



UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR

Recredenciada pela Portaria – MEC n.º 747, de 10/09/2020 – D.O.U. 11/09/2020

Mantenedora: UNIPAR – SOCIEDADE EMPRESARIAL LTDA.

Coordenação de Pós-Graduação *Stricto Sensu* e Pesquisa

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura

Camila Frederico

Óleos essenciais de plantas medicinais: atividade antibacteriana, encapsulação e aplicação em alimentos

**Umuarama
2025**

Camila Frederico

Óleos essenciais de plantas medicinais: atividade antibacteriana, encapsulação e aplicação em alimentos

Tese apresentada como parte das exigências para a obtenção do grau de doutor em Biotecnologia Aplicada à Agricultura pela Universidade Paranaense - UNIPAR.

Orientadora: Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig

Umuarama
2025

Ficha Catalográfica

F852o Frederico, Camila.

Óleos essenciais de plantas medicinais: atividade antibacteriana, encapsulação e aplicação em alimentos / Camila Frederico. – Umuarama: Universidade Paranaense - UNIPAR, 2025.

97 f.

Orientadora: Dr^a. Suelen Pereira Ruiz Herrig.

Tese (Doutorado) – Universidade Paranaense - UNIPAR.

1. Bioconservante. 2. Encapsulação 3. *Origanum vulgare*. 4. Sinergismo. 5. *Thymus Vulgaris*. I. Universidade Paranaense - UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 615.321

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

Óleos essenciais de plantas medicinais: atividade antibacteriana, encapsulação e aplicação em alimentos

Tese aprovada como requisito obrigatório para obtenção do Grau de Doutor no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense – UNIPAR, pela seguinte banca examinadora:

Dra. Juliana Scanavaca
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dr. Oscar de Oliveira Santos Junior
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dra. Maria Graciela Iecher Faria Nunes
Universidade Paranaense - UNIPAR

Dra. Zilda Cristiani Gazim
Universidade Paranaense - UNIPAR

Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig

Universidade Paranaense – UNIPAR

Umuarama, 28 de fevereiro de 2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem a Sua presença constante, eu não teria superado os desafios e encontrado o equilíbrio necessário para chegar até aqui.

Agradeço à minha família por todo amor, compreensão e apoio em minhas escolhas. Nada disso seria possível sem vocês.

Um agradecimento especial a minha orientadora, Professora Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig, por todo o apoio, orientação e incentivo. Sua sabedoria, paciência e comprometimento em compartilhar seus conhecimentos foram essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço à Professora Dra. Fernanda Vitória Leimann e a Universidade Tecnológica Federal (UTFPR) campus Campo Mourão pela contribuição na encapsulação dos óleos essenciais com zeína.

Agradeço ao Professor Dr. Leandro S. Herculano e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Medianeira pelas análises espectroscópicas, termogravimétricas e quimiométricas das amostras relacionadas ao estudo de encapsulamento com zeína.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura que fizeram parte dessa jornada acadêmica.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense – UNIPAR e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil CAPES - finance code 001 pela bolsa e apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
CAPÍTULO I	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 METODOLOGIA	18
2.1 Segurança de alimentos: a importância dos conservantes e os possíveis malefícios que podem causar	18
2.2 Óleos essenciais e seu mecanismo de ação antibacteriano e antioxidante	19
2.3 Óleos essenciais como conservante em alimentos	20
2.4 Encapsulação dos óleos essenciais para estabilização dos compostos ativos	23
2.5 Segurança da utilização dos óleos essenciais como aditivos em alimentos	24
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
4 AGRADECIMENTOS	28
5 REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II	34
1 INTRODUÇÃO	34
2 METODOLOGIA	37
2.1 Composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas medicinais	37
2.2 Aplicações de óleos essenciais de plantas medicinais em alimentos	40
2.3 Desafios e perspectivas da aplicação de óleos essenciais em alimentos	42
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
4 REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO III	51
1 INTRODUÇÃO	52
2 MATERIAIS E MÉTODOS	55
2.1 Obtenção dos óleos essenciais	55
2.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais	55
2.2.1 Microrganismos e preparo do inóculo	55
2.2.2 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo	55
2.3 Efeito sinérgico dos óleos essenciais	56

2.4 Encapsulação dos óleos essenciais	56
2.5 Caracterização dos óleos essenciais puros e encapsulados	57
2.5.1 Análises térmicas	57
2.5.2 Análise termogravimétrica	57
2.5.3 Espectroscopia FTIR	57
2.5.4 Análise do componente principal	57
2.6 Produção do queijo minas frescal	57
2.7 Análise físico química do queijo	58
2.8 Contagem de Staphylococcus aureus em queijo	59
2.9 Análise estatística	59
3 RESULTADOS	60
3.1 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo	60
3.2 Efeito sinérgico dos óleos essenciais	61
3.3 Encapsulação dos óleos essenciais	62
3.4 Caracterização dos óleos essenciais encapsulados	63
3.4.1 Análises térmicas	63
3.5 Análise físico química do queijo	67
3.6 Contagem de Staphylococcus aureus em queijo	69
4 DISCUSSÃO	70
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
6 AGRADECIMENTOS	75
7 REFERÊNCIAS	76
CAPÍTULO IV	81
1 INTRODUÇÃO	82
2 MATERIAIS E MÉTODOS	85
2.1 Obtenção dos óleos essenciais	85
2.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais	85
2.2.1 Microrganismos e preparo do inóculo	85
2.2.2 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo	85
2.3 Desenvolvimento do purê de tomate	86
2.4 Contagem microbiana em purê de tomate	86
2.5 pH do purê de tomate	87
2.6 Análise estatística	87
3 RESULTADOS	88
3.1 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo	88

3.2 Contagem microbiana em purê de tomate	89
3.3 pH do purê de tomate	90
4 DISCUSSÃO	91
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
6 AGRADECIMENTOS	94
7 REFERÊNCIAS	95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Isobogramas do sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho (A) *S.aureus*, (B) *S. Typhi*, (C) *L. monocytogenes* e (D) *E. coli*. 62
- Figura 2.** Caracterização dos óleos essenciais encapsulados por análise termogravimétrica (TGA). 64
- Figura 3.** Caracterização dos óleos essenciais encapsulados por análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC). 65
- Figura 4.** Análises de espectros de absorvância no infravermelho (FTIR). (A) óleo essencial de orégano, (B) óleo essencial de tomilho e (C) sinergismo dos óleos essenciais livres e encapsulados. 66
- Figura 5.** Análise do componente principal, (A) porcentagem de variância explicada para os primeiros cinco componentes principais e (B) gráfico dos dois primeiros componentes principais para os óleos essenciais. 67
- Figura 6.** Contagem de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal com adição de óleos essenciais de tomilho e orégano livres e encapsulados, sinergismo de óleos essenciais sem encapsular, sinergismo de óleos essenciais encapsulados com zeína, Controle (sem antimicrobiano), zeína, Natamicina e Nisina, e controle (sem antimicrobiano) durante o armazenamento de 14 dias. 69

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Aplicação de óleos essenciais livres ou encapsulados como antibacteriano em alimentos. 22

Tabela 2. Óleos essenciais GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) pelo FDA (Food and Drug administration). 27

Capítulo II

Tabela 1. Composição química e concentração inibitória mínima (MIC) (mg/mL) de óleos essenciais de algumas espécies de plantas medicinais *in vitro* em bactérias patogênicas de interesse em alimentos. 39

Tabela 2. Aplicação de óleos essenciais de plantas medicinais como antibacteriano em diferentes matrizes alimentares. 42

Capítulo III

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) dos óleos essenciais de orégano e tomilho e dos controles Sorbato de Potássio, Nisina e Natamicina. 61

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) para óleos essenciais de tomilho e orégano encapsulados com zeína. 63

Tabela 3. Análise de pH e acidez titulável do queijo minas frescal durante o período de armazenamento. 68

Capítulo IV

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (mg/mL) do óleo essencial de orégano e os conservantes nisina e sorbato de potássio isolados e combinados. 88

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (mg/mL) do óleo essencial de tomilho e os conservantes nisina e sorbato de potássio isolados e combinados. 89

Tabela 3. Contagem de *Salmonella enterica* *Thypi* e bolores e leveduras em Log UFC/g no purê de tomate contaminado com *Salmonella enterica* *Thypi* e com tratamentos antimicrobianos durante o armazenamento de 7 dias. 90

Tabela 4. pH do purê de tomate com tratamentos antimicrobianos. 90

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CBM	Concentração bactericida mínima
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
DSC	Calorimetria de varredura diferencial
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
FDA	Food and Drug administration
FIC	Concentração inibitória fracional
FTIR	Espectros de absorbância no infravermelho
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
NMP	Número mais provável
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Análise de Componentes Principais
TGA	Termogravimétrica
UFC	Unidade formadora de colônia

Camila Frederico

Óleos essenciais de plantas medicinais: atividade antibacteriana, encapsulação e aplicação em alimentos

RESUMO: A preservação dos produtos alimentícios é imprescindível, consistindo em controlar o desenvolvimento de microrganismos responsáveis por gerar a deterioração e riscos à saúde dos consumidores. Os óleos essenciais apresentam propriedades antibacteriana e antioxidante, sendo uma alternativa na conservação de alimentos, podendo substituir ou diminuir o uso dos conservantes sintéticos tradicionais. Entretanto, quando adicionados diretamente aos alimentos podem ter suas características e seus efeitos desejados diminuídos, para evitar tal fato, técnicas para a preservação dessas propriedades como a encapsulação destes componentes são utilizadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e o sinergismo dos óleos essenciais para aplicação em alimentos. Deste modo este trabalho está dividido em quatro capítulos. Nos capítulos I e II foram realizadas revisões bibliográficas. O primeiro capítulo aborda os seguintes tópicos: a importância dos conservantes e os possíveis malefícios que podem causar, mecanismo de ação antimicrobiano e antioxidante dos óleos essenciais, óleos essenciais como conservantes em alimentos, encapsulação dos óleos essenciais para estabilização dos compostos ativos e segurança da utilização dos óleos essenciais como aditivos em alimentos. O segundo capítulo discute sobre o potencial antibacteriano de óleos essenciais de plantas medicinais para conservação de alimentos. No terceiro capítulo foi avaliada a atividade antibacteriana, efeito sinérgico, encapsulação com zeína dos óleos essenciais de orégano e tomilho e aplicação em queijo minas frescal. Os óleos essenciais de orégano e tomilho foram adquiridos da empresa Ferquima. A atividade antibacteriana foi avaliada contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhi, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* pelo método de microdiluição em caldo. Os efeitos sinérgicos dos óleos essenciais foram analisados pelo método *checkerboard*. Os óleos essenciais foram encapsulados com zeína e avaliados quanto ao efeito antibacteriano. As análises térmicas, termogravimétrica (TGA), calorimetria de varredura diferencial (DSC), espectroscopia FTIR e análise de componente principal foram utilizadas para avaliar a estabilidade térmica das diferentes amostras. Os óleos essenciais encapsulados foram aplicados em queijo minas frescal para análise da atividade antibacteriana avaliando os seguintes tratamentos: T1= controle (sem tratamento antimicrobiano, somente inóculo), T2= nisina, T3= natamicina, T4= zeína pura, T5= sinergismo com zeína, T6= OE de orégano, T7= OE de tomilho, T8= OE sinergismo, T9= OE de orégano com zeína e T10= OE de tomilho com zeína. A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de orégano variou de 0,10 a 0,41 mg/mL e tomilho de 0,15 a 0,52 mg/mL, com a encapsulação a CIM do óleo essencial de tomilho teve variação de >10 a 2,08 mg/mL e de 5 a 2,08 mg/mL para o óleo essencial de orégano. A concentração inibitória fracional (FIC) teve como resultado 0,09 para *Staphylococcus aureus*, 0,07 para *Salmonella* Typhi e *Listeria monocytogenes* e 0,27 para *Escherichia coli*, indicando sinergismo entre os óleos. As análises DSC, FTIR e TGA demonstraram que a encapsulação dos óleos essenciais foi efetiva, promovendo a estabilidade térmica. No sétimo dia de armazenamento do queijo minas frescal, o tratamento T4 (sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho sem

zeína) promoveu a redução de 1,17 Log UFC/g e no décimo quarto dia, todos os tratamentos obtiveram a contagem bacteriana inferior ao tratamento T1 (sem antimicrobiano) 9,11 Log UFC/g, com destaque para o tratamento T6 (óleo essencial de orégano) 6,32 Log UFC/g comprovando a efetividade dos tratamentos. No quarto capítulo foi avaliado o sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho com sorbato de potássio e nisina e aplicação de tratamentos em purê de tomate. A atividade antibacteriana foi avaliada contra *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhi, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* pelo método de microdiluição em caldo. Os purês foram contaminados intencionalmente com *Salmonella* Typhi e testadas as seguintes formulações conservantes F1: controle (somente inóculo - sem conservantes); F2: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de tomilho 50%; F3: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de orégano 50%; F4: óleo essencial de orégano; F5: óleo essencial de tomilho e F6: sorbato de potássio. Na análise da atividade antibacteriana em purê de tomate, todos os antimicrobianos foram efetivos contra *Salmonella* Typhi quando comparados à amostra controle (sem tratamento). Esses resultados demonstram que os óleos essenciais se mostram promissores como agente antibacteriano para aplicação como conservantes naturais em alimentos.

Palavras-chave: Bioconservante. Encapsulação. *Origanum vulgare*. Sinergismo. *Thymus Vulgaris*. Sinergismo.

Camila Frederico

Essential oils from medicinal plants: antibacterial activity, encapsulation and application in food

ABSTRACT: The preservation of food products is essential, consisting of controlling the development of microorganisms responsible for causing deterioration and health risks to consumers. Essential oils have antibacterial and antioxidant properties, being an alternative in food preservation and can replace or reduce the use of traditional synthetic preservatives. However, when added directly to food, their characteristics and desired effects may be reduced. To avoid this, techniques for preserving these properties such as encapsulation of these components are used. The objective of this work was to evaluate the antibacterial activity and synergism of essential oils for application in foods. This work is therefore divided into four chapters. In chapters I and II, bibliographical reviews were carried out. The first chapter covers the following topics: the importance of preservatives and the possible harm they can cause, mechanism of antimicrobial and antioxidant action of essential oils, essential oils as preservatives in foods, encapsulation of essential oils to stabilize active compounds and safety of using essential oils as additives in foods. The second chapter discusses the antibacterial potential of essential oils from medicinal plants for food preservation. In the third chapter, the antibacterial activity, synergistic effect, encapsulation of oregano and thyme essential oils with zein and application in Minas frescal cheese were evaluated. Antibacterial activity was evaluated against *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhi, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by broth microdilution method. The synergistic effects of essential oils were analyzed using the checkerboard method. The essential oils were encapsulated with zein and evaluated for their antibacterial effect. Thermal analysis, thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), FTIR spectroscopy and principal component analysis were used to evaluate the thermal stability of the different samples. The encapsulated essential oils were applied to Minas Frescal cheese to analyze the antibacterial activity evaluating the following treatments: T1= control (without antimicrobial treatment, only inoculum), T2= nisin, T3= natamycin, T4= pure zein, T5= synergism with zein, T6= OE of oregano, T7= OE of thyme, T8= OE synergism, T9= OE of oregano with zein and T10= thyme OE with zein. The minimum inhibitory concentration (MIC) of oregano essential oil ranged from 0.10 to 0.41 mg/mL and thyme from 0.15 to 0.52 mg/mL, with encapsulation the MIC of thyme essential oil ranged from >10 to 2.08 mg/mL and from 5 to 2.08 mg/mL for oregano essential oil. The fractional inhibitory concentration (FIC) resulted in 0.09 for *Staphylococcus aureus*, 0.07 for *Salmonella* Typhi and *Listeria monocytogenes* and 0.27 for *Escherichia coli*, indicating synergism between the oils. DSC, FTIR and TGA analysis demonstrated that the encapsulation of essential oils was effective, promoting thermal stability. On the seventh day of storage of minas frescal cheese, the T4 treatment (synergism of essential oils of oregano and thyme without zein) promoted a reduction of 1.17 Log CFU/g and on the fourteenth day, all treatments obtained a bacterial count lower than the T1 treatment (without antimicrobial) 9.11 Log CFU/g, with emphasis on the T6 treatment (oregano essential oil) 6.32 Log CFU/g, proving the effectiveness of treatments. In the fourth

chapter, the synergism of oregano and thyme essential oils with potassium sorbate and nisin and application of treatments in tomato puree was evaluated. Oregano and thyme essential oils were purchased from the company Ferquima. Antibacterial activity was evaluated against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhi, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by broth microdilution method. The purees were intentionally contaminated with *Salmonella* Typhi and the following F1 preservative formulations were tested: control (inoculum only - no preservatives); F2: potassium sorbate 50% + thyme essential oil 50%; F3: potassium sorbate 50% + oregano essential oil 50%; F4: oregano essential oil; F5: thyme essential oil and F6: potassium sorbate. In the analysis of antibacterial activity in tomato puree, all antimicrobials were effective against *Salmonella* Typhi when compared to the control sample (without treatment). These results demonstrate that essential oils show promise as an antibacterial agent for application as natural preservatives in foods.

Keywords: Biopreservative. Encapsulation. *Origanum vulgare*. Synergism. *Thymus Vulgaris*. Synergism.

CAPÍTULO I

Óleos essenciais como aditivos naturais em alimentos: estabilidade e segurança

Artigo de revisão publicado no periódico Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR v. 27, n. 10, p. 5739-5755, outubro de 2023. DOI: <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v27i10.2023-018>

RESUMO: Os óleos essenciais são líquidos aromáticos voláteis derivados do metabolismo secundário das plantas, sendo constituído por uma mistura complexa de diferentes compostos ativos. Diversas plantas medicinais são fontes de extração de óleos essenciais sendo reconhecidos como seguros (GRAS) pelo FDA (Food and Drug administration). A utilização de óleos essenciais como possíveis conservantes em alimentos vem ganhando espaço nas pesquisas devido a suas atividades antioxidante e antibacteriana, características importantes na preservação de alimentos e também ao interesse da população em consumir produtos mais saudáveis. Os óleos essenciais são uma alternativa promissora para a indústria de alimentos, pois atuam no controle de bactérias patogênicas e deteriorantes. Em comparação com os conservantes químicos sintéticos, os óleos essenciais geralmente são mais seguros, porém apresentam baixa estabilidade, deste modo a encapsulação é uma forma de protegê-los de adversidades. Esta revisão tem como objetivo demonstrar a efetividade, estabilidade e a segurança dos óleos essenciais e seu uso em matrizes alimentares.

Palavras-chave: Antibacteriano. Compostos naturais. Conservantes. Doenças transmitidas por alimentos. Encapsulação.

1 INTRODUÇÃO

As Doenças transmitidas por alimentos ocorrem pelo consumo de alimentos e/ou água contaminados, a Organização Mundial da Saúde estima que anualmente aproximadamente um a cada dez habitantes adoecem no mundo por essa causa (FAO, 2019). As doenças transmitidas por alimentos custam anualmente US\$ 7,4 milhões em perdas de produtividade da sociedade, sobrecarregando os sistemas de saúde e reduzindo o desenvolvimento econômico (OPAS, 2022). Para evitar a contaminação por microrganismos nos alimentos, comumente os conservantes sintéticos são utilizados, porém podem causar efeitos tóxicos dependendo da quantidade ingerida e da susceptibilidade do organismo (BENSID *et al.*, 2020).

Tendo em vista os possíveis efeitos nocivos à saúde relacionados ao consumo de conservantes sintéticos, cada vez mais os consumidores buscam alimentos que

provoquem pouco ou nenhum impacto à saúde (JACKSON-DAVIS *et al.*, 2023). Deste modo, a utilização de produtos naturais como os óleos essenciais na conservação de alimentos tem ganhado destaque nas pesquisas, visando a substituição total ou parcial de aditivos químicos sintéticos (FREDERICO *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos voláteis derivados do metabolismo secundário das plantas, sendo constituído por uma mistura complexa de diferentes compostos ativos (terpenos, compostos fenólicos, álcool), devido a sua composição, os óleos essenciais apresentam atividade antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e antioxidante (FALLEH *et al.*, 2020).

A composição do óleo essencial pode variar de acordo com fatores intrínsecos (solo, clima, estágio de desenvolvimento da planta) e extrínsecos (métodos de extração) (DIFHI *et al.*, 2016; RAHAL *et al.*, 2022). A hidrodestilação é a técnica mais utilizada devido à praticidade e ao baixo custo, onde o material vegetal é imerso em água sob aquecimento até a fervura, resultando na formação de vapores que arrastam os compostos voláteis, os quais, após condensação, separam-se da fase aquosa por decantação (PRISN *et al.*, 2006; LALONDE *et al.*, 2019).

A maioria dos óleos essenciais de plantas medicinais e especiarias são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) para utilização em alimentos pelo FDA (Food and Drug administration) (Food and Drug administration/CRF21, 2016). Porém, apesar dos óleos essenciais serem seguros para uso em alimentos, ainda existem limitações em sua aplicação como conservantes de alimentos, devido a interações com outros componentes da matriz alimentar, sua alta volatilidade, e alterações de sabor no produto (CHRISTAK *et al.*, 2021). Por conta desses inconvenientes, técnicas de encapsulação do óleo essencial podem ser utilizadas para melhorar sua estabilidade, solubilidade, facilitar o manuseio, promover liberação controlada e ocultar sabor e odor indesejáveis (REIS *et al.*, 2022).

A importância deste estudo é de melhorar a compreensão sobre a estabilidade e a segurança da adição de óleos essenciais como conservantes em alimentos, contribuindo para o avanço do conhecimento no meio científico, preenchendo algumas lacunas de compreensão, oferecendo recomendações para pesquisas futuras.

Deste modo, considerando a utilização de óleos essenciais como conservantes de alimentos, este artigo de revisão teve como objetivo demonstrar a efetividade e a

segurança do seu uso em matrizes alimentares. Aspectos como doenças transmitidas por alimentos, atividade antibacteriana e antioxidante e vantagens da encapsulação também foram discutidos.

2 METODOLOGIA

No presente estudo, foi realizada uma revisão bibliográfica utilizando as plataformas PubMed, Science Direct, Scopus e Scielo, como bases científicas. As palavras-chave utilizadas como descritores foram: “óleos essenciais”, “óleos essenciais de plantas medicinais”, “conservante de alimentos”, “antibacteriano”, “segurança de óleos essenciais em alimentos”. Foram selecionados artigos publicados no período de 2018 a 2023. Artigos de anos anteriores foram mantidos na base do artigo, uma vez que as informações relatadas foram consideradas importantes para a discussão geral.

2.1 Segurança de alimentos: a importância dos conservantes e os possíveis malefícios que podem causar

Doenças transmitidas por alimentos são ocasionadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados por microrganismos como bactérias, fungos, vírus ou parasitas, bem como agentes físicos ou produtos químicos (SHARIF *et al.*, 2018). Estas têm emergido como um crescente problema econômico e de saúde pública em todo o mundo (NELLURI; THOTA, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, todos os anos, aproximadamente 600 milhões de pessoas no mundo adoecem devido às doenças transmitidas por alimentos (WHO, 2015).

Vários estudos ao redor do mundo apontam que 66% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos são de origem bacteriana (BHALLA; SHEETAL, 2019). As principais espécies bacterianas que resultam em doenças transmitidas por alimentos incluem *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Staphylococcus aureus* (ÜNUVAR, 2018). Quando a pessoa ingere alimentos contaminados com toxinas produzidas pelas bactérias, resulta em intoxicação, já a infecção é quando ocorre a ingestão do alimento contendo o agente infeccioso (SHARIF *et al.*, 2018).

