

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**NICOLAS DE LIMA GUANDELIN**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Melaleuca alternifolia* E NISINA EM LEITELHO**

**LONDRINA**

**2023**

**NICOLAS DE LIMA GUANDELIN**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Melaleuca alternifolia* E NISINA EM LEITELHO**

**Microencapsulation of *Melaleuca alternifolia* oil and Nisin in buttermilk**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos do Curso Superior em Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Londrina.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Furlaneto Maia  
Coorientadora: Luana de Carvalho

**LONDRINA**

**2023**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**NICOLAS DE LIMA GUANDELINÉ**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Melaleuca alternifolia* E NISINA EM LEITELHO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos do Curso Superior em Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Londrina.

Data de aprovação: 13/junho/2023

---

Luciana Furlaneto Maia

Doutora em biologia celular e molecular pela Universidade Federal do Paraná  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Amelia Elena Terrile

Doutora em química pela UEL/UEPG/UNICENTRO (Doutorado Associação Ampla)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Marianne Ayumi Shirai

Doutorado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**LONDRINA**

**2023**

## AGRADECIMENTOS

À instituição UTFPR pelo ambiente e todas as tecnologias me ofertadas durante minha graduação, juntamente com seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram que eu alcançasse meus objetivos de aprendizagem.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia pelo apoio, confiança e pelo paciente trabalho de revisão da redação, em companhia da sua aluna mestranda Luana de Carvalho.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário do *campus* Londrina - LabMult-LD.

Aos meus colegas de sala e família.

Enfim, a todos os que contribuíram para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Com o crescimento cada vez maior da produção de alimentos industrializados torna-se essencial a segurança alimentar, e como boa parte dos alimentos de origem animal ou vegetal, se degrada com certa facilidade, muitas empresas buscam meios e tecnologias para aumentar a vida útil do produto, mantendo as propriedades nutricionais e sensoriais. Dentro desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi de encapsular o óleo de *Melaleuca alternifolia* e nisina utilizando como material de parede o leiteiro, e verificar a atividade antimicrobiana do material encapsulado contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ambos encapsulados com leiteiro, utilizando as técnicas de liofilização e *spray dryer*. Para a atividade antimicrobiana do material encapsulado, realizou-se pela técnica de poço difusão em ágar. A atividade antimicrobiana do óleo puro e em solução a 10% apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, porém o óleo encapsulado perdeu essa capacidade. A nisina apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas, com exceção para a *Salmonella*, e após a técnica de liofilização, perdeu atividade contra a bactéria *P.aeruginosa*, mantendo a atividade para as demais bactérias. Não se obteve resultados favoráveis com a técnica de *spray dryer* com nisina e leiteiro. A Concentração Inibitória Mínima da nisina encapsulada foi de 1:32, se mantendo ativa após 30 e 60 dias de armazenamento. O encapsulado da nisina e leiteiro apresentou rendimento de 86%, solubilidade de 20% e umidade de 43%. Com o resultado obtido, foi possível observar que a nisina encapsulada com leiteiro apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias potencialmente patogênicas veiculadas por alimentos, podendo ser uma estratégia de conservação.

**Palavras-chave:** subproduto manteiga; árvore de chá; testes antimicrobiano; bacteriocina; probiótico.

## ABSTRACT

X'With the increasing growth of industrialized food production, food safety becomes essential, and as most food of animal or vegetable origin is easily degraded, many companies are looking for means and technologies to increase the shelf life of the product. , maintaining nutritional and sensory properties. In this context, the objective of the present work was to encapsulate Melaleuca alternifolia oil and nisin using buttermilk as wall material, and to verify the antimicrobial activity of the encapsulated material against Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella, Listeria monocytogenes and Pseudomonas aeruginosa. Both encapsulated with buttermilk, using lyophilization and spray drying techniques. For the antimicrobial activity of the encapsulated material, the technique of well diffusion in agar was carried out. The antimicrobial activity of pure oil and in 10% solution showed antimicrobial activity against all microorganisms tested, but the encapsulated oil lost this ability. Nisin showed antimicrobial activity against the bacteria tested, with the exception of Salmonella, and after the lyophilization technique, it lost activity against the P.aeruginosa bacteria, maintaining activity for the other bacteria. Satisfactory results were not obtained with the spray drying technique with nisin and buttermilk. The Minimum Inhibitory Concentration of encapsulated nisin was 1:32, remaining active after 30 and 60 days of storage. The encapsulated nisin and buttermilk showed a yield of 86%, solubility of 20% and moisture content of 43%. With the result obtained, it was possible to observe that nisin encapsulated with buttermilk presented antimicrobial activity against potentially pathogenic bacteria transmitted by food, which could be a conservation strategy.

