *in-vitro* das nanoemulsões do DCCR.

	PZ	D _H	PDI	CFT	T	PA	EC	SA	LI	SC
PZ	1,000	-0,293	-0,095	-0,317	-0,331	-0,047	0,365	-0,041	0,024	-0,270
D _H		1,000	0,128	0,676*	0,903*	0,100	-0,180	-0,192	0,088	-0,247
PDI			1,000	-0,057	0,162	-0,263	0,024	0,062	0,139	-0,206
CFT				1,000	0,732*	0,079	-0,372	-0,136	-0,142	-0,049
T					1,000	0,063	-0,193	-0,269	-0,129	-0,180
PA						1,000	-0,033	0,130	-0,303	-0,056
EC							1,000	0,207	-0,103	-0,354
SA								1,000	-0,415	-0,054
LI									1,000	-0,340
SC										1,000

* A correlação foi estabelecida pelo método de Pearson. * indica correlação estatisticamente significativa ao nível de 0,05% de significância.

** PA: *Pseudomonas aeruginosa*; EC: *Escherichia coli*; SA: *Staphylococcus aureus*; LI: *Listeria innocua* e SC: *Salmonella choleraesuis*; PZ: Potencial zeta; D_H: Diâmetro hidrodinâmico; PDI: Índice de polidispersidade; CFT: Compostos fenólicos totais; T: Turbidez.

Source: Authors.

Tendência semelhante foi reportada por Qi et al. (2022), os quais constataram, que nanoemulsões de D-limoneno produzidas por homogeneização por alta pressão apresentaram menor diâmetro hidrodinâmico e menor turbidez. Eles inferiram que maiores valores para o D_H ocasionam fenômenos de desestabilização, a exemplo da coalescência, e estes fenômenos impactam diretamente na redução da turbidez dos sistemas avaliados.

Ao mesmo tempo, o aumento da turbidez correlacionou-se positivamente com os teores de compostos fenólicos totais, os quais, nestas condições encontram-se supostamente mais disponíveis e menos retidos na fase contínua do sistema coloidal. A relação inversa provavelmente se dá pela maior ocorrência de espalhamento de luz uv/vis ao incidir nas amostras contendo frações livres de cinamaldeído.

4. Conclusões

Os sistemas coloidais produzidos no presente estudo, apresentaram-se monodispersos e dentro da escala nanométrica esperada, independentemente do binômio de tempo de sonicação e amplitude da potência utilizada. A metodologia de superfície de resposta por meio do delineamento composto central rotacional foi uma ferramenta útil e eficiente para a determinação das condições ideais do processo assistido por ultrassom das nanoemulsões de cinamaldeído. Os resultados sugeriram que a AP foi a única variável preditora a exercer efeito significativo ($p < 0,05$), tendo influenciado de maneira crítica o D_H e a T dos sistemas obtidos.

Verificou-se que nanoemulsões potencialmente mais estáveis em termos cinéticos, foram obtidas com amplitude de potência correspondente a 20%, independentemente do tempo requerido para o processo de sonicação, apresentando menores valores de D_H e T. Assim, o uso de menores tempos de sonicação torna-se mais econômico do ponto de vista energético.

Todas as nanoemulsões preservaram de modo satisfatório o teor de compostos fenólicos totais durante o protocolo analítico experimental produtivo e mantiveram assim a efetividade contra o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, a *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus*, a *Listeria innocua* e a *Salmonella choleraesuis*.

Foi possível confirmar estatisticamente ($p < 0,05$) que maiores valores de D_H ocasionam uma redução na transparência das nanoemulsões, tornando-as mais susceptíveis aos fenômenos de desestabilização. Ao mesmo tempo que o aumento da

turbidez promove um incremento na quantificação dos teores de compostos fenólicos totais (CFT), supostamente livres e mais disponíveis para as reações envolvidas na quantificação desse composto bioativo.