Não há como eliminar totalmente o risco de consumir alimentos contaminados, pois a contaminação pode ocorrer nas diversas etapas da cadeia produtiva, porém existem meios de prevenir a proliferação de microrganismos patogênicos e deteriorantes, como a utilização de substâncias conservantes que são adicionadas aos alimentos visando preservar sua qualidade e prolongar sua vida de prateleira (NELLURI; THOTA, 2018). Porém o uso exacerbado de conservantes pode gerar malefícios ao consumidor, Santos e Lourival alertam para o surgimento de possíveis efeitos adversos relacionados ao consumo de conservantes químicos sintéticos (SANTOS; LOURIVAL, 2018).

Em quantidades indiscriminadas, os conservantes podem causar os seguintes problemas de saúde: ácido benzóico (agravar a asma, são cancerígenos e neurotóxicos), dióxido de enxofre (ataques de asma, irritação gástrica, doenças de pele, anomalias fetais), ácido etilendiamino tetra-acético - EDTA (diarreia, vômito e distúrbios urinários), ácido fosfórico e ácido tartárico (redução da absorção de cálcio pelo organismo humano), sulfitos (alergias, irritação gástrica, crises de asma e urticária), nitritos e nitratos (induzir diabetes tipo 1, irritar o sistema digestivo) butilhidroxitolueno - BHT e terbutilhidroxianisol - BHA (cancerígeno, eczema e angioedema, irritação na pele, maiores quantidades de lipídios e colesterol na corrente sanguínea) (BENSID *et al.*, 2020).

Tendo em vista este fato, pesquisas relacionadas à utilização de conservantes naturais como os óleos essenciais vêm sendo realizadas visando a produção de produtos mais saudáveis, com o conceito clean label (MARUYAMA *et al.*, 2021).

2.2 Óleos essenciais e seu mecanismo de ação antimicrobiano e antioxidante

Óleos essenciais são líquidos aromáticos de baixa viscosidade, voláteis, compostos por mistura complexa de substâncias, derivados das plantas e podem ser extraídos das folhas, flores, frutos, sementes, cascas, galhos, raízes e caule (LIANG *et al.*, 2023).

A composição química do óleo essencial é resultante do metabolismo secundário das plantas decorrentes de fatores genéticos e de estímulos do ambiente como temperatura, luminosidade, sazonalidade, estágio de desenvolvimento, horário de coleta, nutrição, fator hídrico e técnica de extração (DHIFI *et al.*, 2016; MORAIS, 2009). De

acordo com a International Organization for Standardization (ISO) 9235:2021 item 3.11, óleos essenciais são produtos obtido a partir de matéria-prima natural de origem vegetal, por destilação a vapor, por processos mecânicos a partir do epicarpo de frutas cítricas ou por destilação a seco, após separação da fase aquosa – se houver – por processos físicos (ISO 9235:2021).

Estruturalmente, os constituintes químicos dos óleos essenciais podem ser classificados em quatro grupos: terpenos, terpenóides, fenilpropanóides e outros constituintes, estes compostos bioativos possuem uma ampla gama de atividades biológicas (anticancerígena, antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e antialérgica) (MASYITA *et al.*, 2022).

As atividades biológicas dos óleos essenciais estão relacionadas ao seu conteúdo de compostos fenólicos. A atividade antibacteriana está relacionada com a capacidade de penetração do óleo essencial na membrana bacteriana, onde as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis que as Gram-negativas, devido a composição da parede celular das mesmas, os óleos essenciais podem interagir com as bicamadas lipídicas e perturbar a funcionalidade da membrana plasmática (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021). Com a alteração da sua estrutura, podem ocorrer a formação de poros, alterando a carga elétrica e a polaridade, aumentando a permeabilidade, modificando a fluidez, deslocando as proteínas da membrana, inibindo a síntese de proteínas, DNA e RNA e de vias metabólicas, e ocasionando vazamentos de importantes conteúdos celulares (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021; FALLEH *et al.*, 2020). Na atividade antioxidante, essas substâncias atuam na prevenção da iniciação da cadeia oxidativa neutralizando os radicais livres, impedindo a continuidade do processo oxidativo, ou agindo na eliminação dos radicais livres (KYUNGMI; EBELER, 2008; RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2016).

2.3 Óleos essenciais como conservante em alimentos

Os óleos essenciais podem ser adicionados diretamente a matrizes alimentares, por meio de embalagens ativas produzidas a partir de polímeros biodegradáveis, em filmes comestíveis ou até mesmo na preservação de sementes. Efeito antifúngico de filme (fibra de casca de roma 2,77%, pectina 1,23%, álcool polivinílico 1,94%, glicerol, óleo essencial de cravo e tomilho em diferentes concentrações, 0,5, 1 e

2%) para revestimento no pós-colheita de manga, o filme foi eficaz contra *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gloeosporioides*, com uma porcentagem de inibição de 66% e 22%, respectivamente (NANDHAVATHY *et al.*, 2021).

Martins e colaboradores avaliaram o efeito da adição de óleo essencial de orégano em filmes de amido de arroz e sua aplicação como embalagem para filés de pescado. Os filés embalados com o filme ativo apresentaram um aumento na vida de prateleira tendo menos oxidação (1,65 mg malonaldeído/kg de amostra) e menor crescimento microbológico 10^7 UFC/g em 6 dias de armazenamento, os filés de peixe embalados em filme padrão sem adição de óleo essencial apresentaram maior oxidação (1,88 mg malonaldeído/kg de amostra) e maior crescimento microbológico 10^8 UFC/g (MARTINS *et al.*, 2020).

Controle de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho utilizando óleo essencial de gengibre, nas concentrações 0, 1, 2, 3, 4 e 5 %, onde nas doses de 1, 4 e 5% proporcionou menor porcentagem de incidência de *Fusarium verticillioides* (COSTA *et al.*, 2020). Óleo essencial de *Lippia turbinata* microencapsulado na preservação de sementes de amendoim apresentou efeito antifúngico significativo reduzindo entre 59 a 77% da sua micoflora (GIRARDI *et al.*, 2017).

Ação do óleo essencial de *Zingiber officinale* encapsulado em fibras proteicas ultrafinas adicionadas a embalagem visando o controle de *Listeria monocytogenes* em queijo. Após o terceiro dia de armazenamento, as contagens bacterianas *L. monocytogenes* diminuíram de 4,39 log UFC/g⁻¹ para 3,62 log UFC/g⁻¹ (SILVA *et al.*, 2018).

A adição de óleo essencial em filmes comestíveis para conservação de frutas e hortaliças beneficia o tempo de vida útil desses produtos (PERUMAL *et al.*, 2022). Outros estudos da aplicação de óleos essenciais livres, encapsulados, nanoemulsão em diferentes matrizes alimentares são relatados na Tabela 1.

Tabela 1. Aplicação de óleos essenciais livres ou encapsulados como antibacteriano em alimentos.

Planta	Componentes majoritários	Óleo essencial	Matriz alimentar	Microrganismo	Referência
<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol (71%), timol (3%), p-cimeno 3,5%, β -cariofileno (4%)	Livre	Queijo minas	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Campos <i>et al.</i> , 2022
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucaliptol (94%), α -pineno (2,93%), γ -terpineno (1,93%)	Nanoemulsão	Suco de fruta (orangina)	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> e <i>E. coli</i>	Boukhatem <i>et al.</i> , 2020
<i>Origanum vulgare</i> e <i>Cinnamomum</i>	-	Encapsulado	Salame	<i>L. monocytogenes</i>	Gottardo <i>et al.</i> , 2022
<i>Origanum vulgare</i> e <i>Thymus vulgaris</i>	Timol e carvacrol	Encapsulado	Pão	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	Rosa <i>et al.</i> , 2020
<i>Salvia officinalis</i>	Epirosmanol (20%), viridiflorol (18%), cânfora (13%), α -tujona (10%)	Livre	Linguica suina fresca	<i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Šojić <i>et al.</i> 2018
Citrus essential oils (orange, mandarin, grapefruit, and lemon)	-	Nanoemulsão	Filés de peixe (Truta arco-íris)	bactérias mesófilas, psicrófilas e coliformes	Durmus, 2019

Fonte: Elaborada pelas autoras, 2023.

2.4 Encapsulação dos óleos essenciais para estabilização dos compostos ativos

Embora os óleos essenciais tenham se apresentado como alternativa aos aditivos químicos sintéticos, eles ainda apresentam limitações (baixa solubilidade, alta volatilidade, odor e sabor intenso) quanto a sua aplicação direta em alimentos (FALLEH *et al.*, 2020). Para evitar esses inconvenientes técnicas como a encapsulação podem ser aplicadas. Existem diversas técnicas de encapsulação: extrusão, liofilização, fluidização, remoção de solvente, *spray drying*, coacervação, gelificação iônica, lipossomas, emulsificação (REIS *et al.*, 2022). A técnica de encapsulação consiste em envolver uma substância por uma parede de revestimento, promovendo a proteção contra condições adversas e liberação controlada da substância (EGHBAL *et al.*, 2022).

Estudos demonstram a encapsulação como eficaz aumentando a estabilidade física das substâncias ativas dos óleos essenciais, minimizando os possíveis efeitos deletérios, protegendo-os das interações com os ingredientes alimentares (REIS *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2021).

Melo *et al.*, (2020), avaliaram a efetividade da adição do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (na concentração de 0,25%) encapsulado com goma arábica e maltodextrina em diferentes proporções (goma arábica + maltodextrina (3:1); e goma arábica + maltodextrina (1:1) pela técnica de *spray drying* em queijo coalho contra coliformes e *Staphylococcus aureus* coagulase negativa durante o armazenamento de 21 dias. No 21 dia de armazenamento o óleo essencial encapsulado apresentou maior redução na contagem *S. aureus* ($0 \log \text{ UFC/ml}^{-1}$) quando comparado ao queijo com adição do óleo livre ($6 \log \text{ UFC/ml}^{-1}$) e a amostra controle ($7 \log \text{ UFC/ml}^{-1}$).

Na avaliação do efeito de óleo essencial de *Thymus capitatus* em leite contaminado por *Staphylococcus aureus* (24 horas de inoculação), o crescimento bacteriano atingiu $202 \times 10^3 \text{ UFC/ml}$ na presença do óleo essencial livre, enquanto para o óleo encapsulado por nanoemulsão (70% óleo essencial de *T. capitatus* + 30% óleo de soja) $132 \times 10^3 \text{ UFC/ml}$ (JEMAA *et al.*, 2017).

Nanoencapsulação de óleo essencial de tomilho em nanofibras de quitosana-gelatina por eletrofiação sem bico e sua aplicação para redução de nitrito em linguças. As nanofibras foram preparadas por gelatina/quitosana nas proporções de 1:6, 1:8 e 1:10 e concentrações de tomilho de 20 e 40%. Foi inoculado 10^5 UFC/gr da bactéria *Clostridium perfringens* em embutidos e analisou-se o número de colônias após 0, 2, 8 e

20 dias de armazenamento, após 8 dias, o número de colônias chegou a 0 para nanofibras contendo óleo essencial na concentração de 40%, enquanto a linguiça contendo nanofibras sem óleo essencial não apresentou alteração significativa no número de colônias ($P > 0,05$). Os resultados indicaram que óleo de tomilho encapsulado teve efeito bactericida contra *C. perfringens*, não teve impacto adverso significativo na cor e nas propriedades sensoriais das salsichas em comparação com a amostra contendo 120 ppm de nitrito (VAFANIA *et al.*, 2019).

Radunz *et al.*, (2020) avaliaram o efeito da adição de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) encapsulado com caseína e maltodextrina em hambúrgueres de carne bovina, o óleo encapsulado apresentou redução de coliformes termotolerantes e *E. coli* de 23 MPN/g no primeiro dia, para 15 MPN/g coliformes termotolerantes e 0 MPN/g *E. coli* no décimo quarto dia, tal fato pode estar relacionado a liberação controlada dos ativos pela encapsulação que foi ocorrendo durante o período de armazenamento, agindo sobre microrganismos (RADUNZ *et al.*, 2020).

2.5 Segurança da utilização dos óleos essenciais como aditivos em alimentos

A maioria dos óleos essenciais de plantas medicinais e especiarias são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) para utilização em alimentos pelo FDA (Food and Drug administration), segundo lista disponibilizada no Código de Regulamentação Federal, Título 21 - número 182.20 (Food and Drug administration/CRF21, 2016). Na Tabela 2 estão dispostos os óleos essenciais geralmente reconhecidos como seguros pelo FDA.

O Painel de Especialistas da Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA) tem operado desde 1960 na avaliação de ingredientes aromatizantes para uso em alimentos e bebidas nos Estados Unidos (COHEN *et al.*, 2021). A International Organization of the Flavor Industry (IOFI), é uma associação que agrega associações regionais e nacionais da indústria de aromas globalmente, entre as quais incluem-se: Austrália, Brasil, Canadá, Colômbia, Indonésia, Japão, México, África, Singapura, África do Sul e Estados Unidos, além da associação regional de aromas da Europa. Esta associação criou o código de boas práticas que dispõe sobre a utilização de óleos essenciais como aromatizantes naturais em alimentos (IOFI, 2010).

Na França a Direção Geral de Concorrência, Consumo e Repressão à Fraude (DGCCRF) emitiu uma lista de OEs, cujo uso é considerado tradicional na alimentação

humana (DGCCRF, 2019). No Brasil os óleos essenciais podem ser adicionados aos alimentos como aditivos aromatizantes segundo a RDC N° 725, DE 1° julho de 2022 (óleo essencial: aromatizante natural volátil de origem vegetal obtido por processo de destilação por arraste com vapor de água, de destilação a pressão reduzida ou por outro processo físico adequado, podendo se apresentar isolado ou misturado com outro óleo essencial, compreendendo o retificado, o desterpenado e o concentrado) (ANVISA, 2022).

Embora sejam GRAS os óleos essenciais não podem ser considerados inócuos, pois são compostos naturais derivados do metabolismo secundário das plantas, sendo afetado por fatores extrínsecos e intrínsecos bem como a parte da planta utilizada para extração, desta forma podem ocorrer variações em sua composição química, podendo conter substâncias que promovam a toxicidade dependendo da sensibilidade do organismo e da quantidade ingerida (TAMBURLIN *et al.*, 2021). De acordo com EFSA (2012), os terpenóides e cetonas podem estar associados a neurotoxicidade e propriedades abortivas, fenóis com toxicidade hepática, monoterpénóides associados com toxicidade renal, derivados de pineno, aumentam o risco de desregulação endócrina e as furocumarinas com propriedades fototóxicas (EFSA, 2012).

As informações sobre a dosagem segura dos óleos essenciais para consumo humano são escassas. Tamburlin *et al.*, (2021) avaliaram a segurança toxicológica de óleos essenciais usados como suplementos alimentares para estabelecer doses orais seguras recomendadas, chegando à conclusão de que uma dose óleo essencial é considerada segura quando a margem de segurança (razão entre valor de referência toxicológica e exposição sistêmica) para todos os constituintes é pelo menos igual a 1 (TAMBURLIN *et al.*, 2021).

Cohen *et al.*, (2018) apresentaram o procedimento revisado para a avaliação de segurança de complexos de sabor natural usados como ingredientes em alimentos, o estudo é uma atualização da publicação de Smith *et al.*, (2005) neste procedimento, informações relacionadas à ingestão estimada, metabolismo e toxicologia dos complexos aromatizantes naturais e seus grupos congêneres constituintes são sistematicamente analisadas em 14 etapas (COHEN *et al.*, 2018; COHEN *et al.*, 2021).

Cohen *et al.*, (2019) avaliaram a toxicidade oral do óleo de laranja doce em ratos Sprague Dawley machos e fêmeas, os animais receberam doses de 0 (veículo), 240, 600 e 1500 mg/kg pc/dia de óleo de laranja doce em metilcelulose via gavagem por 28

dias, nível de efeito adverso não observado (NOAEL) para o óleo de laranja doce em ratos é de 600 mg/kg pc/dia (COHEN *et al.*, 2019).

No estudo de Cohen (2021), o óleo essencial de *Origanum vulgare* (56% carvacrol, 5% timol, 15% p-cimeno, 4% de γ -terpineno com outros constituintes terpenóides menores) foi administrado a ratos Wistar, os níveis de óleo de orégano administrados foram 0 (gelatina neutra), 1.000, 2.000 ou 4.000 mg/kg de ração fornecendo uma dose de 0, 50, 100 ou 200 mg/kg de peso corporal por dia, não houve mortalidade e nenhuma observação clínica anormal durante o período do estudo, os autores do estudo determinaram um NOAEL (nenhum nível de efeito adverso observado) de 200 mg/kg de peso corporal por dia de óleo de orégano em ratos.

Tabela 2. Óleos essenciais GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) pelo FDA (Food and Drug administration)

Nome Popular	Nome científico
Manjeriçã	<i>Ocimum basilicum</i>
Bergamota	<i>Citrus bergamia</i>
Pimenta do reino	<i>Piper nigrum</i>
Canela aromática	<i>Cinnamomum cassia</i>
Canela da Índia	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
Sálvia	<i>Salvia sclarea</i>
Cravo da Índia	<i>Eugenia caryophyllata</i>
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>
Cominho	<i>Cuminum cyminum</i>
Funcho	<i>Foeniculum vulgare</i>
Malva	<i>Pelargonium graveolens</i>
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>
Toranja	<i>Citrus x paradisi</i>

Zimbro Comum	<i>Juniperus communis</i>
Limão	<i>Citrus limon</i>
Capim Limão	<i>Cymbopogon flexuosus</i>
Manjerona	<i>Origanum majorana</i>
Erva Cidreira	<i>Melissa officinalis</i>
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>
Hortelã Pimenta	<i>Mentha piperita</i>
Laranja Azeda	<i>Citrus aurantium</i>
Camomila	<i>Anthemis nobilis</i>
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Menta	<i>Mentha spicata</i>
Tangerina	<i>Citrus reticulata</i>
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>
Laranja doce	<i>Citrus sinensis</i>
Ylang Ylang	<i>Cananga odorata</i>

Fonte: Food and Drug administration, 2016.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais possuem atividades antibacteriana, antifúngica e antioxidante, características importantes na preservação de alimentos. A utilização dos óleos essenciais de plantas medicinais e condimentares como conservantes em alimentos demonstram resultados promissores. No entanto, embora os óleos essenciais tenham se apresentado como alternativa aos aditivos químicos sintéticos, eles ainda apresentam limitações quanto à segurança e estabilidade.

Essa pesquisa demonstrou que a instabilidade dos óleos essenciais pode ser corrigida pela técnica de encapsulação e que a maioria dos óleos essenciais de plantas medicinais e especiarias são geralmente reconhecidos como seguros para utilização em alimentos, contudo não podem ser considerados inócuos, pois são compostos naturais derivados do metabolismo secundário das plantas, podendo sofrer variações na sua composição, e conter substâncias que promovam a toxicidade.

O estudo em questão contribui para o esclarecimento de que não são todos os óleos essenciais que podem ser ingeridos e mesmo os reconhecidos como seguros devem ser utilizados com cautela, pois podem ocasionar intoxicação dependendo da dose utilizada e da suscetibilidade do organismo.

Esta pesquisa apresentou como limitação a escassez de artigos científicos abordando sobre a segurança da ingestão dos óleos essenciais e sua dose usual recomendada. Sugere-se novas explorações sobre a temática, com informações mais detalhadas sobre os possíveis efeitos tóxicos dos óleos essenciais quando ingeridos, bem como sua viabilidade e utilização em escala industrial.

4 AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense – UNIPAR e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil CAPES - finance code 001 pela bolsa e apoio financeiro.

5 REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F.J. *et al.* Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**. v. 90, set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>

ANVISA. **RDC Nº 725, DE 1º julho de 2022**. Dispõe sobre os aditivos alimentares aromatizantes. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-725-de-1-de-julho-de-2022-413249198>, acesso em: 18 jun. 2023.

BHALLA, T.C., SHEETAL, M.S. 2019. Chapter 12 - International Laws and Food-Borne Illness. In: **Food Safety and Human Health**. p. 319-371, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816333-7.00012-6>

BENSID, A. *et al.* Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food – a review. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**. v. 62, n. 11, p. 2985- 3001, dez. 2020. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1862046>

BOUKHATEM, M.N. *et al.* *Eucalyptus globulus* Essential Oil as a Natural Food Preservative: Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Properties *In Vitro* and in a Real Food Matrix (Orangina Fruit Juice)" **Applied Sciences**. v.10, n. 16, ago. 2020. <https://doi.org/10.3390/app10165581>

CAMPOS, A. C. L. P. *et al.* Antimicrobial effect of *Origanum vulgare* (L.) essential oil as an alternative for conventional additives in the Minas cheese manufacture. **LWT**. v. 157, mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113063>

COHEN, S. M. *et al.* Updated procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food. **Food and Chemical Toxicology**. v.113, p.171-178, mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.021>

COHEN, S. M. *et al.* FEMA GRAS assessment of natural flavor complexes: Citrus-derived flavoring ingredients. **Food and Chemical Toxicology**. v. 124, p. 192-218, fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.052>

COHEN, S. M. *et al.* FEMA GRAS assessment of natural flavor complexes: Origanum oil, thyme oil and related phenol derivative-containing flavoring ingredients. **Food and Chemical Toxicology**. v.155, set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112378>

COSTA, M. L. N., GONCALVES, D. S. F., MACHADO, J. C. 2020. Controle de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho com o óleo essencial de gengibre. **Summa Phytopathologica**. v. 46, n.3, p.250-254, set-dez. 2022. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/233888>

CHRISTAKI, Stamatia, MOSCHAKIS, Thomas, KYRIAKOUDI, Anastasia, BILIADERIS, Costas G., MOURTZINOS, Ioannis Mourtzinos. Recent advances in plant essential oils and extracts: Delivery systems and potential uses as preservatives and antioxidants in cheese. **Trends in Food Science & Technology**. v.116, p. 264-278, out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.029>.

DGCCRF 2019. **Huiles Essentielles**. Recommandations sanitaires pour l'emploi d'huiles essentielles dans les compléments alimentaires (em francês). Disponível em https://www.economie.gouv.fr/files/files/directions_services/dgccrf/securite/produits_alimentaires/Complement_alimentaire/CA_RS_HE_janvier2019.pdf. Acesso em 20 junho de 2023.

DHIFI, W. B. S. *et al.* Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**. v.3, n. 4, set. 2016. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>

DURMUS, M. The effects of nanoemulsions based on citrus essential oils (orange, mandarin, grapefruit, and lemon) on the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets at $4 \pm 2^\circ\text{C}$. **Journal of food safety**. v. 40, n.1, fev. 2020. <https://doi.org/10.1111/jfs.12718>

EGHBAL, N., VITON, C., GHARSALLAOUI, A. 2022. Nano and microencapsulation of bacteriocins for food applications: A review. **Food Bioscience**. v.50, dez. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102173>

EFSA 2012. **Scientific report of EFSA**. Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2663>. Acesso em: 20 julho 2023.

FALLEH, H. *et al.* Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**. v. 330, nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>

FAO (Food and Agriculture Organization). **Food safety, everyone's business**. A Guide to World Food Safety Day 07/06/2019. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&slug=world-food-safety-day-2019-guide&Itemid=270&lang=en. Acesso em: 10 julho 2023.

FDA (Food and Drug Administration) (2016). **Code of federal regulations (CFR). Title 21**. Substances generally recognized as safe (GRAS) subpart §182.20 Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>. Acesso em: 20 julho 2023.

FREDERICO, C. *et al.* Antibacterial potential of essential oils from medicinal plants for food preservation: a review. **Medical Plant Communications**. v.4, n.1, p.14-22, maio 2021. <https://doi.org/10.37360/mpc.21.4.1.02>

GIRARDI, S. N. *et al.* 2017. Microencapsulation of *Lippia turbinata* essential oil and its impact on peanut seed quality preservation. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.116, p. 227-233, jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.003>

GOTTARDO, F.M. *et al.* Microencapsulated oregano and cinnamon essential oils as a natural alternative to reduce *Listeria monocytogenes* in Italian salami. **Food Bioscience**. v.50, Part B, dez. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102146>

IOFI- International Organization of the Flavor Industry. **Code of practice- IOFI 2010**. Disponível em: http://www.abifra.org.br/base_iofi.pdf. Acesso em: 28 junho 2023.