**Keywords:** butter by-product. tea tree. antimicrobial testing. bacteriocin. probiotic

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 4  |
| 2 OBJETIVO GERAL .....  | 6  |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 6  |
| 3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....  | 7  |
| 3.1 MELALEUCA ALTERNIFOLIA.....   | 7  |
| 3.2 NISINA .....  | 9  |
| 3.3 TÉCNICA MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL EM NISINA.....  | 10 |
| 3.3.1 MATERIAL ENCAPSULANTE.....  | 11 |
| 3.4 LEITELHO.....   | 12 |
| 3.5 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NO ALIMENTOS.....   | 13 |
| 3.6 CONTROLE DE BACTÉRIAS POR ÓLEOS MICROENCAPSULADO.....   | 14 |
| <b>4 PROCESSOS METODOLÓGICOS</b> .....  | 16 |
| 4.1 MATERIAL.....   | 16 |
| 4.2 MICRORGANISMO.....  | 16 |
| 4.3 MÉTODOS.....  | 16 |
| 4.3.1 ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE MELALEUCA.....   | 17 |
| 4.3.2 ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA SOLUÇÃO DE NISINA.....   | 17 |
| 4.3.3 TÉCNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO.....  | 17 |
| 4.2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MATERIAL ENCAPSULADO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) DO MATERIAL MICROENCAPSULADO..... | 19 |
| 4.2.5 TESTE DE ESTABILIDADE DO MATERIAL MICROENCAPSULADO.....   | 20 |
| 4.2.6 MEDIÇÃO DE RENDIMENTO.....  | 20 |
| 4.2.7 SOLUBILIDADE.....   | 20 |
| 4.2.8 TEOR DE UMIDADE.....  | 21 |
| 4.2.9 CURVA DE MORTE DE BACTERIANO.....   | 22 |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUÇÃO</b> .....  | 22 |
| 5.1 ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA E NISINA.....                                       | 22 |
| 5.2 TÉCNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO.....  | 24 |
| 5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) DO MATERIAL ENCAPSULADO.....                                | 25 |
| 5.4 RENDIMENTO, SOLUBILIDADE E UMIDADE DA NISINA MICROENCAPSULADA.....  | 26 |
| 5.5 CURVA DE MORTE BACTERIANO.....  | 27 |
| 5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 28 |
| REFERÊNCIAS.....  | 29 |

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente a maioria dos alimentos são adicionados de aditivos químicos alimentares, afim de combater o desenvolvimento de microrganismos potencialmente patogênicos e deteriorantes (SANTOS et al., 2011). Porém com consumidores cada vez mais criteriosos e mais informada em função dos avanços tecnológicos e acesso a informações, muitos optam por alimentos com baixos níveis de conservantes e aditivos químicos, ou até mesmo por nenhuma adição, consumo que se denomina de consumismo 'verde'. Mas o risco de não se utilizar aditivos químicos e conservantes é a alta contaminação bacteriana ou baixa vida útil do alimento (BURT, 2004).

Então, muitos métodos e meios de substituir esses aditivos químicos e conservantes vem sendo testado e aprimorado na indústria de alimentos. E um desses métodos são uso de óleos essenciais (OEs) e bacteriocina. Em busca de apresentar alimentos sem aditivos químicos, ou com uma redução considerável, apresentando um alimento mais saudável.

Mostrando-se promissor em diversos estudos, o óleo de *Melaleuca alternifolia*. Chamada também de "árvore de chá", tem como principal produto o TTO (*tea tree oil*), possuindo seu grau de relevância na medicina, por seu excelente desempenho em combates de bactérias, fungos e diversos patógenos humanos, além de estudos comprovarem a efetividade ação antibacteriana, possuindo efeito bactericida *in natura* e bacteriostático em pequenas concentrações (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013).

Porém por se tratar de óleo, a *Melaleuca* apresenta grande sensibilidade quando exposto a presença de luz, calor e oxigênio, podendo ser oxidada e degradada com certa facilidade. Então esses aspectos, tornam o uso do óleo, os principais responsáveis pela baixa utilização em indústrias alimentares (HILL, 2013).