As nanoemulsões de cinemaldeído assistidas por ultrassom são uma alternativa robusta e energeticamente atrativa a ser utilizada especialmente na indústria de alimentos, visto que seu processo de obtenção requer um baixo aporte energético e tempo reduzido de sonicação. Aliado a isso, a demanda expressiva dos consumidores por produtos de elevada qualidade nutracêutica e a potencial segurança que esses sistemas coloidais podem oferecer à matriz alimentícia em termos microbiológicos para o consumo humano, tem se tornado cada vez mais um atrativo emergente a ser explorado.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES), Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

Referências

- Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., & Zhang, X. (2013). An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. *Food Engineering Reviews*, 5(3), 139-157. [10.1007/s12393-013-9066-3](https://doi.org/10.1007/s12393-013-9066-3)
- Balaguer, M. P., Lopez-Carballo, G., Catala, R., Gavara, R., & Hernandez-Munoz, P. (2013). Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. *International journal of food microbiology*, 166 (3), 369 - 377. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.012
- Bhattacharya, B., Narain, V., & Bondesson, M. (2021). E-cigarette vaping liquids and the flavoring chemical cinnamaldehyde perturb bone, cartilage and vascular development in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 240, 105995. doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105995
- Buglak, N., & Bahnson, E. M. (2018). Cinnamic aldehyde increases antioxidant defenses in vascular smooth muscle cells after injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 128, S22. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.005
- Chen, W., Xia, S., & Xiao, C. (2022). Complex coacervation microcapsules by tannic acid crosslinking prolong the antifungal activity of cinnamaldehyde against *Aspergillus brasiliensis*. *Food Bioscience*, 47, 101686. doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101686
- CLSI. (2012). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22st informational supplement (M100–S22). CLSI, Wayne.
- Cocchiara, J., Letizia, C. S., Lalko, J., Lapczynski, A., & Api, A. M. (2005). Fragrance material review on cinnamaldehyde. *Food and chemical toxicology*, 43(6), 867-923. doi.org/10.1016/j.fct.2004.09.014
- Cui, H., Tang, C., Wu, S., McClements, D. J., Liu, S., Li, B., & Li, Y. (2022). Fabrication of chitosan-cinnamaldehyde-glycerol monolaurate bigels with dual gelling effects and application as cream analogs. *Food Chemistry*, 384, 132589. doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132589
- De Matos, R. P. A., Calmon, M. F., Amantino, C. F., Villa, L. L., Primo, F. L., Tedesco, A. C., & Rahal, P. (2018). Effect of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in cervical carcinoma cell lines. *BioMed research international*, 2018(.). [10.1155/2018/4057959](https://doi.org/10.1155/2018/4057959)
- De Oliveira, T. V., de Freitas, P. A. V., Pola, C. C., da Silva, J. O. R., Diaz, L. D. A., Ferreira, S. O., & de FF Soares, N. (2020). Development and optimization of antimicrobial active films produced with a reinforced and compatibilized biodegradable polymers. *Food Packaging and Shelf Life*, 24, 100459. doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100459
- Doost, A. S., Nasrabadi, M. N., Kassozi, V., Nakisozi, H., & Van der Meer, P. (2020). Recent advances in food colloidal delivery systems for essential oils and their main components. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 474-486. doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.037
- Doyle, A. A., & Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139, 104405. doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405
- Falleh, H., Jemaa, M. B., Neves, M. A., Isoda, H., Nakajima, M., & Ksouri, R. (2021). Peppermint and Myrtle nanoemulsions: Formulation, stability, and antimicrobial activity. *LWT*, 152, 112377. doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112377
- Gaikwad, S. G., & Pandit, A. B. (2008). Ultrasound emulsification: effect of ultrasonic and physicochemical properties on dispersed phase volume and droplet size. *Ultrasonics sonochemistry*, 15(4), 554-563. doi.org/10.1016/j.ulsonch.2007.06.011
- Gauthier, G., & Capron, I. (2021). Pickering nanoemulsions: an overview of manufacturing processes, formulations, and applications. *JCIS Open*, 4, 100036. doi.org/10.1016/j.jciso.2021.100036
- Gogate, P. R., & Kabadi, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 60-72. doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.006