ISO 9235:2021. **Aromatic natural raw materials** – Vocabulary. International Organization for Standardization: Genebra, 2021. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/es/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:e>. Acesso em: 28 junho 2023.

JACKSON-DAVIS, A. *et al.* A Review of Regulatory Standards and Advances in Essential Oils as Antimicrobials in Foods. **Journal of Food Protection**. v. 86, n. 2, fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2022.100025>

JEMAA, M. B. *et al.* Quality preservation of deliberately contaminated milk using thyme free and nanoemulsified essential oils. **Food Chemistry**. v.217, p.726-734, fev. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.030>

KYUNGMI, M., EBELER, E.S. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 1, p. 96-104, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.002>

LIANG, J., *et al.* Essential oils: Chemical constituents, potential neuropharmacological effects and aromatherapy - A review. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**. v.6, mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100210>

MARUYAMA, S., STRELETSKAYA, N. A., LIM, J. Clean label: Why this ingredient but not that one?. **Food Quality and Preference**. v. 87, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104062>

MARTINS, P.C. *et al.* Oregano essential oil addition in rice starch films and its effects on the chilled fish storage. **Journal of Food Science and Technology**. v.58, p.1562–1573, ago. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04668-z>

MASYITA, A. *et al.* Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food Chemistry X**. v. 13, jan. 2022. [10.1016/j.fochx.2022.100217](https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217)

MELO, A. B. *et al.* 2020. Microencapsulated lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) essential oil: A new source of natural additive applied to Coalho cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 44, n.10, jun. 2020. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14783>

MORAIS, L. A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 2, p. 4050-4063, ago. 2009. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/577686>.

NANDHAVATHY, G. *et al.* Determination of antifungal activities of essential oils incorporated-pomegranate peel fibers reinforced-polyvinyl alcohol biocomposite film against mango postharvest pathogens. **Materials Today: Proceedings**. v.38, n. 2, p.923-927, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.384>

NELLURI, D., THOTA, N. S. Challenges in Emerging Food-Borne Diseases. **Food Safety and Preservation**. Cap. 9, p. 231-268, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814956-0.00009-3>

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). **PANAFTOSA alerta que doenças transmitidas por alimentos podem ser evitadas com ações preventivas do campo à**

mesa. 07/06/2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/7-6-2022-panaftosa-alerta-que-doencas-transmitidas-por-alimentos-podem-ser-evitadas-com>. Acesso em: 14 julho 2023.

PERUMAL, A. B. *et al.* 2022. Application of essential oils in packaging films for the preservation of fruits and vegetables: A review. **Food Chemistry**. v. 375, maio 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131810>

RADUNZ, M. *et al.* Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 330, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108696>

RAHAL, I. L. *et al.* Determinação do rendimento do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. em função da variação sazonal. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. Umuarama. v. 26, n. 3, p. 1099-1110, set./dez. 2022. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v26i3.2022.8994>

REIS, D. R. *et al.* Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. **Future Foods**. v. 5, jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100126>

RODRIGUEZ-GARCIA, I. *et al.* Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**. v.26, n. 56, p. 1717-2177, jul. 2026. doi: 10.1080/10408398.2013.800832.

ROSA, C. G. *et al.* Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**. v.99, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105339>

SANTOS, P.S., LOURIVAL, N.B.S. Consumo de compostos químicos oriundos de embutidos e sua correlação com o desenvolvimento do câncer: uma revisão. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**. v. 34, n. 67, p. 73-83, jul-dez. 2018. Disponível em: <http://periodicos.unifil.br/index.php/Revistateste/article/view/970>. Acesso em: 20 julho 2023.

SILVA, F.T. *et al.* Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.118, p. 107-115, out. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.079>

SHARIF, M. K. *et al.* Chapter 15 - Foodborne Illness: Threats and Control. In: **Foodborne Diseases**. Academic Press. p. 501-523, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00015-4>

ŠOJIC, B. *et al.* The effect of essential oil and extract from sage (*Salvia officinalis* L.) herbal dust (food industry by-product) on the oxidative and microbiological stability of fresh pork sausages. **LWT**. v. 89, p. 749-755, mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.055>

SMITH, S.M. *et al.* A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43, n.3, p. 345-363, mar. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.007>

TAMBURLIN, I. S. *et al.* Toxicological safety assessment of essential oils used as food supplements to establish safe oral recommended doses. **Food and Chemical Toxicology**. v. 157, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112603>

ÜNUVAR, S. Chapter 1 - Microbial Foodborne Diseases. In: **Foodborne Diseases**. Academic Press. Pages 1-31, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00001-4>

VAFANIA, B. *et al.* Nanoencapsulation of thyme essential oil in chitosan-gelatin nanofibers by nozzle-less electrospinning and their application to reduce nitrite in sausages. **Food and Bioproducts Processing**. v. 116, p. 240-248, jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.06.001>

WHO - World Health Organization. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007- 2015. **Who estimates of the global burden of foodborne diseases**. 2015. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=. Acesso em: 10 agosto 2023.

ZHU, Y. *et al.* Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. **Food Control**. v.123, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107856>

CAPÍTULO II

Potencial antibacteriano de óleos essenciais de plantas medicinais para conservação de alimentos: Breve revisão

Artigo de revisão publicado na revista Medicinal Plant Communications. v. 4, n. 1, p. 14-22, maio de 2021. DOI: <https://doi.org/10.37360/mpc.21.4.1.02>.

RESUMO: Os óleos essenciais também chamados de óleos voláteis ou etéreos são compostos presentes naturalmente nas plantas. Diversas plantas medicinais são fontes para extração de óleos essenciais e diferentes metabólitos secundários são produzidos como terpenóides, compostos alcoólicos, aldeídos, corpos cetônicos, fenóis. A utilização de óleos essenciais como substitutos de conservantes sintéticos em alimentos vem ganhando cada vez mais espaço nas pesquisas devido ao interesse da população em ingerir produtos mais saudáveis, e também da indústria, que busca atender às necessidades de seus consumidores visando produzir alimentos com menos aditivos artificiais, mas garantindo a preservação das características organolépticas e vida de prateleira. Esta revisão tem como objetivo fornecer informações sobre a atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas medicinais e sua utilização como conservantes de alimentos.

Palavras-chave: Patógenos alimentares. Conservantes. Doenças transmitidas por alimentos. Óleos voláteis.

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos patogênicos e deteriorantes estão presentes naturalmente no ambiente e podem contaminar os alimentos nas diversas etapas da cadeia de produção, como durante a colheita, abate, processamento e acondicionamento (HATA *et al.*, 2016). As perdas de alimentos no mundo podem atingir 40% ao ano, devido a vários fatores, incluindo a deterioração causada por microrganismos (GUSTAVSSON *et al.*, 2011). A deterioração microbiana pode ser causada por bactérias, bolores e leveduras (LIANOU *et al.*, 2016), pois utilizam os nutrientes disponíveis e produzem metabólitos, que afetam amplamente as características sensoriais e nutricionais dos alimentos (PARLAPANI *et al.*, 2017).

Os microrganismos patogênicos contaminantes no processamento dos alimentos podem produzir toxinas, que causam efeitos nocivos na saúde humana (CHEN *et al.*, 2020). Os alimentos de origem animal foram relatados como os principais veiculadores de patógenos alimentares, sendo ovos e produtos derivados, carne suína,

carne de aves, peixe e produtos derivados, leite e produtos lácteos, carne bovina e crustáceos (EFSA, 2015). As principais bactérias associadas às doenças transmitidas por alimentos são *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Staphylococcus aureus* (BINTSIS, 2017).

Doenças transmitidas por alimentos são causadas pelo consumo de alimentos contaminados por microrganismos, é um desafio para a segurança de alimentos e para a saúde pública. Anualmente, cerca de 600 milhões de pessoas no mundo adoecem e 420 mil morrem por ingerir alimentos contaminados, principalmente por bactérias (FAO, 2019). Essas doenças prejudicam o desenvolvimento socioeconômico, sobrecarregando os sistemas de saúde, bem como a economia mundial e o comércio (FAO, 2019). Estimativas indicam que o impacto de alimentos não seguros geram perdas na produtividade em torno de US\$ 95 bilhões por ano nas economias de baixa e média renda (FAO, 2019).

A resistência a antibióticos dentro da produção de alimentos é uma preocupação para a saúde pública, visto que o uso indiscriminado em tratamento na saúde humana e de animais se tornaram uma importante influência quanto ao surgimento e persistência de cepas resistentes. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, cerca de 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias multirresistentes (MDR) anualmente, atingindo em média 23.000 mortes (CHENG *et al.*, 2019). Devido a estes fatores, a utilização de compostos naturais obtidos a partir de plantas aromáticas e medicinais tornou-se uma alternativa ao controle de patógenos alimentares, podendo ser utilizados como conservantes garantindo assim a qualidade dos alimentos (GEBREYES *et al.*, 2017).

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, conservantes podem ser considerados como aditivos, ou seja, todo e qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem (BRASIL, 1997). Os conservantes antimicrobianos sintéticos são utilizados com a finalidade de ampliar o tempo de vida útil dos alimentos, porém estes podem causar efeitos tóxicos nos indivíduos expostos através do consumo de alimentos, dependendo da quantidade ingerida e da susceptibilidade do organismo humano (SANTOS;

LOURIVAL, 2019). Quando em quantidades indiscriminadas, os conservantes podem ocasionar os seguintes problemas de saúde: ácido benzoico (asma), ácido sórbico (urticária, asma e alergia), dióxido de enxofre (efeitos toxicológicos e problemas respiratórios), sulfitos (alergias, hipotensão, náusea, irritação gástrica, hiperatividade, diarreia, ataques asmáticos e urticária), nitritos e nitratos (desencadeia a metahemoglobinemia que além de ser cancerígena pode provocar o aumento da pressão arterial, doenças cardíacas, ação vasodilatadora, cefaleia e desconforto gastrointestinal) (CONTE, 2016; BENSID *et al.*, 2020).

Tendo em vista a ocorrência de resistência antibacteriana e de possíveis doenças ocasionadas pela utilização de conservantes sintéticos, estudos com a adição de substâncias naturais como os óleos essenciais em alimentos vêm sendo desenvolvidos. Os óleos essenciais também chamados de óleos voláteis ou etéreos são compostos presentes naturalmente em plantas e exercem funções relacionadas aos seus mecanismos de defesa. O teor de óleo essencial na planta pode estar associado a diversos fatores como: temperatura, luminosidade, sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta, horário da colheita e nutrição da planta. São líquidos aromáticos oleosos, caracterizados pelo sabor e odor intenso, e podem ser obtidos de material vegetal como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, madeira, frutos e raízes (MORAIS, 2009; DHIFI *et al.*, 2016).

A utilização de óleos essenciais como substituto de conservantes sintéticos em alimentos é de grande interesse da indústria, que busca atender as necessidades de seus consumidores, visando a produção de alimentos com menos aditivos artificiais, mas que garantam a manutenção das características sensoriais e segurança do produto (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Este artigo de revisão é focado na atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas medicinais e sua utilização como conservantes de alimentos. Aspectos como composição química, atividades antibacterianas como aplicação atual de óleo essencial de plantas medicinais em matrizes alimentares foram discutidos.

2 METODOLOGIA

No presente estudo, foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa utilizando as plataformas Science Direct, Scopus e Scielo como bases de dados científicos. As palavras-chave utilizadas como descritores foram: “óleos essenciais”, “óleo essencial de plantas medicinais”, “conservante de alimentos”, “antibacteriano”. Foram selecionados artigos publicados no período de 2018 a 2021. Os artigos de anos anteriores foram mantidos na base do artigo quando as informações relatadas fossem consideradas de importância para a discussão geral.

2.1 Composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas medicinais

Óleos essenciais são constituídos por mistura complexa de substâncias polares e apolares (RAUT; KARUPPAYIL, 2014), a qual diferentes metabólitos secundários podem estar presentes como terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), compostos aromáticos (aldeído, álcool, fenol, derivado do metoxi), e terpenóides (isoprenóides) (BAKKALI *et al.*, 2008). Óleos essenciais têm mostrado ação antibacteriana promissora contra diversas espécies microbianas (RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2018). A Tabela 1 compila os óleos essenciais de algumas espécies de plantas medicinais, compostos químicos majoritários e a concentração mínima inibitória (MIC) frente às principais bactérias patogênicas de interesse em alimentos. Os compostos químicos constituintes dos óleos essenciais podem variar conforme a espécie vegetal e a parte da planta utilizada para extração como galhos, folhas, flores, sementes, rizomas e frutos (EDRIS, 2007). Além disso, a composição química pode sofrer variações conforme as condições climáticas, época da colheita, região geográfica, método de cultivo, solo e estágio de maturação (RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2018; DHIFI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2020), e todos esses fatores podem influenciar na atividade antibacteriana.

O mecanismo de ação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais não foi ainda completamente esclarecido (CALO *et al.*, 2015). Geralmente as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas (NAZZARO *et al.*, 2013), pois a complexidade da constituição da parede celular, como a

presença de lipopolissacarídeo, dificultam a penetração do óleo essencial na célula (NAZZARO *et al.* (2013). Por serem constituídos por várias biomoléculas, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais não pode ser confirmada com base em um único modo de ação (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). A ação pode ser atribuída à capacidade de penetrar as membranas das bactérias para o interior da célula e inibir as propriedades do funcionamento da célula (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012).

A ação antibacteriana dos óleos essenciais pode estar ligada à presença de compostos fenólicos majoritários, como por exemplo, o timol, carvacrol e eugenol, todavia estudos demonstraram que outros compostos presentes em quantidades menores que agem em sinergismo, alterando a permeabilidade da membrana celular bacteriana ocasionando a morte (ADELAKUN; OYELADE; OLANIPEKUN, 2016; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010). O óleo essencial de orégano, que possui como majoritários carvacrol e p-cimeno, podem causar danos irreversíveis à membrana celular de MRSA *S. aureus*, inibir a via do ciclo do ácido tricarbóxico e suas principais enzimas, bem como inibir a expressão do gene *pvl*; além disso, o composto majoritário carvacrol pode formar quimera com DNA (CUI *et al.*, 2019). O óleo essencial de gengibre, que possui como majoritários zingibereno e α -curcumina, pode inibir a expressão de alguns genes ligados ao metabolismo energético, ciclo do ácido tricarbóxico, proteínas relacionadas à membrana celular e metabolismo do DNA em *E. coli* e *S.aureus* (WANG *et al.*, 2020).

Estudos relacionaram a ação conjunta dos compostos carvacrol e o timol na desintegração da membrana externa presente na parede de bactérias Gram-negativas, liberando os lipopolissacarídeos (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP (LAMBERT *et al.*, 2001; HELANDER *et al.*, 1998; BURT, 2004). O eugenol promove a degradação da parede celular e lise celular (THOROSKI *et al.*, 1989). O p-cimeno, precursor do carvacrol, apresenta alta afinidade para as membranas dos microrganismos devido o anel benzênico na estrutura química, que pode perturbar o potencial de membrana da célula e provoca o inchaço da membrana citoplasmática (ULTEE *et al.*, 2002). O Terpinen-4-ol promove a inibição da respiração oxidativa, induzindo a deformação da membrana, ocasionando mudanças na permeabilidade da membrana (COX *et al.*, 2000).

Tabela 1. Composição química e concentração inibitória mínima (MIC) (mg/mL) de óleos essenciais de algumas espécies de plantas medicinais *in vitro* em bactérias patogênicas de interesse em alimentos.

Planta	Componente Majoritário	Bactéria e MIC	Referência
<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol (64,86%), ρ -cimeno (8.354%)	<i>Staphylococcus aureus</i> - MRSA (0.4)	Cui <i>et al.</i> (2019)
<i>Cinnamomum camphora</i> (Linn.)	Linalol (26.6%), eucaliptol (16.8%), α -terpineol (8.7%), β -isoborneol (8.1%), felandreno (5.1%), e cânfora (5.0%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (1.6), <i>Bacillus subtilis</i> (1.6), <i>Enterococcus faecalis</i> (1.6), <i>Escherichia coli</i> (3.2), <i>Salmonella gallinarum</i> (1.6)	Chen <i>et al.</i> (2020)
<i>Psidium cattleianum</i> (leaves)	β -cariofileno (14.7%), 1,8-cineol (11.7%) e γ -muuroleno (5.6%)	<i>Bacillus cereus</i> (1.40), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1.40), <i>Staphylococcus aureus</i> (2.10), <i>Salmonella entérica</i> (5.62)	Salvoldi <i>et al.</i> (2020)
<i>Myrcianthes pungens</i> (leaf)	β -cariofileno (11.7%) e 1,8-cineol (10.1%). A melhor proteção antioxidante foi de 57,5 a 63,3% de β -caroteno	<i>Staphylococcus aureus</i> (0.078), <i>Bacillus cereus</i> (0.42)	Jesus <i>et al.</i> (2021)
<i>Baccharis coridifolia</i>	germacreno-D (23.7%), biciclogermacreno (17.1%), e (E)-cariofileno (8.4%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (0.51), <i>Staphylococcus aureus</i> (0,128)	Freitas <i>et al.</i> (2020)
<i>Cinnamom cassia</i>	E-cinamaldeído (76.54%)	<i>Listeria monocytogenes</i> (0.1)	Somrani <i>et al.</i> (2020)
<i>Zingiber officinale</i>	Zingibereno (35.65%), α -Curcumeno (12.04%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (1.0)	Wang <i>et al.</i> (2020)

<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	1,8-cineol (17.16 %) e α -pineno (16.95 %)	<i>Staphylococcus aureus</i> (0.06)	Mohammed <i>et al.</i> (2020)
<i>Litsea cubeba</i>	β -Citral (39.25%), Citral (30.89%) e Limoneno (8.28%)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (0.5)	Dai <i>et al.</i> (2021)
<i>Laurus nobilis</i> L. (leaves)	1.8-cineol (41.1%), sabineno (6.96%), α -pineno (5.94%), humuleno epóxido II (5.73 %), e α -terpineol acetato (5.72 %)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (0.75), <i>Staphylococcus aureus</i> (0.75), <i>Listeria monocytogenes</i> (0.37), <i>Bacillus cereus</i> (0.75)	Tomar <i>et al.</i> (2020)
<i>Syzygium aromaticum</i> , L.	Eugenol (56.06%), cariofileno (39.63%) e α -cariofileno (4.31%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (0.30), <i>Escherichia coli</i> (0.30), <i>Listeria monocytogenes</i> (0.30), <i>Salmonella Typhimurium</i> (0.30)	Radünz <i>et al.</i> (2019)
<i>Satureja khuzestanica</i>	carvacrol (87.16%) e <i>p</i> -cimeno (6.39%)	<i>Escherichia coli</i> (0.25), <i>Staphylococcus aureus</i> (0.25), <i>Salmonella enterica</i> (0.25)	Mazarei; Rafati (2019)

Fonte: Autoria própria

2.2 Aplicações de óleos essenciais de plantas medicinais em alimentos

Os óleos essenciais apresentam crescente interesse devido às demandas da população por alimentos naturais. Diversos estudos com a aplicação de óleos essenciais de plantas medicinais são relatados na Tabela 2, visando o controle de bactérias patogênicas em diferentes matrizes alimentícias. Óleo essencial de *Litsea cubeba* foi testado em sucos de cabaço amargo, pepino, cenoura e espinafre a 4 °C (temperatura de armazenamento comum para sucos frescos) e na concentração do MIC (0,5 mg/mL), a contagem viável de EHEC O157:H7 em quatro amostras diminuiu acima de 99% após 4 dias de armazenamento (DAI *et al.*, 2021). Radünz *et al.* (2019) mostrou que o óleo

essencial de cravo inibiu o crescimento de *S. aureus* em hambúrguer de carne mais eficiente que o conservante nitrito. Šojić *et al.* (2018) mostraram que a adição de 0,1 µL/g de óleo de *Sálvia officinalis* é essencial para a redução de 7,66 log UFC/g (controle) para 7,0 log/UFC g de contagem mesofílica total após 8 dias de armazenamento. Ksouda *et al.* (2019) relataram que a presença de 3% de óleo essencial de *Pimpinella saxifraga* na cobertura de queijo reduziu a proliferação de bactérias mesófilas de 5,44 para 4,03 log UFC/g no dia 7 de armazenamento refrigerado. Sahin *et al.* (20,27 ± 7,26 mm contra *S. aureus* 49,27 ± 7,26 mm contra *S. aureus*, 44,13 4,16 mm) (20,27 ± 7,26 mm) contra *L. monocytogenes*, 39,55 ± 0,52mm contra *E. coli*, e 38,09 ± 4,15mm contra *M. luteus*. A cromatografia realizada pelos autores apresentou timol, carvacrol, cariofileno, 1,8-cineol, 2 acetil-4,5-dimetilfenol e γ-terpineno na composição de *T. vulgaris*.

Um fator importante na aplicação de uma substância em um sistema alimentar é a homogeneidade do meio utilizado nos testes preliminares *in vitro*, que em meio de cultivo líquido ou gel podem apresentar maior eficácia; já quando aplicados em alimentos, a eficácia vai depender da composição da matriz, que pode ser complexa ou heterogênea (WEISS; LOEFFLER; TERJUNG, 2015). Devido a possibilidade de interagir com os componentes dos alimentos, altas concentrações podem ser necessárias para atingir a mesma eficácia quando comparadas aos testes *in vitro* (ALLOUI; KHWALDIA, 2016). Dessa forma, estudos detalhados das propriedades antibacterianas de óleos essenciais como concentração inibitória mínima (MIC), modo de ação e microrganismo alvo, além da interação com os componentes dos alimentos são necessários para aplicação como bioconservantes para controle de microrganismos em sistemas alimentares (HYLDGAARD *et al.*, 2012).

Os fatores inerentes aos alimentos também influenciam a atividade antibacteriana dos óleos essenciais quando aplicados em matrizes alimentares, como composição química, pH, atividade de água, temperatura e atmosfera de armazenamento. Valores de pH baixo podem contribuir para aumentar a solubilidade e estabilidade dos EOs (BURT, 2004). Altas concentrações de proteínas ou gorduras na composição dos alimentos podem fornecer uma camada protetora ao redor do microrganismo ou absorver a substância antibacteriana, reduzindo assim sua concentração e eficácia em meio aquoso (PERRICONE *et al.*, 2015; TYAGI *et al.*, 2012). Óleos essenciais de tomilho e canela apresentaram maior eficácia contra *Salmonella* em tahini hidratado (atividade de água de

0.96) do que não hidratado (atividade de água de 0.25), pois a hidratação propiciou a diluição e reduziu o teor de gordura disponível no produto (AL-NABULSI *et al.* 2020).

A combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas pode aumentar o espectro de ação antibacteriana por meio do sinergismo. Diniz-Silva *et al.* (2019) mostraram que os óleos de *Origanum vulgare L.* (0.03 µL/g) e *Rosmarinus officinalis L.* (1.32 µL/g) apresentaram efeito sinérgico contra *E. coli* O157:H7 em queijo fresco. O conteúdo de terpenos diminuiu durante o armazenamento de queijo fresco, e a não detecção de γ -terpineno e carvacrol após 3 dias de armazenamento pode estar relacionada com a solubilidade e volatilidade, bem como a habilidade de reagir com proteínas e gordura (DINIZ-SILVA *et al.*, 2019).

O uso de óleos essenciais incorporados em matrizes poliméricas também é um método muito estudado, que proporciona bons resultados de conservação de alimentos, como é o caso de Raeisi *et al.* (2020), que produziram revestimentos de nanofibras a partir de proteína isolada da soja e gelatina, incorporados com óleo essencial de *Zataria multiflora* e *Cinnamon zeylanicum*. Os autores obtiveram bons resultados contra patógenos gram-positivos e gram-negativos, o biofilme incorporado com 20% de *Z.multiflora* reduziu 100% a ação de *S.aureus*, *B. Cereus* e *L. monocytogenes*. A redução frente a *E. coli* foi de 70%, e 63% para *S. Typhimurium*.

Tabela 2 – Aplicação de óleos essenciais de plantas medicinais como antibacteriano em diferentes matrizes alimentares.

Planta	Componentes majoritários	Matriz alimentar	Microrganismo	Referência
<i>Litsea cubeba</i>	β -Citral (39.25%), α -Citral (30.89%) e Limoneno (8.28%)	Sucos vegetais	<i>E. coli</i> O157:H7	Dai <i>et al.</i> (2021)
<i>Syzygium aromaticum</i> , L.	Eugenol (56.06%), cariofileno (39.63%) e α -cariofileno (4.31%)	Hambúrguer de carne	<i>S. aureus</i>	Radünz <i>et al.</i> (2019)
Cinnamon	-	Tahini	<i>Salmonella</i> spp.	Al-Nabulsi <i>et al.</i> (2020)

<i>Salvia officinalis</i> L.	Epirosmanol (26.25%), viridiflorol (18.42%), cânfora (12.74%)	Linguiça de porco fresca	Contagem aeróbia mesófila total	Šojić <i>et al.</i> (2018)
<i>Zingiber officinale</i>	α -zingibereno (24.96%) e β -sesquifelandreno (12.74%)	Emulsão de revestimento em filés de peito de frango	Bactérias psicrófilas	Noori, Zeynali e Almasi (2018)
<i>Pimpinella saxifraga</i>	anetol (59.47%) e pseudo-isoeugenol (20.15%)	Queijo siciliano	Bactéria mesófila	Ksouda <i>et al.</i> (2019)
<i>Pimpinella anisum</i>	(80.84%) foi relacionado ao anetol, seguido pelo óxido de piperitenona (5.76%), <i>p</i> -alilanisol (2.9%), acetil-isoeugenol (2.05%), e <i>trans</i> -cariofileno (2.05%)	Carne moída	<i>Pseudomonas</i> spp.	Khanjari <i>et al.</i> (2018)
<i>Origanum vulgare</i> L. e <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Origanum (Timol, ρ -cimeno, carvacrol e γ -terpineno) Rosmarinus (eucaliptol, cânfora, α -pineno, cariofileno e canfeno)	Queijo fresco	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Diniz-Silva <i>et al.</i> (2019)

Fonte: Autoria própria

2.3 Desafios e perspectivas da aplicação de óleos essenciais em alimentos

Por ser um composto de origem natural, os óleos essenciais se tornaram um atrativo para a população e indústrias, na busca de alternativas para o desenvolvimento de produtos saudáveis e de qualidade (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Mas apesar da efetividade do potencial antibacteriano dos óleos essenciais para aplicação em

matrizes alimentares, estudos detalhados são necessários para promoverem o efeito antibacteriano desejado, sem que se altere as características sensoriais dos alimentos, já que em muitos casos a concentração inibitória necessária é maior que os determinados em ensaios *in vitro* (FALLEH *et al.*, 2020; BHAVANIRAMYA *et al.*, 2019), prejudicando assim o sabor final do produto.

Além de alterações sensoriais devido seu intenso sabor, os óleos essenciais podem ser afetados pela estabilidade em elevadas temperaturas, luz e oxigênio, limitando seu uso como conservantes naturais (ZHU *et al.*, 2021). Radunz *et al.* (2020) estudaram óleo essencial de *Thymus vulgaris* microencapsulado em caseína-maltodextrina as microcápsulas foram produzidas por spray-drying aonde o encapsulado foi mais efetivo que o não encapsulado na conservação de hambúrguer de carne contra *E. coli*. Obtiveram efeito antibacteriano até 14 dias de armazenamento devido à lenta liberação dos compostos voláteis, que são protegidos pela encapsulação, e os resultados foram similares ao aditivo sintético nitrito (RADUNZ *et al.*, 2020). Froiio *et al.*, (2019) mencionaram que a incorporação de óleos essenciais em matriz polimérica é uma forma para protegê-los da degradação, torná-los solúveis para serem incorporados em ambiente aquoso, disfarçar o aroma forte, e evitar interação do OE com os componentes alimentares. Entretanto, esse método ainda necessita de ajustes econômicos e de processo para viabilização em escalas industriais. Com isso, nota-se que por mais eficaz que os óleos essenciais sejam, ainda é necessário estabelecer uma metodologia que possibilite sua utilização na indústria.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse estudo de revisão pode-se observar a efetividade dos óleos essenciais de plantas medicinais contra bactérias patogênicas e deteriorantes de interesse em alimentos. Os óleos essenciais são alternativas promissoras para substituição dos conservantes sintéticos utilizados na indústria alimentícia. No geral, a aplicação em alimentos é um desafio que necessita de maiores estudos e melhoramento de técnicas para que barreiras como as alterações de sabor e oxidação da substância, sejam solucionadas, viabilizando seu uso e aceitabilidade.

4 REFERÊNCIAS

ADELAKUN Oluyemisi Elizabeth, OYELADE Olusegun James, OLANIPEKUN Bosede Folake. Use of essential oils in food preservation. In: Preedy VR. **Essential oils in food preservation, flavor, and safety**. p. 71-84, 2016. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416641-7.00007-9>

AL-NABULSI, Anas A. *et al.* Inactivation of Salmonella spp. in tahini using plant essential oil extracts. **Food Microbiology**. v. 86, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103338>

ALOUI, H.; KHWALDIA, K. Natural antimicrobial edible coatings for microbial safety and food quality enhancement. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. p.1080-1103, set. 2016. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12226>

BAJPAI, V. K.; BAEK, K.H.; KANG, S.C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**. v.45, n. 2, p.722-734, mar. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.052>

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils and a review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, n.2, p.446-475, fev. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BENSID, A. *et al.* Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food – a review. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**. v. 62, n. 11, p. 2985- 3001, dez. 2020. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1862046>

BHAVANIRAMYA, Sundaresan *et al.* Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**. v.2, n.2, p. 49-55, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>

BINTSIS, Thomas. Foodborne pathogens. **AIMS Microbiology**. v. 3, n. 3, p. 529-563, jun.2017. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>

BRASIL. 1997. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Aprova o Regulamento Técnico: **Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego**. <http://www.anvisa.gov.br>

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review.**International Journal of Food Microbiology**. v. 94, p. 223-253, mar. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

CALO, Julianny Rivera *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems e A review. **Food Control**. v.54, p.111-119, ago. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>

CHEN, Jiali *et al.* Metabolomics analysis to evaluate the antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 253, maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112652>

CHENG, Dongle *et al.* A critical review on antibiotics and hormones in swine wastewater: Water pollution problems and control approaches. **Journal of Hazardous Material**. v.387, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121682>

CONTE, Francieli Aline. Efeitos do consumo de aditivos químicos alimentares na saúde humana. **Revista Espaço Acadêmico**. n.181, p. 69- 81, jun.2016. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/EspacoAcademico/article/view/30642>.

COX, S.D. *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**. v.88, n.1, p.170-175, jan. 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>

CUI, Haiying; ZHANGA, Chenghui; LI, Changzhu; LIN, Lin. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. **Industrial Crops & Products**. v. 139, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111498>

DAI, Jinming *et al.* Unraveling the anti-bacterial mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against E. coli O157:H7 and its application in vegetable juices. **International Journal of Food Microbiology**. v.338, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108989>

DHIFI, W. B. S. *et al.* Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**. v.3, n. 4, set. 2016. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>

DINIZ-SILVA, Helena Taina; Sousa, Janaina Batista; GUEDES, Jessica da Silva; QUEIROGA, Rita de Cássia Ramos do Egypto; MAGNANI, Marciane. A synergistic mixture of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils to preserve overall quality and control *Escherichia coli* O157:H7 in fresh cheese during storage. **LWT**. v. 112, p. 1-9, set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.039>

EDRIS, Amr E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**. v. 21, n. 4, p. 308-323. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>

EFSA (European Food Safety Authority). 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J 14: 4634-4865. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>

FALLEH, H. *et al.* Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**. v. 330, nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>

FAO (Food and Agriculture Organization). 2019. Food safety, everyone's business. A Guide to World Food Safety Day 2019. FAO, Rome, Italy. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&slug=world-food-safety-day-2019-guide&Itemid=270&lang=en

FREITAS, Priscilla Ramos, *et al.* Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. **Microbial Pathogenesis.** v.145, ago. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104223>

FROIIO, Francesca; MOSADDIK, Ashik; MORSHED, Mahmud Tareq; PAOLINO, Donatella Paolino; FESSI, Hatem Fessi; ELAISSARI, Abdelhamid. Edible Polymers for Essential Oils Encapsulation: Application in Food Preservation. **Industrial & Engineering Chemistry Research.** v. 58, p. 20932–20945, set. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b02418>

GEBREYES, W.A. *et al.* Spread of antibiotic resistance in food animal production systems. **Foodborne Diseases.** p.105-130, 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385007-2.00004-8>

GUSTAVSSON, Jenny *et al.* Global food losses and food waste: extent, causes, and prevention. FAO, Düsseldorf, Germany. 2011. <http://www.fao.org/3/mb060e/mb060e.pdf>

HATAB, Shaimaa, *et al.* Survival and reduction of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a fresh cold-pressed juice treated with antimicrobial plant extracts. **Journal of Food Science.** v.81, n. 8, p.1987-1995, ago.2016. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13382>

HYLDGAARD, Morten *et al.* Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components: a review. **Frontiers in Microbiology.** v. 3, jan. 2012. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>

JESUS, Renan Almeida *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of *Myrcianthes pungens* leaf essential oil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas.** v. 20, n.2, p. 147-161, mar. 2021. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.2.12>

KHANJARI, Ali *et al.* In vitro antibacterial activity of *Pimpinella anisum* essential oil and its influence on microbial, chemical, and sensorial properties of minced beef during refrigerated storage. **Journal of Food Safety.** v.39, n. 4, ago. 2019. DOI:10.1111/jfs.12626

KSOUDA, Ghada *et al.* Composition, antibacterial and antioxidant activities of *Pimpinella saxifraga* essential oil and application to cheese preservation as coating additive. **Food Chemistry.** v. 288, p. 47-56, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.103>

LAMBERT, R.J.W. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology.** v.91, n.3, p.453-462 set.2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>

LI Yangun *et al.* The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. The effect of developmental and environmental factors

on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.148, p.80-89, mar.2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>

LIANO, A. *et al.* Microbiological spoilage of foods and beverages. **The stability and shelf life of food**. p.3-42, 2016. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100435-7.00001-0>

MAZAREI, Zeinab.; RAFATI, Hasan. 2019. Nanoemulsification of *Satureja khuzestanica* essential oil and pure carvacrol; comparison of physicochemical properties and antimicrobial activity against *en con* food pathogens. **LWT**. v. 100, p.328-334, fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.094>

MOHAMMED, Jawad *et al.* Antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against bacteria isolated from urinary tract infection. **European Journal of Integrative Medicine**. v. 38, set.2020. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101192>

MORAIS, L. A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 2, p. 4050-4063, ago. 2009. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/577686>.

NAZZARO Filomena *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**. v.6, n.12, p.1451-1474, nov. 2013. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

NOORI, Soheila; ZEYNALI, Fariba; ALMASI, Hadi. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food Control**. v. 84, p. 312-320, fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.015>

PARLAPANI, Foteini F. *et al.* Volatile organic compounds of microbial and non-microbial origin produced on model fish substrate un-inoculated and inoculated with gilt-head sea bream spoilage bacteria. **LWT**. v.78, p.54-62, maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.020>

PERRICONE, Marianne *et al.* Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components: a review. **Front Microbiol**. v.6, fev. 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00076>

RADUNZ, Marjana *et al.* Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 330, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108696>

RADUNZ, Marjana *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**. v. 276, p. 180-186, mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.173>

RAEISI, Mojtaba *et al.* Physicochemical and antibacterial effect of soy protein isolate/gelatin electrospun nanofibers incorporated with *Zataria multiflora* and *Cinnamon*

zeylanicum essential oils. **Journal of Food Measurement Characterization**. v. 15, p.1116-1126, out. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00700-0>

RATTANACHAIKUNSOPON, Pongsak; PHUMKHACHORN, Parichat. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.110, n. 5, p. 614-619, nov. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.06.010>

RAUT, Jayant Shankar, KARUPPAYIL, Sankunny Mohan. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 62, p. 250- 264, dez. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>

RIBEIRO- SANTOS, Regiane *et al.* Essential oils for food application: natural substances with established biological activities. **Food and Bioprocess Technology**. v.11, p. 43-71, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1948-6>

SAHIN, Sumeyye; KILIC, Ozlem. Antioxidant and antibacterial activities of essential oils and aromatic waters of some plants grown in the highlands. **International Journal of Agriculture Environment and Food Science**. v.5, n. 2, p. 133-139, jun. 2021. <https://doi.org/10.31015/jaefs.2021.2.1>

SALVODI, Thais Lorana *et al.* Antimicrobial activity of essential oil from *Psidium cattleianum* Afzel. ex Sabine leaves. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**. v.19, n. 6, p. 614-627, jul. 2020. <https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.6.44>

ŠOJIC, B. *et al.* The effect of essential oil and extract from sage (*Salvia officinalis* L.) herbal dust (food industry by-product) on the oxidative and microbiological stability of fresh pork sausages. **LWT**. v. 89, p. 749-755, mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.055>

SOMRANI, Mariem *et al.* Garlic, onion, and cinnamon essential oil anti-biofilms effect against *Listeria monocytogenes*. **Foods**. v.9, n.5, maio 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9050567>

TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**. v.21, n.9, p.1199-1218, set. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>

THOROSKI, John; BLANK, Greg; BILIADERIS, Costas. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**. v.52, n.6, p. 399-403, jun.1989. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-52.6.399>

TOMAR, Oktay; AKARCA, Gökhan; GÖK, Veli; RAMADAN, Mohamed Fawzy. Composition and antibacterial effects of Laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves essential oil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v. 23, p. 414-421, maio 2020. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2020.1768903>

TYAGI, Amit Kumar *et al.* Essential oil vapour and negative air ions: A novel tool for food preservation. **Trends in Food Science & Technology**. v.2, n. 2, p. 99-113, ago. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.02.004>

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELLAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, n. 4, p.1561-1568, abr 2002. <https://doi.org/10.1128/aem.68.4.1561-1568.2002>

WANG, Xin *et al.* Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Molecules**. v.25, n.17, ago. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25173955>

WEISS, Jochen; LOEFFLER, Myriam; Terjung, Nino. The antimicrobial paradox: why preservatives lose activity in foods. **Current Opinion in Food Science**. v.4, p. 69-75, ago. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.008>

ZHU, Y. *et al.* Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. **Food Control**. v.123, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107856>

CAPÍTULO III

Inovação no uso de óleos essenciais de orégano e tomilho: encapsulação e propriedades antibacterianas em queijo minas frescal

RESUMO: Os óleos essenciais de orégano e tomilho apresentam atividade antibacteriana, antioxidante, antifúngica entre outras. Entretanto quando adicionados diretamente aos alimentos suas propriedades podem ser diminuídas, deste modo técnicas como a nanoencapsulação podem ser utilizadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e potencial sinérgico de óleos essenciais de orégano e tomilho, e encapsular com zeína para aplicação em queijo minas frescal. Os óleos essenciais de orégano e tomilho foram adquiridos da empresa Ferquima. A atividade antibacteriana foi avaliada para *Escherichia coli* ATCC 43893, *Bacillus cereus* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhi ATCC 19214, *Staphylococcus aureus* ATCC 26923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM). Os efeitos sinérgicos dos óleos essenciais foram analisados pelo método *checkerboard*. Os óleos essenciais foram encapsulados com zeína e avaliados quanto ao efeito antibacteriano. As análises térmicas termogravimétrica (TGA), calorimetria de varredura diferencial (DSC), espectroscopia FTIR e análise de componente principal foram utilizadas para avaliar a estabilidade térmica das diferentes amostras. Os óleos essenciais livres e encapsulados foram aplicados no queijo para análise da atividade antibacteriana. A CIM do óleo essencial de orégano variou de 0,10 a 0,41 mg/mL e tomilho de 0,15 a 0,52 mg/mL, com a encapsulação a CIM do óleo essencial de tomilho teve variação de >10 a 2,08 mg/mL e de 5 a 2,08 mg/mL para o óleo essencial de orégano. A concentração inibitória fracional (FIC) teve como resultado 0,09 para *Staphylococcus aureus*, 0,07 para *Salmonella* Typhi e *Listeria monocytogenes* e 0,27 para *Escherichia coli*, indicando sinergismo entre os óleos. As análises DSC, FTIR e TGA demonstraram que a encapsulação dos óleos essenciais foi efetiva, promovendo a estabilidade térmica. As contagens de *S. aureus* no queijo minas frescal foram realizadas em 7 e 14 dias de armazenamento. No sétimo dia de armazenamento do queijo minas frescal, o tratamento T4 (sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho sem zeína) promoveu a redução de 1,17 Log UFC/g e no décimo quarto dia, todos os tratamentos obtiveram a contagem bacteriana inferior ao tratamento T1 (sem antimicrobiano) 9,11 Log UFC/g, com destaque para o tratamento T6 (óleo essencial de orégano) 6,32 Log UFC/g comprovando a efetividade dos tratamentos. A combinação dos óleos essenciais de orégano e tomilho apresentou atividade antibacteriana, mostrando-se favorável para utilização como conservantes em alimentos.

Palavras-chave: Sinergismo. *Origanum vulgare*. *Thymus vulgaris*. Encapsulação. Zeína.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de queijo do mundo, com uma produção anual que supera 1,5 milhão de toneladas (MUNDIAL DO QUEIJO DO BRASIL, 2023). O queijo minas frescal é um dos derivados lácteos mais apreciados no Brasil, classificado como queijo fresco de alta umidade (entre 46,0 a 54,9%) (BRASIL, 1996; FERREIRA; SANTOS, 2022). É obtido por meio da coagulação enzimática do leite pasteurizado com coalho ou com outras enzimas coagulantes, apropriadas ou com ambos, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, com a obtenção de uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada (BRASIL, 2017).

Problemas relacionados à qualidade da matéria-prima, etapas da fabricação, bem como a alta perecibilidade do produto podem favorecer a proliferação de microrganismos como *Staphylococcus aureus* e conseqüentemente ocasionar doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (FERREIRA; SANTOS, 2022). As principais bactérias associadas às doenças transmitidas por alimentos são *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Staphylococcus aureus* (WARMATE; ONARINDE, 2023). As DTAs são ocasionadas pela ingestão de alimentos ou água contendo contaminantes físicos, químicos ou biológicos e constituem uma grande preocupação de saúde pública (MORAIS *et al.*, 2018).

Para evitar a contaminação e ampliar o tempo de vida útil dos alimentos, utilizam-se conservantes sintéticos, porém estes podem causar efeitos tóxicos nos indivíduos, dependendo da quantidade ingerida, bem como a susceptibilidade do organismo e da concentração usada (SANTOS; LOURIVAL, 2019). Dessa forma, a substituição por conservantes naturais, como os óleos essenciais, vem sendo explorada por pesquisadores, visando atender a população que busca consumir produtos mais saudáveis e a indústria que busca criar um atrativo diferencial ao mercado consumidor (FREDERICO *et al.*, 2021).

Óleos essenciais são compostos presentes naturalmente em plantas. São constituídos por uma mistura complexa de diferentes metabólitos secundários (MORAIS, 2009). Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma planta aromática da família Lamiaceae. Na medicina popular é usado por suas propriedades expectorantes, antitússicas, antibroncolíticas, antiespasmódicas, antisépticas, antihelmínticas, carminativas,

cardioprotetoras e diuréticas (REDDY *et al.*, 2014; DAUQAN; ABDULLAH, 2017). O orégano (*Origanum vulgare*) também pertence à família Lamiaceae. Muito utilizado na preparação de alimentos por seu sabor, como para a aplicação ornamental e medicinal, devido aos seus benefícios como atividade antioxidante, antibacteriana, hepatoprotetora, cardioprotetora, hipoglicemiante e anticancerígena (CHISHTI; KALOO; SULTAN, 2013; ONIGA, *et al.*, 2018).

Devido à natureza volátil dos óleos essenciais, quando adicionados diretamente às matrizes alimentares, sua estabilidade pode ser afetada, limitando seu uso como conservantes naturais (ZHU, *et al.*, 2021). Deste modo, estratégias estão sendo pesquisadas visando à otimização dos efeitos biológicos de compostos naturais em alimentos, por meio do uso da encapsulação. Este processo aumenta a estabilidade física das substâncias ativas dos óleos essenciais, minimizando os possíveis efeitos deletérios (LOVISON *et al.*, 2017; FROIIIO *et al.*, 2019), promovendo vários benefícios, incluindo maior biodisponibilidade, estabilidade e liberação controlada dos compostos bioativos (JASKI *et al.*, 2022), bem como a diminuição do odor e sabor intenso característicos dos óleos essenciais (CHRISTAK *et al.*, 2021).

Entre os métodos de produção de partículas, a técnica de nanoencapsulação por meio da nanoprecipitação é considerado um método de simples aplicação, por oferecer bom rendimento, e poder ser aplicada industrialmente (LI *et al.*, 2021). Nesta técnica, é realizada a adição sucessiva de uma solução composta pelo material de parede e o composto a ser encapsulado ao sistema antissolvente, que contém um estabilizante ou surfactante, o que leva à precipitação do polímero em nanoescala (KAUR *et al.*, 2018).

A zeína de milho é uma matriz eficaz para a produção de nanopartículas sendo capaz de encapsular uma variedade de compostos bioativos, aumentando sua estabilidade durante as condições de processamento e armazenamento, sendo também aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) como um polímero geralmente reconhecido como seguro (GRAS) (RESHMA; REKHA, 2024). As nanopartículas de zeína são sistemas transportadores de interesse, pois as proteínas de zeína são biodegradáveis e biocompatíveis (SHARIF; FABRA; LOPEZ-RUBIO, 2019). Devido à sua alta hidrofobicidade, a zeína tem sido aplicada com sucesso em nanoencapsulação e liberação controlada de compostos lipossolúveis como óleos essenciais (XAVIER *et al.*, 2020).

A zeína é uma proteína presente no endosperma dos grãos de milho, representando cerca de 80% das proteínas totais, desta forma, considerando que o mercado do milho é massivamente difundido em escala global com produção anual de mais de 1 bilhão de toneladas a zeína se torna disponível e acessível (RESHMA; REKHA, 2024).

Estudos da adição de óleo de orégano em queijo minas (CAMPOS *et al.* (2022) e aplicação do óleo essencial de tomilho em queijo (CARVALHO *et al.*, 2015) foram realizados para analisar a ação antimicrobiana como compostos naturais, porém ainda é pouco discutida a utilização de óleos essenciais em sinergismo e encapsulados aplicados em queijos. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e potencial sinérgico de óleos essenciais de orégano e tomilho, e encapsular com zeína para aplicação em queijo minas frescal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano e tomilho foram obtidos da empresa Ferquima Indústria e Comércio LTDA (Vargem Grande - São Paulo).

Óleo essencial de orégano: Lote: 240, Fabricação: julho de 2021, Validade: julho de 2023. Componentes principais: carvacrol 72%, p-cimeno 5%, γ -terpineno 4,8%, linalol 3%, β -cariofileno 3%. Óleo essencial de tomilho: Lote: 197, Fabricação: julho de 2021, Validade: julho de 2024. Componente principal: timol 47,57%.