- Gomes, A., Costa, A. L. R., & Cunha, R. L. (2018). Impact of oil type and WPI/Tween 80 ratio at the oil-water interface: Adsorption, interfacial rheology and emulsion features. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 164, 272-280. 10.1016/j.colsurfb.2018.01.032
- Gul, O., Saricaoglu, F. T., Besir, A., Atalar, I., & Yazici, F. (2018). Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. *Ultrasonics sonochemistry*, 41, 466-474. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.011
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*, 12(11), 2826-2841. 10.1039/C5SM02958A
- Hou, K., Xu, Y., Cen, K., Gao, C., Feng, X., & Tang, X. (2021). Nanoemulsion of cinnamon essential oil Co-emulsified with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Tween-80: Antibacterial activity, stability and slow release performance. *Food Bioscience*, 43, 101232. doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101232
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food hydrocolloids*, 22 (7), 1191-1202. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.006
- Karim, M., Fathi, M., & Soleimani-Zad, S. (2021). Nanoencapsulation of cinnamic aldehyde using zein nanofibers by novel needle-less electrospinning: Production, characterization and their application to reduce nitrite in sausages. *Journal of Food Engineering*, 288, 110140. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110140
- Kim, H. O., Park, S. W., & Park, H. D. (2004). Inactivation of Escherichia coli O157: H7 by cinnamic aldehyde purified from Cinnamomum cassia shoot. *Food Microbiology*, 21(1), 105-110. doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00010-8
- Komaiko, J., & McClements, D. J. (2015). Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. *Journal of food engineering*, 146, 122-128. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.003
- Li, M. K., & Fogler, H. S. (1978). Acoustic emulsification. Part 1. The instability of the oil-water interface to form the initial droplets. *Journal of Fluid Mechanics*, 88(3), 499-511. 10.1017/S0022112078002232
- Louis, E., Villalobos-Carvajal, R., Reyes-Parra, J., Jara-Quijada, E., Ruiz, C., Andrades, P., Gacitúa, J., Beldarraín-Iznaga, T., & Beldarraín-Iznaga, T. (2021). Preservation of mushrooms (*Agaricus bisporus*) by an alginate-based-coating containing a cinnamaldehyde essential oil nanoemulsion. *Food Packaging and Shelf Life*, 28, 100662. doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100662.
- Mahdi Jafari, S., He, Y., & Bhandari, B. (2006). Nano-emulsion production by sonication and microfluidization—a comparison. *International journal of food properties*, 9(3), 475-485. doi.org/10.1080/10942910600596464
- Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (2002). *Applied sonochemistry: the uses of power ultrasound in chemistry and processing* (Vol. 10). Weinheim: Wiley-Vch.
- McClements, D. J. (2004). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press. doi.org/10.1201/9781420039436
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297-2316. 10.1039/c0sm00549e
- McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). Chapter 1—General aspects of nanoemulsions and their formulation. *Nanoemulsions* (pp. 3-20). doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1
- Miller, N. (1950). Chemical action of sound waves on aqueous solutions. *Transactions of the Faraday Society*, 46, 546-550. 10.1039/tf9504600546
- Montgomery, D. C. (2001). *Design and analysis of experiments* Fifth Edition. By John Wiley & Sons, Inc.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley e Sons. (4th ed.), Wiley, New York, (Chapter 2).
- Nascimento, L. G. L., Casanova, F., Silva, N. F. N., de Carvalho Teixeira, Á. V. N., Júnior, P. P. D. S. P., Vidigal, M. C. T. R., Stringheta, P. C., & de Carvalho, A. F. (2020). Use of a crosslinked casein micelle hydrogel as a carrier for jaborcaba (*Myrciaria cauliflora*) extract. *Food Hydrocolloids*, 106, 105872. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105872.
- Noori, S., Zeynali, F., & Almasi, H. (2018). Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food control*, 84, 312-320. doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.015
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of agricultural and food chemistry*, 26(3), 716-723. doi.org/10.1021/jf60217a041
- Qi, H., Chen, S., Zhang, J., & Liang, H. (2022). Robust stability and antimicrobial activity of d-limonene nanoemulsion by sodium caseinate and high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 111159. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111159
- Riesz, P., & Kondo, T. (1992). Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biology and medicine*, 13(3), 247-270. 10.1016/0891-5849(92)90021-8
- Sharma, N., Kaur, G., & Khatkar, S. K. (2021). Optimization of emulsification conditions for designing ultrasound assisted curcumin loaded nanoemulsion: Characterization, antioxidant assay and release kinetics. *LWT*, 141, 110962. doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110962
- Shreaz, S., Bhatia, R., Khan, N., Maurya, I. K., Ahmad, S. I., Muralidhar, S., Manzoor, N., & Khan, L. A. (2012). Cinnamic aldehydes affect hydrolytic enzyme secretion and morphogenesis in oral *Candida* isolates. *Microbial pathogenesis*, 52 (5), 251-258. doi.org/10.1016/j.micpath.2011.11.005
- Shreaz, S., Wani, W. A., Behbehani, J. M., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., Ali, I., Siddiqi, W. A. & Hun, L. T. (2016). Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, 116-131. doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.016

- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Song, F., Li, H., Sun, J., & Wang, S. (2013). Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 150(1), 125-130. doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.019
- Sun, Y., Zhang, M., Bhandari, B., & Bai, B. (2021). Nanoemulsion-based edible coatings loaded with fennel essential oil/cinnamaldehyde: Characterization, antimicrobial property and advantages in pork meat patties application. *Food Control*, 127, 108151. doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108151
- Suslick, K. S. (1989). The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*, 260(2), 80-87.
- Thirapanmethee, K., Kanathum, P., Khuntayaporn, P., Huayhongthong, S., Surassmo, S., & Chomnawang, M. T. (2021). Cinnamaldehyde: A plant-derived antimicrobial for overcoming multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *European Journal of Integrative Medicine*, 48, 101376. doi.org/10.1016/j.eujim.2021.101376
- Uthumpa, C., Indranupakorn, R., & Asasutjarit, R. (2013). Development of nanoemulsion formulations of ginger extract. In *Advanced materials research* (Vol. 684, pp. 12-15). Trans Tech Publications Ltd. doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.684.12.
- Varghese, M., & Balachandran, M. (2021). Antibacterial efficiency of carbon dots against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(6), 106821. doi.org/10.1016/j.jece.2021.106821
- Wan, C. J., Zhang, Y., Liu, C. X., & Yang, Z. C. (2022). Cinnamic aldehyde, isolated from *Cinnamomum cassia*, alone and in combination with pyrazinamide against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in vivo. *South African Journal of Botany*, 144, 200-205. doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.009
- Wood, R. W., & Loomis, A. L. (1927). XXXVIII. The physical and biological effects of high-frequency sound-waves of great intensity. *The London, Edinburgh, and Dublin philosophical magazine and journal of science*, 4(22), 417-436. doi.org/10.1080/14786440908564348
- Zhang, J., Peppard, T. L., & Reineccius, G. A. (2015). Preparation and characterization of nanoemulsions stabilized by food biopolymers using microfluidization. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(4), 288-294. doi.org/10.1002/ffj.3244
- Zheng, B., Qi, J., Yang, Y., Li, L., Liu, Y., Han, X., Qu., We., & Chu, L. (2022). Mechanisms of cinnamic aldehyde against myocardial ischemia/hypoxia injury in vivo and in vitro: Involvement of regulating PI3K/AKT signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 147, 112674. doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112674