2.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

2.2.1 Microrganismos e preparo do inóculo

As espécies bacterianas usadas na pesquisa foram *Escherichia coli* ATCC 43893, *Bacillus cereus* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhi ATCC 19214, *Staphylococcus aureus* ATCC 26923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Os microrganismos foram provenientes do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Vegetais e de Microrganismos da Universidade Paranaense. Para os ensaios, as células bacterianas foram cultivadas por 24 horas. A concentração do inóculo foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) com solução salina estéril (0,85%) sendo confirmada a concentração medindo a absorvância a 625 nm em um espectrofotômetro (Spectra Max Plus). Em seguida, a suspensão foi diluída 1:10 em caldo Mueller-Hinton para obter densidade celular de $1,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, e o inóculo foi utilizado nos ensaios (CLSI, 2015).

2.2.2 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo

Foi realizado um *screening* para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada microrganismo frente aos óleos essenciais por meio da técnica de microdiluição em caldo usando microplacas de 96 poços. A CIM foi determinada de acordo com o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2015) modificado para produtos naturais. Os óleos essenciais foram avaliados dissolvidos em água destilada e polisorbato 80 a 2 % e avaliados na faixa de 20 a 0,03 mg/mL. Posteriormente, 50 μ L de meio de cultura Muller Hinton foram adicionados em cada poço e 50 μ L de óleo essencial, sendo realizada diluição seriada 1:2. Após a diluição seriada, 50 μ L do inóculo foi adicionado a

cada poço e submetido à incubação por 35°C por 24 h. A leitura foi realizada com a adição de 20 µL de revelador 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (Reatec®) a 1,0% em cada poço seguida de incubação das microplacas a 37° C por 20 min. O CIM foi definida como a menor concentração que resultou na inibição do crescimento visual. A concentração bactericida mínima foi determinada pelo subcultivo de 10 µL de cada poço negativo e do controle positivo em ágar Muller Hinton. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e realizadas a leitura.

2.3 Efeito sinérgico dos óleos essenciais

Os testes *checkerboard* foram realizados por microdiluição a partir de um inóculo $5 \times 10^4 - 10^5$ UFC/mL, utilizando meio de cultura caldo Muller Hinton, preparado conforme descrito no item 2.3.2. As concentrações dos óleos essenciais foram avaliadas com base nos resultados da CIM. As microplacas foram incubadas por 35°C por 24 h. O índice de concentração fracional inibitório (FIC) foi definido como a soma dos CIMs de cada óleo essencial em combinação dividido pelo CIM dos óleos sozinhos. Os resultados foram interpretados como sinergismo ($FIC \leq 0,5$), adição ($FIC \leq 1$), indiferença ($FIC \leq 4$) ou antagonismo ($FIC > 4$) (ODDS, 2003).

2.4 Encapsulação dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram encapsulados por nanoprecipitação utilizando zeína como material de parede de acordo com a metodologia proposta por Hu e McClements (2014).

Realizou-se o preparo da solução de zeína, com a adição 1,4 g de zeína em pó em 85 mL de etanol, 15 mL de água destilada e 0,6 g de óleo essencial. A solução foi preparada com os óleos essenciais separados e em sinergismo. O pH da solução foi ajustado a 5,8, e agitado (10 min) em agitador magnético para a dissolução.

A solução de polisorbato foi preparada com adição de 0,8 g de polisorbato 80 em 400 mL de água destilada, ajustando pH a 4,0 e seguido de agitação (10 min).

Para o preparo da encapsulação, foi utilizada uma bureta para adicionar a solução de zeína na solução de polisorbato mantida por agitação constante, utilizando um Ultra-Turrax (IKA-T25, Cincinnati, USA) a 15,000 rpm. O etanol foi evaporado durante 24 horas a 30 °C em banho maria e depois a solução foi submetida à liofilização (-55 °C / 445 µHg, Liofilizador L101-LIOBRAS, São Carlos, BR).

A atividade antibacteriana dos óleos encapsulados foi feita de acordo com o método descrito no item 2.2.1.1

2.5 Caracterização dos óleos essenciais livres e encapsulados

2.5.1 Análises térmicas

As análises, termogravimétrica (TGA), calorimetria de varredura diferencial (DSC), espectroscopia FTIR e análise de componente principal foram realizadas na Central Analítica Multiusuário de Medianeira (CEANMED), no Campus Medianeira da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-MD).

2.5.2 Análise termogravimétrica

A determinação do percentual de perda de massa em função da temperatura foi realizada na faixa entre 50 e 500°C, utilizando um analisador termogravimétrico (Perkin Elmer, STA 6000), adicionando aproximadamente 7 mg de amostra em um cadinho de platina, submetido a uma taxa de aquecimento de 10 C/min e vazão de N₂ de 50 ml/min.

2.5.3 Espectroscopia FTIR

Os espectros de absorvância no infravermelho foram utilizados utilizando um espectrômetro FTIR (Perkin Elmer, Spectrum 100 S) contendo o acessório Attenuated Reflectance (ATR). Os espectros foram medidos na faixa de IR entre 4.000 e 600 cm⁻¹, com intervalo de 4 cm⁻¹, e expressos como o resultado médio de 8 varreduras.

2.5.4 Análise do componente principal

Com base nos espectros de absorvância no infravermelho, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA) através de uma rotina desenvolvida na linguagem de programação Python, utilizando as bibliotecas Scikit-learn, Pandas e Numpy e centralização média como pré-tratamento dos espectros.

2.6 Produção do queijo minas frescal

Para a produção do queijo minas frescal, foram utilizados três litros de leite integral pasteurizado tipo A (3 % de gordura) aquecidos a 35 °C. Em seguida, foram adicionados 2,4 mL do agente coagulante comercial à base de quimosina com 75 Unidade

Internacional de Coagulação do Leite – IMCU (Coalho Estrela, fabricado por Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda) e 0,9 mL de Cloreto de Cálcio 40% (Coalhopar - Umuarama); após homogeneização foi mantido repouso por 40 minutos para a ocorrência da coagulação. Posteriormente, a coalhada formada foi cortada em cubos usando um cortador estéril, e lentamente agitada (5 min), após a agitação foi mantido mais 10 minutos de repouso para a liberação do soro. Após a precipitação, a massa foi separada do soro com o auxílio de uma peneira. Posteriormente, foram contaminados intencionalmente com *S. aureus* ($1,5 \times 10^6$ UFG/g) e adicionados os antimicrobianos na concentração de 0,5% (óleos essenciais de orégano e tomilho e os conservantes nisina e natamicina), sendo os tratamentos T1= controle (sem tratamento antimicrobiano, somente inóculo), T2= nisina, T3= natamicina, T4= zeína pura, T5= sinergismo com zeína, T6= OE de orégano, T7= OE de tomilho, T8= OE sinergismo, T9= OE de orégano com zeína e T10= OE de tomilho com zeína. Os queijos foram armazenados em recipientes plásticos (4 cm x 2,5 cm x 2 cm) perfurados para a saída do soro durante 12 horas em refrigeração (4 °C). Posteriormente foram desenformados e armazenados em recipientes de polipropileno tampados e submetidos ao armazenamento (4 °C) durante o período de 14 dias (RIBEIRO, 2015). Os queijos pesaram aproximadamente 16 gramas com dimensões de 4 cm de largura por 3 cm de altura.

2.7 Análise físico química do queijo

Os valores de pH foram determinados com eletrodo medidor de pH (MS Tecnopon, mPA210), mergulhando o eletrodo de vidro em três pontos das amostras. Para essa análise 5 gramas da amostra foram diluídas em 25 mL de água deionizada.

A análise da acidez total titulável foi realizada por titulação. Para essa análise 10 gramas da amostra foi transferida para um béquer de 150 mL e adicionados 50 mL de água deionizada, agitou-se com bastão de vidro até dissolução possível, esta mistura foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e seu volume foi completado com água deionizada. Uma alíquota de 20 mL dessa solução foi transferida para um erlenmeyer de 150 mL, 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% foram adicionadas e a titulação foi realizada utilizando solução de hidróxido de sódio 0,1 M até coloração rósea.

Equação 1:

Cálculo acidez titulável: % em ácido láctico = $(V \times f \times 0,9/m)$

V: volume da solução de hidróxido de sódio 0,1M gasto na titulação em mL;

f: fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1M;

0,9: fator de conversão do ácido láctico;

m: massa da amostra na alíquota em gramas.

2.8 Contagem de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal

Os queijos foram submetidos à contagem de células microbianas de *S. aureus* em tempos diferentes: 7 e 14 dias. Para cada tratamento, uma quantidade de 10 g de amostra foi adicionada a 90 mL de água peptonada estéril a 0,1%, esta solução formada foi denominada de diluição 10^{-1} , posteriormente diluições seriadas de até 10^{-7} foram utilizadas para realizar as análises. Para a identificação e contagem de *S. aureus*, foram semeados 100 μ l de cada diluição na superfície do ágar Baird-Parker, em triplicata. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 h e realizadas as leituras e os resultados apresentados em Log UFC/g (SILVA *et al.*, 2021).

2.9 Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos através da média \pm desvio padrão e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para determinar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos. A análise foi realizada utilizando o software Sisvar 5.6.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo

Os óleos essenciais de orégano e tomilho foram submetidos à análise da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), e os resultados foram apresentados na Tabela 1.

A CIM do óleo essencial de orégano variou de 0,10 a 0,31 mg/mL se mostrando mais eficiente contra *B. cereus* (0,10 mg/mL) e óleo essencial de tomilho com variação de 0,15 a 0,52 mg/mL sendo mais eficiente para *S. aureus* e *P. aeruginosa* (0,15 mg/mL). Sorbato de potássio, nisina e natamicina utilizados como controle, apresentaram CIM com variação de 6,25 a >50,00 mg/mL, de 6,25 a >25mg/mL e de 12,5 a >25mg/mL, respectivamente. Para *S. aureus*, o óleo essencial de tomilho e orégano foram 333 vezes mais ativos do que o sorbato de potássio e 166 vezes mais ativos que a nisina e a natamicina. Para *P. aeruginosa* o óleo essencial de tomilho e orégano foram 166 vezes mais ativos que o sorbato de potássio e 83 vezes mais ativos que a nisina e a natamicina. Para *B. cereus* o óleo essencial de orégano foi 62,5 vezes mais ativo que o sorbato de potássio, 250 vezes mais ativo que a nisina e 125 vezes mais ativo que a natamicina, já o óleo essencial de tomilho foi 12 vezes mais ativo que o sorbato de potássio, 48 vezes mais ativo que a nisina e 240 vezes mais ativo que a natamicina. Para *Salmonella Typhi* o óleo essencial de tomilho e orégano foram 161 vezes mais ativos que o sorbato de potássio, 40 vezes mais ativos que a nisina e 80 vezes mais ativos que a natamicina. Para *E. coli* o óleo essencial de tomilho foi 121 vezes mais ativo que o sorbato de potássio, 60 vezes mais ativo que a nisina e 15 vezes mais ativo que a natamicina, já o óleo essencial de orégano foi 333 vezes mais ativo que o sorbato de potássio, 166 vezes mais ativo que a nisina e 41 vezes mais ativo que a natamicina. Para *L. monocytogenes* o óleo essencial de tomilho e orégano foram 161 vezes mais ativos que o sorbato de potássio e 80 vezes mais ativos que a nisina e a natamicina.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) dos óleos essenciais de orégano e tomilho e dos controles Sorbato de Potássio, Nisina e Natamicina.

Bactérias	Tomilho	Orégano	Sorbato de Potássio	Nisina	Natamicina
	CIM CBM	CIM CBM	CIM CBM	CIM CBM	CIM CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,15±0,00 ^b 0,31±0,00 ^A	0,15±0,00 ^b 0,31±0,00 ^B	50,00±0,00 ^c >50,00±0,00	>25,00±0,00 >25,00±0,00	>25,00±0,00 >25,00±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,15±0,00 ^b 2,50±0,00 ^B	0,15±0,00 ^b 0,62±0,00 ^c	25,00±0,00 ^b >50,00±0,00	12,5±0,00 ^b 6,25±0,00 ^A	12,5±0,00 ^b >25,00±0,00
<i>Bacillus cereus</i>	0,52±0,1 ^d >10,00±0,00	0,10±0,04 ^a 0,15±0,00 ^A	6,25±0,00 ^b >50,00±0,00	25,00±0,00 ^b 12,5±0,00 ^B	12,5±0,00 ^b >25,00±0,00
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Typhi	0,31±0,0 ^b >10,00±0,00	0,31±0,00 ^b 1,25±0,00 ^D	>50,00±0,00 >50,00±0,00	12,5±0,00 ^b 12,5±0,00 ^B	>25,00±0,00 >25,00±0,00
<i>Escherichia coli</i>	0,41±0,18 ^c 10,00±0,00 ^c	0,15±0,00 ^b 1,25±0,00 ^D	>50,00±0,00 >50,00±0,00	>25,00±0,00 >25,00±0,00	6,25±0,00 ^a >25,00±0,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,31±0,00 ^b 10,00±0,00 ^c	0,31±0,00 ^b 1,25±0,00 ^D	50,00±0,00 ^c >50,00±0,00	>25,00±0,00 >25,00±0,00	>25,00±0,00 >25,00±0,00

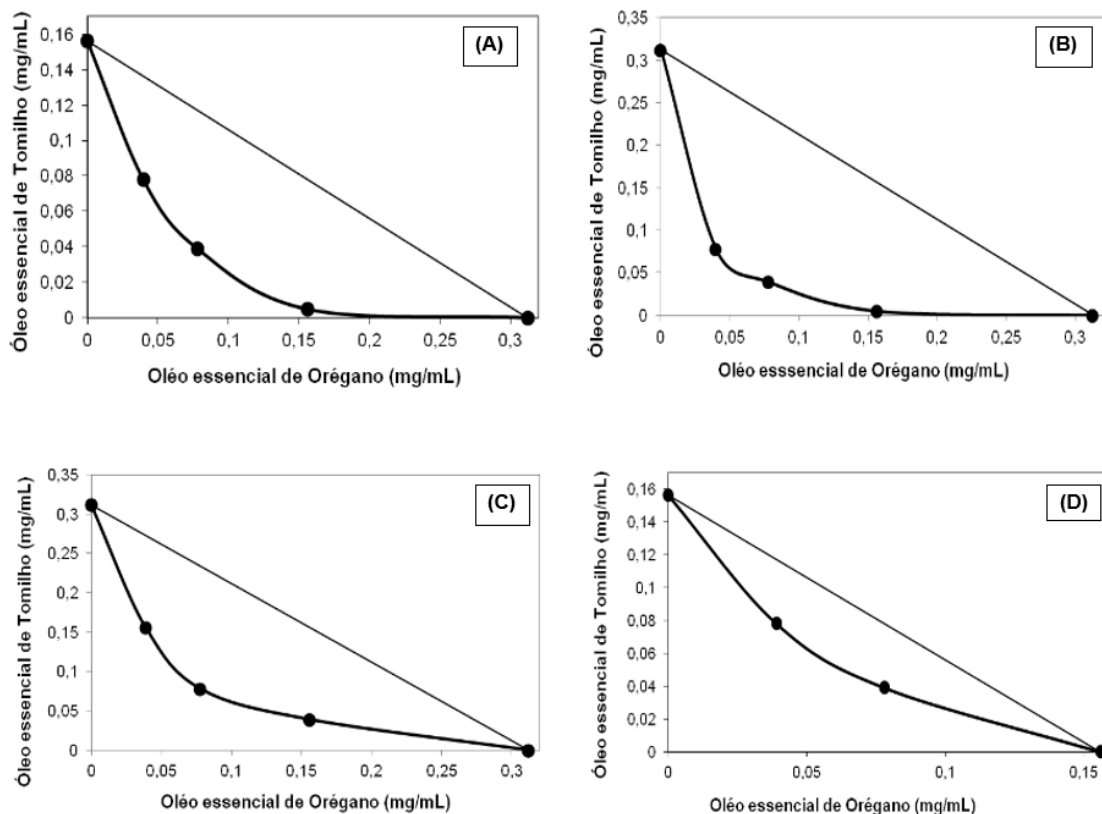
* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Fonte: Autoria própria

3.2 Efeito sinérgico dos óleos essenciais

O efeito sinérgico dos óleos essenciais de orégano e tomilho foi avaliado para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhi*. A CIM isolada do óleo essencial de tomilho foi de 0,31 mg/mL, e para orégano foi de 0,15 mg/mL para *S. aureus*. Para *E. coli* a CIM do tomilho foi de 0,078 mg/mL e orégano 0,15 mg/mL, para *S. Typhi* e *L. monocytogenes* a CIM do óleo essencial de tomilho e orégano foi de 0,31 mg/mL. A concentração inibitória fracional (FIC) teve como resultado 0,09 para *S. aureus*, 0,07 para *S. Typhi* e *L. monocytogenes* e 0,27 para *E. coli*, indicando sinergismo entre os óleos conforme isobologramas apresentado na Figura 1.

Figura 1. Isobogramas do sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Salmonella Typhi*, (C) *Listeria monocytogenes* e (D) *Escherichia coli*.



(-) indica a atividade de adição teórica e (•) CIMs curva côncava, característica do sinergismo (FIC < 0,5).

Fonte: Autoria própria

3.3 Encapsulação dos óleos essenciais

Os resultados da CIM dos óleos encapsulados com zeína estão dispostos na Tabela 4, a qual variaram de 2,08 mg/mL a 5,00 mg/mL para o óleo essencial de orégano e de 2,08 mg/mL a >10,00 mg/mL para o óleo essencial de tomilho. A CIM do óleo essencial de tomilho para *B. cereus* foi de 2,08 mg/mL e para *P. aeruginosa* CIM de 2,08 mg/mL com o óleo essencial de orégano. O óleo essencial de orégano teve CIM de até 4,8 vezes mais baixas para *P. aeruginosa* quando comparado ao óleo de tomilho. Quando comparados aos óleos sem encapsulação pode-se observar que os óleos encapsulados com zeína apresentaram CIM e CBM maiores, isto pode ter ocorrido devido ao fato da encapsulação promover a lenta liberação dos compostos bioativos dos óleos essenciais.

Tabela 2- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) para óleos essenciais de tomilho e orégano encapsulados com zeína.

Bactérias	Tomilho	Orégano
	CIM CBM	CIM CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,00±0,00 ^b >10,00±0,00	5,00±0,00 ^c >10,00±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10,00±0,00 ^b >10,00±0,00	2,08±0,72 ^a >10,00±0,00
<i>Bacillus cereus</i>	2,08±0,72 ^a >10,00±0,00	4,17±5,05 ^b >10,00±0,00
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Typhi	10,00±0,00 ^b >10,00±0,00	5,00±0,00 ^c >10,00±0,00
<i>Escherichia coli</i>	>10,00±0,00 ^b >10,00±0,00	5,00±0,00 ^c >10,00±0,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	10,00±0,00 ^b 10,00±0,00 ^a	5,00±0,00 ^c 10,00±0,00 ^a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Fonte: Autoria própria

3.4 Caracterização dos óleos essenciais encapsulados

3.4.1 Análises térmicas

As análises térmicas foram utilizadas para avaliar a estabilidade térmica das diferentes amostras. A Figura 2 exibe a análise termogravimétrica (TGA) dos óleos essenciais encapsulados com zeína, da mistura física de óleo essencial e zeína, dos óleos essenciais sem encapsulação e da zeína pura. Os óleos essenciais sem o revestimento com zeína tiveram o início da degradação térmica na faixa de temperatura entre 60 a 120 °C, com massa residual de 0%, enquanto para os óleos essenciais encapsulados, mistura física e zeína pura ocorreu conforme o aumento da temperatura, com massa residual variando de 13 a 18%. Este fato demonstra que a zeína, matriz polimérica utilizada como material

de parede, aumenta a estabilidade térmica, sendo capaz de proteger os compostos presentes nos óleos essenciais.

Figura 2. Caracterização dos óleos essenciais encapsulados por análise termogravimétrica (TGA). (A) óleo essencial de orégano, (B) óleo essencial de tomilho e (C) sinergismo dos óleos essenciais livres e encapsulados.

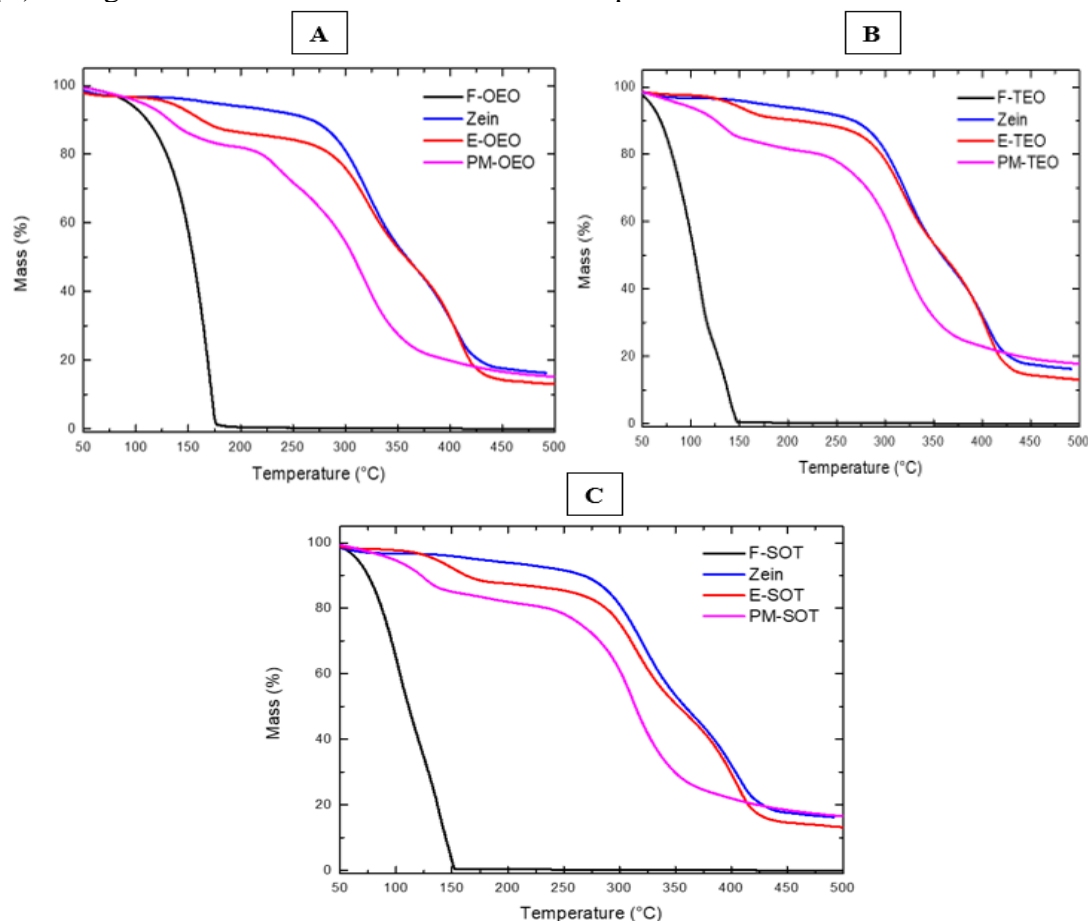


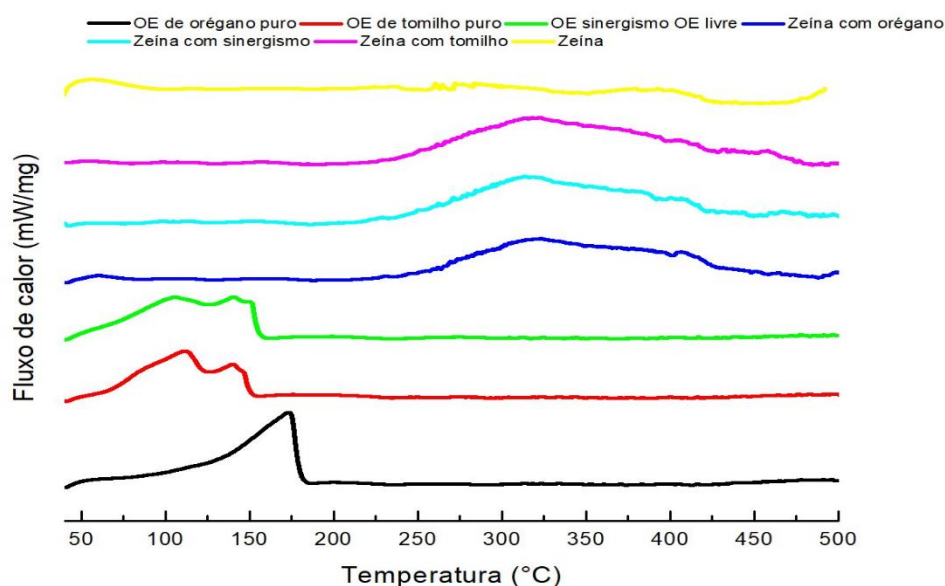
Figura A: F- OEO (óleo essencial de orégano sem encapsulação), E-OEO (óleo essencial de orégano encapsulado com zeína), PM- OEO (mistura física do óleo essencial de orégano com zeína). Figura B: F- OET (óleo essencial de tomilho sem encapsulação), E-OET (óleo essencial de tomilho encapsulado com zeína), PM- OET (mistura física do óleo essencial de tomilho com zeína). Figura C: F- SOT (sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho sem encapsulação), E-SOT (sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho encapsulados com zeína), PM- SOT (mistura física do sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho com zeína).

Fonte: Autoria própria

A análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC), está disposta na Figura 3. Os resultados indicam que a encapsulação proporciona estabilidade aos óleos essenciais. Os óleos essenciais sem encapsulação com zeína apresentaram alteração em

sua estabilidade na faixa de temperatura de aproximadamente 80 °C, e os óleos encapsulados a aproximadamente 320 °C. Deste modo nota-se que a encapsulação foi efetiva, podendo ser submetida também em processos com elevadas temperaturas.

Figura 3. Caracterização dos óleos essenciais (OE) encapsulados por análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC).



OE – Óleo essencial

Fonte: Autoria própria

Na Figura 4 são apresentados os espectros de absorvância no infravermelho (FTIR) obtidos para os óleos essenciais de orégano e tomilho livres, para o sinergismo dos óleos essenciais, para os óleos essenciais encapsulados com zeína e para uma mistura física de zeína e óleo essencial. Em todos os espectros foram identificadas bandas características de OH, que aparecem na região entre 3600 e 3200 cm^{-1} , bem como bandas CH em aproximadamente 2900 cm^{-1} , outras bandas encontradas em todos os espectros foram em aproximadamente 1600 cm^{-1} referentes às ligações C=O que estão relacionadas com ligações de amida, entre 1500 e 1100 cm^{-1} verifica-se bandas CN relacionadas a ligações de aminas e na faixa de 800 cm^{-1} bandas CH características de aromáticos.

Figura 4. Análises de espectros de absorvância no infravermelho (FTIR). (A) óleo essencial de orégano, (B) óleo essencial de tomilho e (C) sinergismo dos óleos essenciais livres e encapsulados.

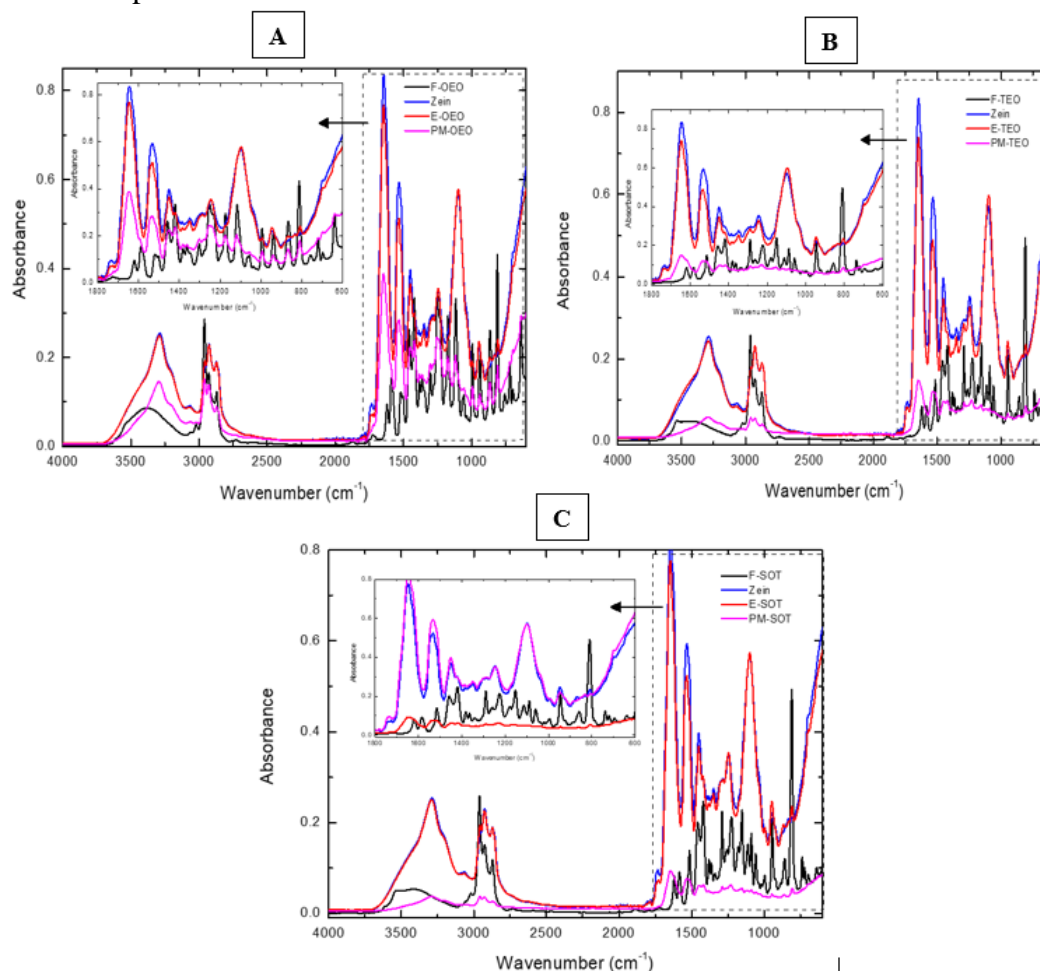


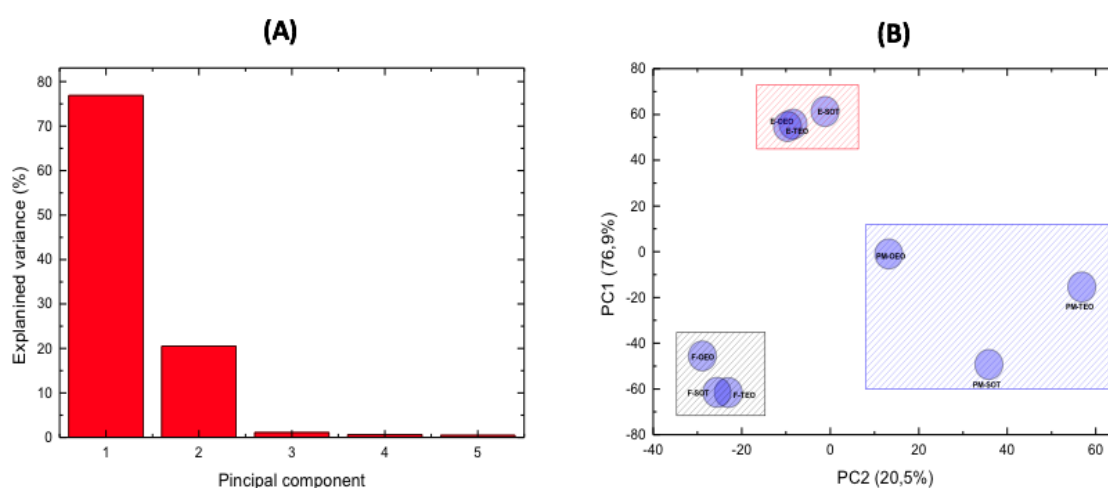
Figura A: F- OEO (óleo essencial de orégano sem encapsulação), E-OEO (óleo essencial de orégano encapsulado com zeína), PM- OEO (mistura física do óleo essencial de orégano com zeína). Figura B: F- OET (óleo essencial de tomilho sem encapsulação), E-OET (óleo essencial de tomilho encapsulado com zeína), PM- OET (mistura física do óleo essencial de tomilho com zeína). Figura C: F- SOT (sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho sem encapsulação), E-SOT (sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho encapsulados com zeína), PM- SOT (mistura física do sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho com zeína).

Fonte: Autoria própria

A análise dos componentes principais está disposta na Figura 5. A Figura 5 (A) expõe o gráfico com a porcentagem de variância explicada para os primeiros cinco componentes principais e a Figura 5 (B) mostra o gráfico entre os dois primeiros componentes principais (PC1 76,9% e PC2 20,5%), permitindo distinguir as três categorias de materiais: óleos essenciais livres (padrão sombreado em listras pretas),

óleos encapsulados com zeína (padrão sombreado em listras vermelhas) e misturas físicas entre zeína e óleos essenciais (padrão sombreado em listras azuis). Através da análise multivariada dos componentes principais (PCA), ficou evidente que a zeína atua na preservação dos constituintes dos óleos essenciais, seja por meio da encapsulação ou por mistura física, explicada pelas variações na posição no sistema de coordenadas geradas pelo PCA.

Figura 5. Análise do componente principal, (A) porcentagem de variância explicada para os primeiros cinco componentes principais e (B) gráfico dos dois primeiros componentes principais para os óleos essenciais.



Fonte: Autoria própria

3.5 Análise físico-química do queijo

A Tabela 5 apresenta os resultados das análises de pH e acidez titulável. Os resultados indicam que a adição dos óleos essenciais (puros ou encapsulados) no queijo não promoveu alterações nas características físicas químicas quando comparados à amostra controle.

Tabela 3- Análise de pH e acidez titulável do queijo minas frescal durante o período de armazenamento.

Análise Físico Química	Amostra	0	7	14	
pH	Controle	6,75±0,01 ^{Aa}	6,74±0,01 ^{Aa}	6,74±0,01 ^{Aa}	
	Nisina	6,78±0,01 ^{Aa}	6,78±0,01 ^{Aa}	6,76±0,01 ^{Aa}	
	Natamicina	6,79±0,01 ^{Aa}	6,78±0,01 ^{Aa}	6,76±0,01 ^{Aa}	
	Zeina Pura	6,78±0,01 ^{Aa}	6,78±0,01 ^{Aa}	6,76±0,01 ^{Aa}	
	Zeina + Sinergismo	6,78±0,01 ^{Aa}	6,77±0,01 ^{Aa}	6,77±0,01 ^{Aa}	
	Óleo essencial de Orégano	6,78±0,01 ^{Aa}	6,76±0,01 ^{Aa}	6,76±0,01 ^{Aa}	
	Óleo essencial de Tomilho	6,77±0,01 ^{Aa}	6,75±0,01 ^{Aa}	6,75±0,01 ^{Aa}	
	Óleo essencial Sinergismo	6,78±0,01 ^{Aa}	6,77±0,01 ^{Aa}	6,75±0,01 ^{Aa}	
	Óleo essencial de Orégano + Zeina	6,77±0,01 ^{Aa}	6,78±0,01 ^{Aa}	6,77±0,01 ^{Aa}	
	Óleo essencial de Tomilho + Zeina	6,76±0,01 ^{Aa}	6,77±0,01 ^{Aa}	6,75±0,01 ^{Aa}	
	Acidez titulável	Controle	0,17±0,00 ^{Aa}	0,17±0,00 ^{Aa}	0,17±0,00 ^{Aa}
		Nisina	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}
Natamicina		0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	
Zeina Pura		0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	
Zeina + Sinergismo		0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	
Óleo essencial de Orégano		0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	
Óleo essencial de Tomilho		0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	
Óleo essencial Sinergismo		0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	
Óleo essencial de Orégano + Zeina		0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	
Óleo essencial de Tomilho + Zeina		0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	0,18±0,00 ^{Aa}	

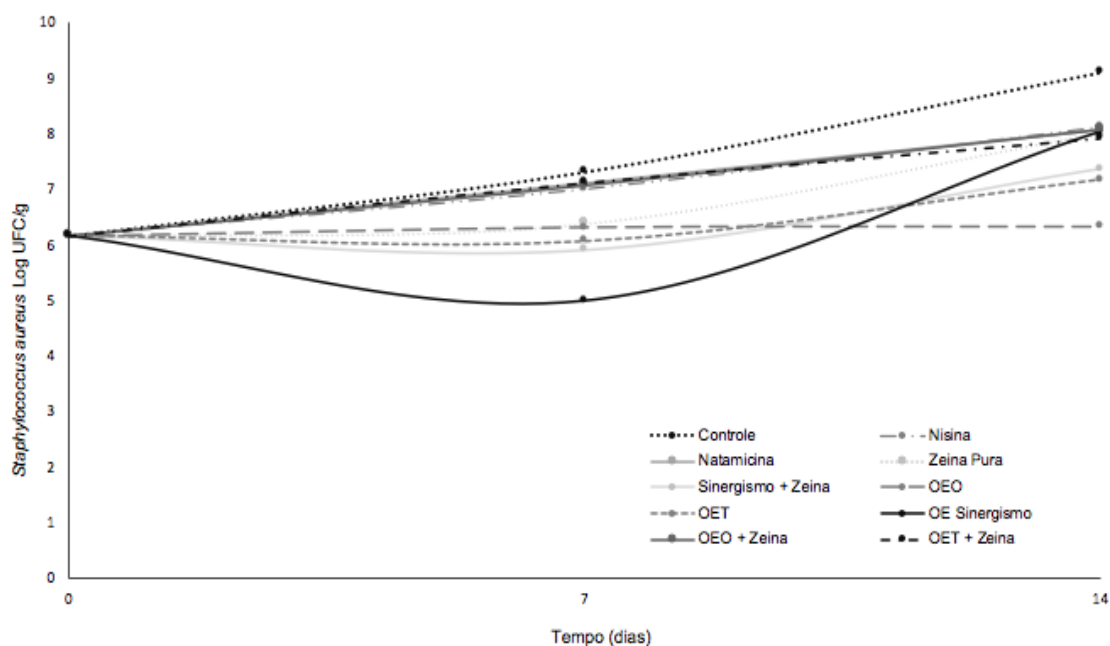
* Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula) na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% na análise de cada tempo entre as amostras. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas) nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% na análise dos tratamentos nos diferentes tempos.

Fonte: Autoria própria

3.6 Contagem de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal

O resultado da análise da contagem bacteriana em queijo minas frescal está disposto na figura 6. As amostras de queijos minas frescal foram intencionalmente contaminadas com *S. aureus* e no dia 0 todas as amostras apresentaram a contagem de 6,17 Log UFC/g. As análises foram realizadas em 7 e 14 dias de armazenamento. No sétimo dia de armazenamento, o tratamento T4 (sinergismo dos óleos essenciais de orégano e tomilho sem zeína) promoveu a redução de 1,17 Log UFC/g (6,17 para 5,0 Log UFC/g) em comparação ao controle (sem antimicrobiano) que apresentou aumento (6,17 para 7,32 Log UFC/g). No décimo quarto dia, todos os tratamentos obtiveram a contagem bacteriana inferior ao tratamento T1 (sem antimicrobiano) de 9,11 Log UFC/g, com destaque para o tratamento T6 (óleo essencial de orégano) 6,32 Log UFC/g comprovando a efetividade dos tratamentos.

Figura 6. Contagem de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal com adição de óleos essenciais de tomilho e orégano livres e encapsulados, sinergismo de óleos essenciais sem encapsular, sinergismo de óleos essenciais encapsulados com zeína, Controle (sem antimicrobiano), zeína, Natamicina e Nisina, e controle (sem antimicrobiano) durante o armazenamento de 14 dias.



OEO (Óleo essencial de orégano), OET (Óleo essencial de tomilho)

Fonte: Autoria própria

4 DISCUSSÃO

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais está associada aos seus constituintes que atuam sinergicamente para exercer seus efeitos (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021). Sua atuação pode ser atribuída à capacidade de romper a parede celular bacteriana e a membrana citoplasmática, pois na presença desses compostos são forçadas a alterar a síntese de ácidos graxos e proteínas de membrana para sobreviver, modificando a permeabilidade de sua parede celular afetando sua propagação (SAKKAS *et al.*, 2018).

No presente trabalho, o óleo essencial de tomilho apresentou os seguintes valores de CIM para *S. aureus* e *P. aeruginosa* (0,15 mg/mL), *L. monocytogenes* e *S. Typhi* (0,31 mg/mL), *B. cereus* (0,52 mg/mL) e *E. coli* (0,31 mg/mL). Radunz *et al.* (2020) relataram que o óleo essencial de tomilho teve CIM de 0,1 mg/mL para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhi* e *E. coli*. Gonçalves *et al.* (2017), analisaram o óleo de tomilho e a CIM foi de 0,125 mg/mL para *S. aureus* e 0,60 mg/mL para *Enterococcus faecium*. Em contrapartida, os resultados da CIM do tomilho no trabalho de Lages *et al.* (2021), para *S. aureus* e *E. coli*, foram de 9,17 mg/mL.

No trabalho de Granata *et al.* (2021), os óleos essenciais de orégano e tomilho foram encapsulados com quitosana pela técnica de gelificação iônica. Os valores de CIM para *S. aureus* com o óleo essencial de tomilho foram de 0,06 mg/mL com encapsulação e 2 mg/mL sem encapsulação, para *E. coli* 0,12 mg/mL com encapsulação e 2 mg/mL sem encapsulação; e para *L. monocytogenes* 0,03 mg/mL com encapsulação e 1 mg/mL sem encapsulação. Enquanto que para o óleo essencial de orégano os valores de CIM para *S. aureus* foram 0,03 mg/mL com encapsulação e 4 mg/mL sem encapsulação, para *E. coli* 0,06 mg/mL com encapsulação e 4 mg/mL sem encapsulação e para *L. monocytogenes* 0,03 mg/mL com encapsulação e 2 mg/mL sem encapsulação. Os autores concluíram que o sistema de nanoencapsulação foi eficaz para aumentar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, pois facilitam a difusão dos mesmos pela membrana celular bacteriana.

Os óleos essenciais de tomilho e orégano em combinação no presente estudo apresentaram atividade antibacteriana sinérgica em *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhi*. O sinergismo é uma alternativa para reduzir a concentração utilizada,

minimizando possíveis alterações indesejadas nas características sensoriais dos alimentos como as alterações no aroma e sabor. (BATISTA *et al.*, 2019).

O efeito combinado de alguns compostos individuais pode aumentar sua atividade antibacteriana (BASAVEGOWDA; BAEK, 2021). Em muitos casos a atividade antibacteriana é resultante da interação, ou seja, do sinergismo entre as diferentes classes de compostos presentes nos óleos essenciais como fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, éteres e hidrocarbonetos. Os óleos essenciais que possuem aldeídos, fenóis, citral, carvacrol, eugenol ou timol como componentes principais, apresentaram a maior atividade antibacteriana, seguidos pelos que possuem álcoois terpenos (BURT, 2004).

Lee *et al.* (2020), confirmaram que a combinação de óleos essenciais de orégano e tomilho apresentou uma atividade antibacteriana sinérgica frente a *Leuconostoc citreum* em suco de tomate com FIC de 0,37 e CIM de 1,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. No presente trabalho a concentração inibitória fracional teve como resultado 0,09 para *S. aureus*, 0,07 para *S. Typhi* e *L. monocytogenes* e 0,27 para *E. coli*, indicando sinergismo entre os óleos.

As análises térmicas realizadas para caracterização dos óleos essenciais encapsulados mostraram que a encapsulação com zeína foi eficiente, protegendo o óleo essencial e aumentando sua estabilidade. Segundo Froiio (2019), a encapsulação dos óleos essenciais aumenta a estabilidade dos seus compostos ativos. De acordo com os resultados da análise termogravimétrica (TGA), os óleos essenciais sem o revestimento com zeína tiveram o início da degradação térmica na faixa de temperatura entre 60 a 100 $^{\circ}\text{C}$, e os encapsulados por volta de 270 $^{\circ}\text{C}$. No trabalho de Radunz *et al.* (2020), o óleo essencial de tomilho sem encapsulação apresentou perda de massa em temperaturas próximas a 200 $^{\circ}\text{C}$ e o encapsulado acima de 300 $^{\circ}\text{C}$. Hajjari *et al.* (2021) relataram a degradação da zeína entre 250 e 450 $^{\circ}\text{C}$ e a relacionaram com a degradação de ligações covalentes internas.

Em relação aos espectros de absorvância no infravermelho (FTIR) foram identificadas bandas características de OH, que aparecem na região entre 3600 e 3200 cm^{-1} . Rasteh *et al.* (2024), atribuíram a largura do pico de 3.500 a 2.500 cm^{-1} a ligação de hidrogênio intermolecular, alegando que a zeína torna essa ligação mais proeminente. Bandas CH em aproximadamente 2900 cm^{-1} , também foram encontradas em todos os espectros, e segundo Peixoto *et al.* (2023) as bandas CH em aproximadamente 2900 cm^{-1} estão relacionadas a grupos alifáticos presentes na estrutura da zeína. Outras bandas

evidenciaram-se na faixa de 1600 a 1100, e de acordo com Alsakhawy *et al.* (2022) os picos em torno de 1700 e 1200 cm^{-1} são característicos da vibração de estiramento C=O e CO de terpenos oxigenados. O espectro também identificou o pico de 800 cm^{-1} bandas CH características de anéis aromáticos. Rasteh *et al.* (2024) associaram o pico na faixa de 810 cm^{-1} à presença do timol nos óleos essenciais.

A adição de óleos essenciais encapsulados em alimentos vem sendo amplamente estudada. Rosa *et al.* (2020), adicionaram nanocápsulas de orégano e tomilho revestidas por zeína em pão, as nanocápsulas apresentaram alta resistência térmica, protegendo os óleos essenciais da degradação durante o processo de cozimento a 200 °C garantindo sua estabilidade, sendo capazes de promover a ausência de bolores e leveduras no período de armazenamento de 21 dias. Wu, Luo e Wang (2012), demonstraram que o encapsulamento de óleos essenciais em nanopartículas de zeína pode aumentar sua solubilidade em água em até 14 vezes, facilitando a aplicação dos óleos essenciais em alimentos, contribuindo para a atividade antibacteriana. A adição dos óleos essenciais encapsulados no queijo, promoveu a redução do odor característico dos óleos essenciais quando comparados aos queijos com a adição dos óleos essenciais sem encapsulação.

Bilenler *et al.* (2015), analisaram as propriedades antibacterianas do óleo essencial de tomilho livre e encapsulado com zeína, e obtiveram as CIM para: *S. aureus* (0,125-250 mg/mL), *B. cereus* (0,0625-125 mg/mL); *Enterococcus faecalis* (0,125-250 mg/mL), *E. coli* (0,25-500 mg/mL), *Shigella flexneri* (0,25-500 mg/mL) e *Salmonella* sp. (0,5-1000 mg/mL). Makimori *et al.* (2020), avaliaram o óleo essencial de canela, a CIM do óleo livre foi encontrada entre 125-250 mg/mL, enquanto encapsulado foi de 220,5-440,5 mg/mL, deste modo chegaram ao mesmo resultado do presente trabalho onde a encapsulação aumentou a concentração inibitória mínima. Segundo Makimori *et al.* (2020) o aumento da concentração inibitória mínima se deve ao fato de a encapsulação promover a liberação controlada dos óleos essenciais, levando mais tempo para sua ação

Na análise antibacteriana em queijo minas frescal, no sétimo dia de armazenamento, a adição dos óleos essenciais de orégano e tomilho em sinergismo (sem encapsulação) promoveu a redução de 1,17 Log UFC/g (de 6,17 para 5,0 Log UFC/g) em comparação ao controle (6,16 Log UFC/g). No décimo quarto dia, o tratamento com óleo essencial de orégano teve a contagem de 6,32 Log UFC/g enquanto a amostra controle (sem antimicrobiano) 9,11 Log UFC/g. Artiga-Artigas *et al.* (2017), avaliaram a atividade

antibacteriana do óleo essencial de orégano encapsulado com alginato de sódio e fibra de tangerina, a contagem de *S. aureus* teve diminuição de 6,0 para 4,6 Log UFC/g no décimo quinto dia de armazenamento.

A adição do óleo essencial de orégano em queijo minas foi avaliada por Campos *et al.* (2022), a qual a adição de 0,02% (v/v), inibiu *S. aureus* e *E. coli* durante o armazenamento de 30 dias, proporcionando a redução de 7 Log UFC/g na contagem de *S. aureus* na primeira hora após sua adição ao queijo. Os valores de CIM obtidos foram 0,06% (v/v) para *E. coli* e 0,31% para *S. aureus*,

Carvalho *et al.* (2015) tiveram redução na contagem de *L. monocytogenes* de aproximadamente 1 Log UFC/mL após 24 h da adição de 1,25 mL/mL de óleo essencial de tomilho em queijo. Fernandes *et al.* (2017), avaliaram o efeito da adição de óleo essencial de alecrim microencapsulado com inulina e isolado proteico de soro de leite em queijo minas frescal e relataram que houve redução de 1,36 log UFC/g na contagem de bactérias mesófilas em 3 dias e 0,73 log UFC/g no final de 15 dias. Melo *et al.* (2020), adicionaram o óleo essencial de capim limão microencapsulado com goma arábica e maltodextrina em queijo coalho, as quais promoveram a inibição do crescimento de microrganismos e coliformes em 1,18 log UFC/g por 21 dias de armazenamento.

Com isso nota-se que os óleos essenciais de orégano e tomilho possuem atividade antibacteriana e efeito sinérgico, e a encapsulação pode facilitar a inserção destes em matrizes alimentares sendo promissores como conservantes naturais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A combinação dos óleos essenciais de orégano e tomilho mostrou efeito sinérgico, característica importante para a reduzir a concentração, que juntamente com a técnica de encapsulação favorece a aplicabilidade dos óleos essenciais em alimentos reduzindo possíveis alterações sensoriais. Os queijos adicionados dos óleos essenciais encapsulados com zeína apresentaram redução do odor quando comparados aos queijos adicionados dos óleos essenciais sem encapsulação.

As análises térmicas realizadas para caracterização dos óleos essenciais encapsulados mostraram que a encapsulação com zeína foi eficiente, protegendo o óleo essencial e aumentando sua estabilidade térmica.

No décimo quarto dia de armazenamento do queijo minas frescal, todos os tratamentos demonstraram contagens inferiores de células viáveis de *S. aureus* comparados à amostra controle (somente com inóculo, sem tratamento antimicrobiano), demonstrando a efetividade dos conservantes analisados.

Tendo em vista o futuro promissor da utilização de óleos essenciais na indústria de alimentos, os óleos essenciais de orégano e o tomilho apresentam-se como alternativa, pois são conhecidas como plantas condimentares, empregadas com o objetivo de aumentar a aceitabilidade e melhorar o sabor dos alimentos e a combinação desses óleos essenciais aumentou o espectro de ação antibacteriana, podendo promover melhor efeito conservante em alimentos.

6 AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), UNIPAR (Universidade Paranaense), FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela taxa de estudante e financiamento de pesquisa, a UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) de Campo Mourão e a Central Analítica Multiusuário da UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) de Medianeira pela realização das análises térmicas para a caracterização dos óleos essenciais encapsulados.

7 REFERÊNCIAS

ALSAKHAWY, Sara A.; BAGHDADI, Hoda H.; EL-SHENAWY, Moustafa A.; SABRA, Sally A.; EL-HOSSEINY, Lobna S. Encapsulation of *Thymus vulgaris* essential oil in caseinate/gelatin nanocomposite hydrogel: In vitro antibacterial activity and in vivo wound healing potential. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 628, nov. 2022.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F.J.; BARRAJON-CATALAN, E.; HERRANZ-LOPEZ, M.; MICOL, V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**. v. 90, set. 2021.

ARTIGA-ARTIGAS, María; ACEDO-FANI, Alejandra; MARTIN-BELLOSO, Olga.

Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. **Food Control**. v.76, p. 1-12, jun. 2017.

BATISTA, Andreia Farias Pereira; DOS SANTOS, Adriele Rodrigues; DA SILVA, Alex Fiori; TREVISAN, Daliah Alves Coelho; RIBEIRO, Leonardo Henrique; CAMPANERUT-SA, Paula Aline Zanetti; FILHO, Benicio Alves de Abreu; JUNIOR, Miguel Machinski; MIKCHA, Jane Martha Graton. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by combined carvacrol and potassium sorbate in vitro and in tomato paste. **LWT**. v. 100, p. 92-98, fev. 2019.

BASAVEGOWDA, Nagaraj; BAEK, Kwang-Hyun. Synergistic Antioxidant and Antibacterial Advantages of Essential Oils for Food Packaging Applications. **Biomolecules**. v.11, n.9, 2021.

BILENLER, Tugca; GOKBULUT, Incilay; SISLIOGLU, Kubra; KARABULUT, Ihsan. Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles. **Flavour and Fragrance Journal**. v.30, p.392–398, 2015.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, p. 223-253, mar. 2004.

BRASIL (1996). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Portaria nº 146, de 07/03/1996. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 11/03/1996.

BRASIL (2017). Decreto 9.013, De 29 De Março De 2017. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm. Acesso em: 03 de novembro de 2023.

CAMPOS, Anna Carolina Leonelli Pires; NANDI, Renata Daniela Saldanha; SCANDORIEIRO, Sara; GONCALVES, Marcelly Chue; REIS, Guilherme Fonseca; DIBO, Miriam; MEDEIROS, Leonardo Pinto; PANAGIO, Luciano Aparecido; FAGAN, Eder Paulo; KOBAYZSHI, Renata Katsuko Takayama NAKAZATO, Gerson. Antimicrobial effect of *Origanum vulgare* (L.) essential oil as an alternative for conventional additives in the Minas cheese manufacture. **LWT**. v.157, mar. 2022.

CARVALHO, Rayssa Julliane; DE SOUZA, Geanny Targino; HONÓRIO, Vanessa Gonçalves; DE SOUZA, Jossana Pereira; DA CONCEICAO, Maria Lúcia, MAGANANI, Marciane; DE SOUZA, Evandro Leite. Comparative inhibitory effects of

Thymus vulgaris L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**. v. 52, p.59-65, jul. 2015.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests**. Approved Standard M07-A10. CLSI, Wayne, 2015.

CHISHTI, Shayista; KALOO, A. Zahoor; SULTAN, Phalestine. Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**. v. 5, n. 10, p.170-178, out. 2013.

CHRISTAKI, Stamatia, MOSCHAKIS, Thomas, KYRIAKOUDI, Anastasia, BILIADERIS, Costas G., MOURTZINOS, Ioannis Mourtzinis. Recent advances in plant essential oils and extracts: Delivery systems and potential uses as preservatives and antioxidants in cheese. **Trends in Food Science & Technology**. v.116, p. 264-278, out. 2021.

DAUQAN, M. A. Eqbal; ABDULLAH, Aminah. Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**. v. 5, n. 2, p. 17-22, mar./abr. 2017.

FERNANDES, Regiane Vitoria Barros; Guimarães, Isabela Costa; FERREIRA, Christiane Lara Rodrigues; BOTREL, Diego Alvarenga; BORGES, Soraia Vilela; SOUZA, Amanda Umbelina. Microencapsulated Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil as a biopreservative in minas frescal cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 41, p. 1-9, fev. 2017.

FERREIRA, Laura Dantas; SANTOS, Eliana de Souza Marques. Contaminação bacteriana em queijo minas frescal: revisão de literatura. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**. v. 3, n. 3, set. 2022.

FREDERICO, Camila; MENDES, Suelen Sorato; FRANCISCATO, Lidiane Mariah Silva dos Santos; DE SOUZA, Stéfany Cordeiro; DE OLIVEIRA, Kátia Castilho; FARIA, Maria Graciela Iecher; GAZIM, Zilda Cristiani; RUIZ, Suelen Pereira. Antibacterial potential of essential oils from medicinal plants for food preservation: a review. **Medicinal Plant Communications**. v.4, n.1, p.14-22, 2021.

FROIO, Francesca; MOSADDIK, Ashik; MORSHED, Mahmud Tareq; PAOLINO, Donatella Paolino; FESSI, Hatem Fessi; ELAISSARI, Abdelhamid. Edible Polymers for Essential Oils Encapsulation: Application in Food Preservation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 58, p. 20932–20945, set. 2019.

GONCALVES, Nathalia Dias; PENA, Fabíola de Lima; SARTORATTO, Adilson; DERLAMELINA, Camila; DUARTE, Marta Cristina Teixeira; ANTUNES, Adriane Elisabete Costa; PRATA, Ana Silvia. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**. v. 96, p. 154-160, jun. 2017.

GRANATA, Giuseppe; STRAQUADANIO, Stefano; LEONARDO, Marco; NAPOLES, Eduardo; MALANDRINO, Graziella; CAFISO, Viviana; STEFANI, Stefania; GERACI, Corrada. Óleos essenciais de orégano e tomilho encapsulados em nanopartículas de quitosana como agentes antimicrobianos eficazes contra patógenos de origem alimentar. **Molecules**. v. 26, n. 13, jul. 2021.

HAJJARI, Mohammad Mahdi; GOLMAKANI, Mohammad-Taghi; SHARIF, Niloufar; NIAKOUSARI, Mehrdad. In-vitro and in-silico characterization of zein fiber incorporating cuminaldehyde. **Food and Bioproducts Processing**. v. 128, p. 166-176, jul. 2021.

HU, Kun; MCCLEMENTS, David Julian. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. **Food Research International**. v. 64, p.329–335, 2014.

JASKI, Ana Caroline; SCHIMITZ, Francielle; HORTA, Rayta Paim; CADORIN, Larissa; GONCALVES DA SILVA, Bruno José; ANDREAUS Jürgen; PAES, Maria Cristina Dias; RIEGEL-VIDOTTI, Izabel C; ZIMMERMANN, Lizandra Maria. Zein - a plant-based material of growing importance: New perspectives for innovative uses. **Industrial Crops and Products**. v. 186, 2022.

KAUR, Jashandeep; KAUR, Gurkirat; SHARMA, Savita; JEET, Kiran. Cereal Starch Nanoparticles- A Prospective Food Additive: A Review. **Critical reviews in food science and nutrition**. v. 58, n. 7, p.1097-1107, 2018.

LAGES, Leticia Zarnott; RADUNZ, Marjana; GONCALVES, Bruna Timm Gonçalves; DA ROSA, Rafaela Silva; FOUCHY, Marina Vieira; DA CONCEICAO, Rita de Cassia dos Santos; GULARTE, Marcia Arocha; MENDONCA, Carla Rosane Barboza; GANDRA, Eliezer Avila. Microbiological and sensory evaluation of meat sausage using thyme (*Thymus vulgaris*, L.) essential oil and powdered beet juice (*Beta vulgaris* L., Early Wonder cultivar). **LTW**. v.148, 2021.

LEE, Sohyun; KIM, Hoikyung; BEUCHAT, Larry R.; KIM, Yoonsook Kim; RYU, Jee-Hoon. Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. **Food Microbiology**. v.20, 2020.

LI, Songnan; HUANG, Liang; ZHANG, Bin; CHEN, Chun; FU, Xiong; HUANG, Qiang. Fabrication and characterization of starch/zein nanocomposites with pH-responsive emulsion behavior. **Food Hydrocolloids**. v. 112, 2021.

LOVISON, Marília Moraes; MAROSTEGAN, F.P.Luís; PERES, S. Marina; MENEZES, F. Isabela; GHIRALDI, Marlucci; RODRIGUES, A.F. Rodney; FERNANDES, M. Andrezza; PINHO, C. Samantha. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pate. **Food Science and Technology**. v. 77, p. 233-240, nov. 2017.

MAKIMORI, R. Y.; ENDO, E.H; MAKIMORI, J.W; ZANQUETA, E. B.; UEDA-NAKAMURA, T.; GONÇALVES, O.H.; DIAS FILHO, B.P. Preparation, characterization and antidermatophytic activity of free- and microencapsulated cinnamon essential oil. **Journal of Mycologie Médicale**. v. 30, p.1-7, jan. 2020

MELO, Anely Maciel; BARBI, Rafaela Cristina Turola; SOUZA, Weysser Felipe Candido; LUNA, Lais Costa; SOUZA, Hugo Junior Barboza Souza; LUCENA, Guilherme Leocárdio; QUIRINO, Max Rocha; SOUZA, Solange. Microencapsulated lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) essential oil: A new source of natural additive applied to Coalho cheese. **Journal food Process Preservation**. v. 44, p. 1-12, jul. 2020.

MORAIS, Lilia Aparecida Salgado. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 2, p. 4050-4063, ago. 2009.

MORAIS, Joyce Fernandes; DE ARAUJO, Januse Míllia Dantas; NETA, Maria Luiza Pontes Machado; ARRUDA, Lara Cristina Silva; DE FARIAS, *FERNANDES*, Jessyca Talyta; PONTES, Edson Douglas Silva; DE OLIVEIRA, Natália Dantas. Importância do Controle Microbiológico com Relação às Doenças Transmitidas Por Alimentos. **International Journal of Nutrology**. v.11, n.1, p. 324-327, 2018.

MUNDIAL DO QUEIJO DO BRASIL. Sugestão nº 34/2023 - 3º Mundial do Queijo do Brasil. Disponível em: https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=2356983&filenome=SUG%2034/2023%20CLP. Acesso em 10 de março de 2025.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, n.1, p.1-1, jun. 2003.

PEIXOTO, Eduarda Caetano; FONSECA, Laura Martins; ZAVAREZE, Elessandra da Rosa; GRANDA, Eliezer Avila. Antimicrobial active packaging for meat using thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) encapsulated on zein ultrafine fibers membranes,

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. v. 51, ago. 2023.

RADUNZ, Marjana; HACKBART, Helen Cristina dos Santos; CAMARGO, Taine Mota; NUNES, Camila Francine Paes Nunes; BARROS, Felipe Antonio Primon; MAGRO, Jacir Dal; FILHO, Pedro Jose Sanches; GANDRA, Eliezer Avila; RADUNZ, Andre Luiz; ZAVAREZE, Elessandra da Rosa. Antimicrobial potential of *spray drying* encapsulated thyme (*Thymus T vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 2, n. 330, p. 1-8, maio 2020.

RASTEH, Iman; PIRNIA, Mahdi; MIRI, Mohammad Amin; SARANI, Shirahmad. Encapsulation of *Zataria multiflora* essential oil in electrosprayed zein microcapsules: Characterization and antimicrobial properties. **Industrial Crops and Products**. v. 208, fev. 2024.

REDDY, Prasanth; KANDISA, Ravi Vital; VARSHA P. V.; SATYAM, S. Review on *Thymus vulgaris* Traditional Uses and Pharmacological Properties. **Medicinal and Aromatic Plants**. v. 3, n. 3, p. 1-4, ago. 2014.

RESHMA, Anns; REKHA, Ramesan. Zein - A plant protein as a promising biopolymer for biomedical applications: A perspective. *Journal of Polymer Science and Engineering*. v. 7, n.1, abr. 2024.

ROSA, Cleonice Gonçalves; DE MELO, Ana Paula Zapelini; SGANZERLA, William Gustavo; MACHADO, Michelle Heck; NUNES, Michael Ramos; MACIEL, Matheus Vinicius de Oliveira Brisola; BERTOLDI, Fabiano Cleber; BARRETO, Pedro Luiz Manique. Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**. v. 99, 2020.

SAKKAS, Hercules; ECONOMOU, Vangelis; GOUSIA, Panagiota; BOZIDIS, Petros; SAKKAS, Vasilios A.; PETSIOS, Stefanos; MPEKOULIS, George; ILIA, Afrodite; PAPADOPOULOU Chrissanthy. Antibacterial Efficacy of Commercially Available Essential Oils Tested Against Drug-Resistant Gram-Positive Pathogens. **Applied Sciences**. v. 8, 2018.

SANTOS, Pamela Silva; LOURIVAL, Natalia Brandao Santos. Consumo de compostos químicos oriundos de embutidos e sua correlação com o desenvolvimento do câncer: uma revisão. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**. v. 34, n. 67, p. 73-83, mar. 2019.

SHARIF, Niloufar; FABRA, Maria José; LOPEZ-RUBIO, Amparo. Nanostructures of zein for encapsulation of food ingredients. Cap. 9: Nanoencapsulation in the Food Industry. **Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes**. v.1, p. 217-245, 2019.

SILVA, Neusely da Junqueira, AMSTADELDEN, Valéria Christina; SILVEIRA, Neliane Ferraz de Arruda; TANIWAKI, Marta Hiromi; SANTOS, Rosana Francisco Siqueira; GOMES, Renato Abeilar Romeiro. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo; Blucher; 6 ed., 602 p. 2021.

WARMATE, Dein; ONARINDE, Bukola A. Food safety incidents in the red meat industry: A review of foodborne disease outbreaks linked to the consumption of red meat and its products, 1991 to 2021. **International Journal of Food Microbiology**. v. 398, ago.2023.

WU, Yunpeng; LUO, Yaguang; WANG, Qin. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**. v. 48 p. 283-290, 2012.

XAVIER, Leandra Oliveira; SGANZERLA, William Gustavo; ROSA, Gabriel Bachega; DA ROSA, Cleonice Gonçalves; AGOSTINETTO, Lenita; VEECK, Ana Paula de Lima; BRETANHA, Lizandra Czermainski; MICKE, Gustavo Amadeu; COSTA, Murilo Dalla; BERTODI, Fabiano Cleber; BARRETO, Pedro Luiz Manique; NUNES, Michael Ramos. Chitosan packaging functionalized with *Cinnamodendron dinisii* essential oil loaded zein: A proposal for meat conservation. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.169, p. 183-193, 2020.

ZHU, Yulinzhu; LI, Chang, CUI, Haiyng; LIN, Lin. Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. **Food Control**. v. 123, 2021.

CAPÍTULO IV

Combinação de óleos essenciais, Sorbato de Potássio e Nisina frente a bactérias patogênicas e aplicação em purê de tomate

RESUMO

A contaminação microbiana é um inconveniente nas indústrias alimentícias, podendo ocasionar doenças de origem alimentar, deste modo o uso de aditivos conservantes se faz necessário para evitar a proliferação de microrganismos patogênicos. Portanto, devido à busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis, procura-se diminuir cada vez mais o uso de aditivos sintéticos. Considerando a demanda por novos produtos naturais para controle de microrganismos, este estudo teve como objetivo analisar a atividade antibacteriana e sinérgica dos conservantes sorbato de potássio e nisina e dos óleos essenciais de orégano e tomilho e aplicar em purê de tomate. A atividade antibacteriana e sinérgica foram avaliadas frente a bactérias patogênicas de origem alimentar pelo método de microdiluição em caldo. Preparo do purê de tomate com adição de tratamentos F1: controle (somente inóculo - sem conservantes); F2: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de tomilho 50%; F3: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de orégano 50%; F4: óleo essencial de orégano; F5: óleo essencial de tomilho e F6: sorbato de potássio para análise da viabilidade de células microbianas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhi ATCC 19214. No teste de sinergismo foi verificado que a associação do óleo essencial de orégano 50% com sorbato de potássio 50% apresentou melhor atividade antibacteriana, com CIM de 2,08/0,21 para *Escherichia coli*. Na análise da atividade antibacteriana em purê de tomate, todos os antimicrobianos foram efetivos contra *Salmonella* Typhi quando comparados à amostra controle (somente com inóculo, sem conservantes). Sendo assim, conclui-se que há sinergismo entre os antimicrobianos sintéticos e os óleos essenciais, indicando uma possibilidade para que as indústrias de alimentos reduzam o uso dos aditivos sintéticos com o uso dessas associações em seus produtos.

Palavras-Chave: Aditivos. *Origanum vulgare*. *Thymus vulgaris*. *Solanum lycopersicum*. Sinergismo.

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) representam um desafio à saúde pública mundial. Problemas relacionados à qualidade da matéria-prima, etapas da fabricação, bem como o armazenamento do produto podem favorecer a proliferação de microrganismos patogênicos alimentares (MORAIS *et al.*, 2018). Segundo a Organização Panamericana da Saúde (OPAS), as DTAs geram perdas anuais de US\$ 7.4 milhões, sobrecarregando os sistemas de saúde e reduzindo o desenvolvimento econômico (OPAS, 2022). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 600 milhões de pessoas em todo o mundo são acometidas por DTAs e que aproximadamente 420.000 vêm a óbito (OMS, 2019).

As principais bactérias associadas às doenças transmitidas por alimentos são *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Staphylococcus aureus* (GALLO *et al.*, 2020).

Para evitar a contaminação e ampliar o tempo de vida útil dos alimentos, utilizam-se conservantes antimicrobianos sintéticos, porém estes podem causar toxicidade, dependendo da susceptibilidade do organismo e da quantidade ingerida (BENSID *et al.*, 2020). Ácido sórbico: efeitos irritantes sobre a pele; Ácido benzóico: irritações gástricas e desordens de natureza neurológica; Dióxido de enxofre: irritante do aparelho digestivo; Metabissulfito de sódio: irritação gástrica, devido à liberação do ácido sulfuroso, reações alérgicas na pele e redução dos teores de tiamina; Nitrito e nitrato: potencialmente carcinogênicos (ASAE, 2025). Desta forma, novas estratégias vêm sendo exploradas, buscando antimicrobianos naturais eficazes e que contribuam para a segurança do produto, como os óleos essenciais (FREDERICO *et al.*, 2023).

Os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário das plantas, voláteis, possuem odor e sabor marcantes e apresentam compostos bioativos que exercem atividades conservantes. A maioria dos óleos essenciais de plantas medicinais e especiarias como orégano e tomilho são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) para utilização em alimentos pelo Food and Drug administration (FDA) (Food and Drug administration/CRF21, 2016).

Thymus vulgaris (tomilho) e *Origanum vulgare* (orégano) pertencem à família Lamiaceae e apresentam atividades antibacteriana e antioxidante, características importantes na conservação de alimentos (LEE *et al.*, 2020). O tomilho é uma planta aromática perene, apresenta subarbustos de 10-40 cm de altura com caules avermelhados, folhas cinza-esverdeadas ovais pequenas, cachos de flores brancas, rosa ou roxas durante o final da primavera e início do verão (POSGAY *et al.*, 2022). O orégano, uma erva rizomatosa e perene atingindo no máximo, 1 metro de altura, seus ramos são eretos e ramificados, suas folhas são ovaladas, suas flores se encontram em espigas, podem ser verdes, avermelhadas ou arroxeadas (CORDEIRO, 2020).

O sorbato de potássio é utilizado como conservante alimentar, apresenta atividade antimicrobiana contra bolores, leveduras e bactérias (DE ALMEIDA *et al.*, 2023). Inibe o crescimento microbiano induzindo alterações na morfologia, integridade e função das membranas celulares, é reconhecido com GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) (EFSA, 2015).

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma fruta climatérica com produção mundial anual de aproximadamente 182 milhões de toneladas, altamente valorizado pela abundância de compostos nutricionais que contribuem para seu sabor agridoce, podem ser consumidos de diversas formas, fruto, molho, sopa, suco, tomate enlatado, ketchup e bebidas (KHALID *et al.*, 2024).

Concentrado de Tomate é o produto resultante da concentração da polpa de frutos maduros, são e limpos do tomateiro (*Lycopersicum esculentum*), através de processos de concentração, com ou sem homogeneização, devendo conter no mínimo 6% de sólidos solúveis naturais de tomate. O produto pode conter sal e ou açúcares (BRASIL, 2003).

Produtos derivados do tomate são suscetíveis à contaminação por *Salmonella* sp. devido a possível presença desse microrganismo no solo e na água (GURTLER *et al.*, 2018). Deste modo o sorbato de potássio é adicionado como conservante em extratos e molhos de tomate (BRASIL, 2013).

O sinergismo dos óleos essenciais com os conservantes sintéticos promove a potencialização da atividade por meio da associação entre eles, sendo uma alternativa para reduzir a concentração do conservante sintético associado negativamente a efeitos tóxicos, bem como a redução da concentração do óleo essencial utilizada, minimizando

possíveis alterações indesejadas nas características sensoriais dos alimentos (BATISTA *et al.*, 2019). Sinergismo, ocorre quando a combinação de duas ou mais substâncias promovem um efeito desejado mais efetivo, em comparação aos efeitos individuais da substância (BRITO *et al.*, 2021).

Batista *et al.* (2019) aplicaram o composto isolado carvacrol em combinação com sorbato de potássio em extrato de tomate, porém até o momento existem poucos trabalhos realizados utilizando o sinergismo de óleos essenciais e aplicação em produtos derivados do tomate. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial sinergismo entre os óleos essenciais de orégano e tomilho com conservantes sintéticos frente a bactérias associadas a doenças transmitidas por alimentos e aplicar em purê de tomate.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano e tomilho foram obtidos da empresa Ferquima Indústria e Comércio LTDA (Vargem Grande - São Paulo).

Óleo essencial de orégano: Lote: 240, Fabricação: julho de 2021, Validade: julho de 2023. Componentes principais: carvacrol 72%, p-cimeno 5%, γ -terpineno 4,8%, linalol 3%, β -cariofileno 3%. Óleo essencial de tomilho: Lote: 197, Fabricação: julho de 2021, Validade: julho de 2024. Componente principal: timol 47,57%

2.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

2.2.1 Microrganismos e preparo do inóculo

As espécies bacterianas usadas na pesquisa foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. sorovar Typhi ATCC 19214, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Os microrganismos foram provenientes do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Vegetais e de Microrganismos da Universidade Paranaense. Para os ensaios, as células bacterianas foram cultivadas por 24 horas. A concentração do inóculo foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) com solução salina estéril (0,85%) sendo confirmada a concentração medindo a absorbância a 625 nm em um espectrofotômetro (Spectra Max Plus). Em seguida, a suspensão foi diluída 1:10 em caldo Mueller-Hinton para obter densidade celular de $1,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, e o inóculo foi utilizado nos ensaios (CLSI, 2015).

2.2.2 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo

Foi realizado um *screening* para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada microrganismo frente aos conservantes e óleos essenciais por meio da técnica de microdiluição em caldo em série usando microplacas de 96 poços. A CIM foi determinada de acordo com o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2015) modificado para produtos naturais. Foi utilizada uma concentração inicial de 200 mg/mL para o conservante sorbato, 100 mg/mL para o conservante nisina e 20 mg/mL para óleos essenciais dissolvidos em polisorbato 80 a 2 %. Foram adicionados 50 μ L de meio de cultura caldo Muller Hinton e posteriormente os óleos essenciais ou conservantes, sendo realizadas a diluição seriada 1:2. Após a diluição seriada, 50 μ L do inóculo foi adicionado a cada poço e submetido à incubação por 35 °C por 24 h. A leitura foi realizada com a

adição de 20 µl de revelador 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (Reatec®) a 1,0% em cada poço seguida de incubação das microplacas a 35 °C por 20 min. O CIM foi definido como a menor concentração que resultou na inibição do crescimento visual. Concentração bactericida mínima foi determinada pelo subcultivo de 10 µL de cada poço em ágar Muller Hinton. As placas foram incubadas à 35 °C por 24 h e realizadas a leitura.

2.3 Desenvolvimento do purê de tomate

O purê de tomate foi preparado com tomates do tipo rasteiros maduros adquiridos no comércio local de Umuarama-PR. Foram selecionados manualmente, descartando-se os frutos que apresentavam danos mecânicos e fungos. Em seguida, os tomates foram lavados e sanitizados com hipoclorito de sódio a 100 ppm. Após, os tomates foram colocados em água fervente por 1 minuto para facilitar a remoção da casca. As sementes do tomate também foram removidas. Os tomates sem casca e sem semente foram triturados em liquidificador doméstico e peneirados. A polpa obtida da trituração foi transferida para uma panela de aço inoxidável e levada para cozimento e evaporação até que atingisse 9° Brix. Não foram adicionados sal e condimentos no purê para que não ocorressem interferências desses com os conservantes antimicrobianos analisados.

Após o preparo, 20 mL de purê de tomate foi acondicionado em frascos de vidro estéreis e levados à pasteurização em fogão industrial por 20 minutos. Os conservantes foram adicionados ao purê de tomate pasteurizado em ambiente estéril, sendo homogeneizados com bastão de vidro esterilizado.

Foram testadas as seguintes formulações F1: controle (somente inóculo - sem conservantes); F2: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de tomilho 50%; F3: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de orégano 50%; F4: óleo essencial de orégano; F5: óleo essencial de tomilho e F6: sorbato de potássio. Posteriormente em cada frasco das formulações, foram adicionados 10⁶ UFC/mL de inóculo (preparado previamente em solução salina 0,85% estéril). Os purês foram armazenados em temperatura ambiente por 7 dias.

2.4 Análise microbiológica do purê de tomate

Os purês de tomate foram submetidos à contagem de células microbianas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhi ATCC 19214 após 7 dias de armazenamento. Para cada tratamento, 10 g de amostra foi adicionada a 90 mL de água

peptonada estéril a 0,1%, sendo denominada de diluição 10^{-1} , posteriormente diluições seriadas de até 10^{-7} foram utilizadas para realizar as análises. Para a identificação de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhi ATCC 19214, e semeados 100 μ L de cada diluição na superfície do ágar EMB (Agar Eosina Azul de Metileno), em triplicata. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24h e realizadas as leituras e os resultados apresentados em Log UFC/g (SILVA *et al.*, 2021).

Para a contagem de bolores e leveduras, foram semeados 100 μ L de cada diluição na superfície do ágar batata em triplicata. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 5 dias e realizadas as leituras (SILVA *et al.*, 2021).

2.5 pH do purê de tomate

Para caracterização do produto elaborado, os valores de pH foram determinados com eletrodo medidor de pH (MS Tecnopon, mPA210), mergulhando o eletrodo de vidro em três pontos das amostras. Para essa análise 5 gramas da amostra foram diluídas em 25 mL de água deionizada.

2.6 Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos através da média \pm desvio padrão e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para determinar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos. A análise foi realizada utilizando o software Sisvar 5.6.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo

Os óleos essenciais de orégano e tomilho e os conservantes nisina e sorbato de potássio foram submetidos à análise da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), e os resultados estão apresentados na Tabela 1 e 2. Os óleos essenciais de orégano e tomilho apresentaram CIM com variação de 0,15 a 0,41 mg/mL e CBM variando de 0,31 a >10,0 mg/mL, dentre as combinações de óleo essencial com antimicrobianos. O óleo essencial de orégano com sorbato de potássio apresentou melhor atividade antibacteriana frente a todas as cepas bacterianas analisadas.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (mg/mL) do óleo essencial de orégano (OEO) e os conservantes nisina e sorbato de potássio isolados e combinados.

Bactérias	Sorbato Nisina		OEO	50% Sorbato + 50% OEO	50% Nisina + 50% OEO
	CIM CBM	CIM CBM	CIM CBM	CIM CBM	CIM CBM
<i>E.coli</i>	>50±0 ^b	>25±0 ^b	0,15±0 ^a	2,08±1,73/0,21±0,09 ^a	6,25±0/0,625±0 ^a
	>50±0 ^a	>25±0 ^b	1,25±0 ^a	6,25±0/0,625±0 ^a	6,25±0/0,625±0 ^a
<i>S. aureus</i>	50±0 ^a	>25±0 ^b	0,15±0 ^a	2,60±2,43/0,26±0,09 ^b	16,67±7,22/1,67±0,72 ^c
	>50±0 ^a	>25±0 ^b	0,31±0 ^b	12,5±0/1,25±0 ^b	6,25±0/0,625±0 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	>50±0 ^b	>25±0 ^b	0,31±0 ^b	4,16±4,51/0,42±0,18 ^c	16,67±7,22/1,67±0,72 ^c
	>50±0 ^a	>25±0 ^b	1,25±0 ^a	6,25±0/0,625±0 ^a	25±0/2,5±0 ^b
<i>S. Thyphi</i>	>50±0 ^b	12,5±0 ^a	0,31±0 ^b	8,33±3,60/0,83±0,36 ^d	10,42±3,61/1,04±0,36 ^b
	>50±0 ^a	12,5±0 ^a	1,25±0 ^a	6,25±0/0,625±0 ^a	25±0/2,5±0 ^b

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Fonte: Autoria própria

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (mg/mL) do óleo essencial de tomilho (OET) e os conservantes nisina e sorbato de potássio isolados e combinados.

Bactérias	Sorbato	Nisina	OET	50% Sorbato +	50% Nisina +
	CIM CBM	CIM CBM	CIM CBM	50% OET CIM CBM	50% OET CIM CBM
<i>E.coli</i>	>50±0 ^b	>25±0 ^b	0,41±0,18 ^c	8,33±3,60/0,83±0,3 ^b	4,16±4,51/0,42±0,18 ^c
	>50±0 ^b	>25±0 ^b	10,00±0,00 ^b	6,25±0/0,625±0 ^a	6,25±0/0,625±0 ^a
<i>S. aureus</i>	50±0 ^b	>25±0 ^b	0,15±0 ^a	6,25±0/0,625±0 ^a	16,67±7,22/1,67±0,72 ^d
	>50±0 ^b	>25±0 ^b	0,31±0 ^a	12,5±0/1,25±0 ^b	7,83±7,21/2,08±0,72 ^b
<i>L. monocytogenes</i>	>50±0 ^b	>25±0 ^b	0,31±0 ^b	10,42±3,61/1,04±0,36 ^c	10,42±3,61/1,04±0,36 ^b
	>50±0 ^b	>25±0 ^b	10,00±0,00 ^b	25±0/2,5±0 ^c	12,5±0/1,25±0 ^c
<i>S. Thyphi</i>	>50±0 ^b	12,5±0 ^a	0,31±0 ^{bb}	12,5±0/1,25±0 ^d	12,5±0/1,25±0 ^c
	>50±0 ^b	12,5±0 ^a	>10,00±0,00 ^c	25±0/2,5±0 ^c	25±0/2,5±0 ^d

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Fonte: Autoria própria

3.2 Contagem microbiana em purê de tomate

As análises microbiológicas do purê de tomate estão dispostas na Tabela 3. Todos os tratamentos foram efetivos. Na contagem bacteriana de *Salmonella enterica* Thyphi do sétimo dia de armazenamento todas as amostras apresentaram ausência bacteriana, enquanto a amostra controle (somente inóculo) apresentou contagem de 8,03 Log/UFC g. Para bolores e leveduras a contagem foi de 7,74 Log/UFC g para a amostra controle (somente inóculo), e para os demais tratamentos a contagem foi ausente.

Tabela 3. Contagem de *Salmonella enterica* Thypi e bolores e leveduras em Log UFC/g no purê de tomate contaminado com *Salmonella enterica* Thypi e com tratamentos antimicrobianos durante o armazenamento de 7 dias.

	Tempo	F1	F2	F3	F4	F5	F6
S. thypi	0	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a
	7	8,03 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Bolores e leveduras	0	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a
	7	7,74 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

F1: controle (somente inóculo); F2: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de tomilho 50%; F3: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de orégano; F4: óleo essencial de orégano; F5: óleo essencial de tomilho; F6: sorbato de potássio

* Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Fonte: Autoria própria

3.3 pH do purê de tomate

A análise do pH demonstrou que os tratamentos não ocasionaram alterações do pH no produto final.

Tabela 4. pH do purê de tomate no dia 0 com tratamentos antimicrobianos

Amostra	pH
F1	4,47 ^a
F2	4,50 ^a
F3	4,49 ^a
F4	4,47 ^a
F5	4,48 ^a
F6	4,49 ^a

F1: controle (sem antimicrobiano); F2: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de tomilho 50%; F3: sorbato de potássio 50% + óleo essencial de orégano; F4: óleo essencial de orégano; F5: óleo essencial de tomilho; F6: sorbato de potássio.

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Fonte: Autoria própria

4 DISCUSSÃO

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais está associada aos seus constituintes que atuam em sinergismo, estes compostos podem se inserir na bicamada lipídica ou se ligar a ela com grande afinidade, causando alterações estruturais que levam ao aumento da permeabilidade, resultando em vazamento ou alteração da homeostase bacteriana (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021).

O timol composto majoritário presente no óleo essencial de tomilho é capaz de desintegrar a membrana externa das células microbianas, induzir mudanças na composição de ácidos graxos e fosfolipídios, influenciar a síntese de material genético, permeabilizar e despolarizar a membrana citoplasmática e causar o vazamento de íons potássio, prótons e ATP, levando à perda do potencial de membrana e ao comprometimento do metabolismo energético (POSGAY *et al.*, 2022). Wang *et al.*, (2022) relaciona o modo de ação antimicrobiano do óleo essencial de orégano a alteração na síntese de proteínas, danificação das membranas, redução do conteúdo de ATP intracelular e vazamento de proteínas e desestabilização das vias metabólicas (WANG, *et al.*, 2022).

Batista *et al.* (2019), avaliaram a inibição de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium por carvacrol combinado com sorbato de potássio (carvacrol 78 µg/mL e sorbato de potássio 39 µg/mL) *in vitro* e em extrato de tomate. O carvacrol e sorbato de potássio apresentaram concentração inibitória mínima *in vitro* de (312 µg/mL e 1250 µg/mL) e concentração bactericida mínima (312 µg/mL e 10.000 µg/mL), na pasta de tomate esta combinação inibiu completamente o crescimento bacteriano no terceiro dia de armazenamento (BATISTA *et al.*, 2019).

Cattelan *et al.*, (2018), observaram os efeitos combinados do óleo essencial de orégano e do sal no crescimento de *Escherichia coli* em molho para salada. Várias combinações de óleo essencial de orégano e sal foram analisadas, porém a combinação de 1,30% de sal e 0,2% de óleo essencial de orégano promoveu a contagem de 5,8 UFC/g, enquanto a combinação de 1,30 % de sal e 0,4 % de óleo essencial de orégano conferiu a contagem de aproximadamente 6,7 UFC/g (CATTELAN *et al.*, 2018).

No presente estudo a combinação entre óleo essencial de orégano e sorbato de potássio foi mais efetiva quando comparada às outras combinações, com CIM variando de 2,08 a 8,33 mg/mL e CBM entre 6,25 a 12,5 mg/mL. Na análise realizada em purê de

tomate todos os tratamentos foram efetivos, levando a inibição do crescimento bacteriano no sétimo dia de armazenamento. Deste modo, observa-se que o sinergismo é uma alternativa para reduzir a concentração de conservantes associados negativamente a possíveis efeitos tóxicos ao organismo humano, como o sorbato de potássio que pode ocasionar reações de hipersensibilidade, como urticária, asma e alergia (EFSA, 2015; SOUZA *et al.*, 2019).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais apresentaram sinergia antibacteriana quando avaliados com os antimicrobianos comerciais como sorbato de potássio e nisina.

Dentre os sinergismos avaliados neste trabalho, o de maior relevância foi a combinação do óleo essencial de orégano e sorbato de potássio, apresentando melhor atividade antibacteriana frente a todas as cepas bacterianas analisadas.

Os achados do presente estudo reforçam que a mistura de óleos essenciais e agentes conservantes comerciais sintéticos podem ser uma alternativa promissora para melhorar a conservação dos alimentos.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense (UNIPAR), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil CAPES.

7 REFERÊNCIAS

- DE ALMEIDA, Jaqueline Milagres; CRIPPA, Bruna Lourenço; SOUZA, Victória Vilaça Martins Alencar; ALONSO, Vanessa Pereira Perez; JUNIOR, Edison da Motta Santos; PICONE, Carolina Siqueira Franco; PRATA, Ana Silvia; SILVA, Nathália Cristina Cirone. Antimicrobial action of Oregano, Thyme, Clove, Cinnamon and Black pepper essential oils free and encapsulated against foodborne pathogens. **Food Control**. v. 144, fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109356>.
- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F.J.; BARRAJON-CATALAN, E.; HERRANZ-LOPEZ, M.; MICOL, V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**. v. 90, set. 2021.
- ASAE. Autoridade de segurança alimentar. **Conservantes**. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/conservantes.aspx>. Acesso em: 10 de março de 2025.
- BATISTA, Andreia Farias Pereira; DOS SANTOS, Adriele Rodrigues; DA SILVA, Alex Fiori; TREVISAN, Daliah Alves Coelho; RIBEIRO, Leonardo Henrique; CAMPANERUT-SA, Paula Aline Zanetti; FILHO, Benicio Alves de Abreu; JUNIOR, Miguel Machinski; MIKCHA, Jane Martha Graton. Inhibition of *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium* by combined carvacrol and potassium sorbate in vitro and in tomato paste. **LWT**. v. 100, p. 92-98, fev. 2019.
- BENSID, A. *et al.* Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food – a review. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**. v. 62, n. 11, p. 2985- 3001, dez. 2020. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1862046>.
- BRASIL (2003). RDC N° 276, DE 1° DE OUTUBRO DE 2003. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/rdc0276_01_10_2003.html. Acesso em 28 de janeiro de 2025.
- BRASIL (2013). RDC N° 8, de 06 de março de 2013. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0008_06_03_2013.pdf. Acesso em: 28 de janeiro de 2025.
- CATTELAN, Marília Gonçalves; NISHIYAMA, Yara Paula de Oliveira; GONCALVES, Tânia Maria Vinturim; COELHO, Alexandre Rodrigo. Combined effects of oregano essential oil and salt on the growth of *Escherichia coli* in salad dressing. **Food Microbiology**. v.73, p.305-310, ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.026>.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests**. Approved Standard M07-A10. CLSI, Wayne, 2015.
- CORDEIRO, Sandra Zorat. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. **Origanum Vulgare L.** Disponível em: <https://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/origanum-vulgare-l>. Acesso em: 23 de janeiro de 2025.
- DE ALMEIDA, Katcilanya Menezes; DO ESPÍRITO SANTO, Maria Luciete Barbosa; SILVA, Micaela Maria de Souza; MOURA, Nathalia Santos; COSTA, Rikaelly Vital; BALDANZI, Analu de Azevedo Silva.; DE MELO, Yenisei Bezerra; OLIVEIRA, Áquila M. de S. Análise dos conservantes e suas consequências pro grupo infantil. **Revista**

Contemporânea. v. 3, n. 9, p. 15428–15442, set. 2023. <https://doi.org/10.56083/RCV3N9-104>.

EFSA. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food.** jun. 2015. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4144>.

FDA (Food and Drug Administration) (2016). **Code of federal regulations (CFR). Title 21.** Substances generally recognized as safe (GRAS) subpart §182.20 Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>. Acesso em: 25 de setembro, 2024.

FREDERICO, Camila; FRANCISCATO, Lidaiane Mariáh Silva dos Santos; RUIZ, Suelen Pereira. Essential oils as natural food additives: stability and safety. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar.** v. 27, n.10, p. 5739-5755, 2023.

GALLO, Monica, FERRARA, Lidia, CALOGERO, Armando, MONTESANO, Domenico, NAVIGLIO, Daniele. Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. **Food Research International.** v. 137, nov. 2020. [10.1016/j.foodres.2020.109414](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109414)

GURTNER, Joshua B; HARLEE, Nia A; SMELSER, Amanda M; SCHNEIDER, Keith R. *Salmonella enterica* Contamination of Market Fresh Tomatoes: A Review. **Journal of Food Protection.** v.81, n. 7, p. 1193-1213, jul. 2018. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-395>.

KHALID, Samran, HASSAN, Syed Ali, JAVAID, Hamza, ZAHID, Muqaddas, NAEEM, Muhammad, BHAT, Zuhaib F., ABDI, Gholamreza, AADIL, Rana Muhammad. Factors responsible for spoilage, drawbacks of conventional packaging, and advanced packaging systems for tomatoes. **Journal of Agriculture and Food Research.** v. 15, mar. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100962>.

LEE, Sohyun; KIM, Hoikyung; BEUCHAT, Larry R.; KIM, Yoonsook Kim; RYU, Jee-Hoon. Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. **Food Microbiology.** v.20, 2020.

MORAIS, Joyce Fernandes; DE ARAUJO, Januse Míllia Dantas; NETA, Maria Luiza Pontes Machado; ARRUDA, Lara Cristina Silva; DE FARIAS, *FERNANDES*, Jessyca Talyta; PONTES, Edson Douglas Silva; DE OLIVEIRA, Natália Dantas. Importância do Controle Microbiológico com Relação às Doenças Transmitidas Por Alimentos. **International Journal of Nutrology.** v.11, n.1, p. 324-327, 2018.

OMS - **Organização Mundial da Saúde.** A crescente complexidade dos surtos de doenças transmitidas por alimentos exige novas tecnologias e maior transparência. Disponível em: <https://www.who.int/es/news/item/06-12-2019-more-complex-foodborne-disease-outbreaks-requires-new-technologies-greater-transparency>. Acesso em: 25 de setembro, 2024.

OPAS - **Organização Panamericana da Saúde.** PANAFTOSA alerta que doenças transmitidas por alimentos podem ser evitadas com ações preventivas do campo à mesa. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/7-6-2022-panaftosa-alerta-que>

doencas-transmitidas-por-alimentos-podem-ser-evitadas-com. Acesso em: 25 de setembro, 2024.

POSGAY, Miklós; GREFF, Babet; KAPCSANDI, Viktória; LAKATOS, Erika. Effect of *Thymus vulgaris* L. essential oil and thymol on the microbiological properties of meat and meat products: A review. **Heliyon**. v. 8, n. 10, out. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10812>.

SILVA, Neusely da Junqueira, AMSTADELDEN, Valéria Christina; SILVEIRA, Neliane Ferraz de Arruda; TANIWAKI, Marta Hiromi; SANTOS, Rosana Francisco Siqueira; GOMES, Renato Abeilar Romeiro. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo; Blucher; 6 ed., 602 p. 2021.

SOUZA, Betina Aguiar, Pias, Kathielly Kaiper Silveira, Braz, Naiane Gomes, Bezerra, Aline Sobreira. Aditivos Alimentares: Aspectos Tecnológicos e Impactos na Saúde Humana. **Revista Contexto e Saúde**. v.19, n.36, p.5-13, jul. 2019. <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2019.36.5-13>.

WANG, Di; LI, Chunsheng, PAN, Chuang; WANG, Yueqi; XIANG, Huan; FENG, Yang; YANG, Xianqing; CHEN, Shengjun; ZHAO, Yongqiang; WU, Yanyan; LI, Laihao; KAWAI, Yuji; YAMAZAKI, Koji; YAMAKI, Shogo. Antimicrobial activity and mechanism of action of oregano essential oil against *Morganella psychrotolerans* and potential application in tuna. **LWT**. v. 165, ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113758>