Portanto para que a utilização da *Melaleuca* se torne mais comum, existe a necessidade da criação ou aprimoramento de técnicas que proporcionam uma maior estabilidade, proteção e que assegure as principais propriedades do óleo. Uma técnica já conhecida, é o encapsulamento, que se apropria do revestimento fino de partículas sólidas, gotas de líquidos e dispersões com um filme protetor (HILL, 2013; WU; LUO; WANG, 2012). As técnicas mais utilizadas para a utilização dos OEs



encapsulados são os métodos físicos, químicos e físico-químico (OZKAN et al., 2019).

Por sua vez, bacteriocinas também pode ser uma estratégia para controlar o desenvolvimento de bactérias em alimentos. A bacteriocina mais conhecida é a nisina, utilizada contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (RODRÍGUEZ et al., 2000). Entretanto, inter-relações entre nisina e componentes da matriz alimentar, como proteínas, lipídios, íons e surfactantes, podem reduzir a ação antimicrobiana (HILL, 2013; WU; LUO; WANG, 2012).

## 2 OBJETIVO GERAL

Microencapsular óleo essencial de *M. alternifolia* e nisina em leite, e avaliar o potencial antimicrobiano.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Microencapsular óleo de *M. alternifolia* em leite;
- Microencapsular nisina em leite;
- Verificar a atividade antimicrobiana do material microencapsulado contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Testar a atividade antimicrobiana do material microencapsulado após um período de armazenamento.

### 3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são considerados um produto composto, podendo ultrapassar 300 componentes químicos diferentes, tornando o extremante valorizado e sendo utilizáveis em diversas áreas, como: cosméticos, saúde e perfumaria (WOLFFENBUTTEL, 2022). Sua função antimicrobiana se dá pelo fato de apresentarem terpenóides, monoterpenos e fenóis, onde apresentam toxidades a estrutura e a função da membrana celular, sendo que os óleos em sua forma pura apresentaram resultados satisfatórios como inibidor de microrganismo em diferentes estados (GILLES et al., 2010; OLIVEIRA et al, 2011).

Muito se discute de como os óleos essenciais conseguem inibir microrganismo, e autores como Bakkali et al. (2008) e Maia, Donato e Fraga (2015) demonstram que devido a hidrofobicidade do óleo ocorre uma interação entre o óleo e os lipídeos da membrana celular de microrganismos, o que causa alterações na estrutura e interferindo na permeabilidade.

#### 3.1 MELALEUCA ALTERNIFOLIA

*M. alternifolia* é um gênero botânico, pertencente à família Myrtaceae, e tem como principal produto o TTO (*tea tree oil*) (Figura 1), que é constituído principalmente de hidrocarbonetos terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois. Possuindo um derivado metilado, ao mesmo tempo que cinco pentatriterpenos cíclicos (CARSON; HAMMER RILEY, 2006).

Os aborígenos Bundjalung do norte de Nova Gales do Sul foram um dos primeiros povos a descobrir sobre a atividade antibacteriano, onde esmagavam as folhas da “árvore de chá” para tratar enfermidades como: resfriados e tosses (CARSON; HAMMER RILEY, 2006).

**Figura 1 – Foto da árvore da *Melaleuca alternifolia* evidenciando as flores e folhas**



**Fonte: Wikipédia - 2022**

A prática de extração do óleo se tornou mais comum quando Penfold (décadas de 1920 e 1930) publicou relatos de sua atividade antimicrobiana em vários artigos, relatando que o TTO era 11 vezes mais eficiente do que o fenol (CARSON; HAMMER RILEY, 2006).

Amplas bactérias já foram testadas quanto a sua suscetibilidade ao TTO, e muitas bactérias apresentaram suscetibilidade de concentração mínima de 1% ou menos de TTO, porém bactérias como *Enterococcus faecalis*, Estafilococos e Micrococos comensais da pele e *P. aeruginosa* apresentam suscetibilidade a uma concentração mínima de inibição de 2% (SAGAVE, 2014).

Porém, as desvantagens de se usar o óleo de *M. alternifolia* puro se dá a suas características físicas, como pouca solubilidade em água, limitando sua miscibilidade em testes e dispersão de TTO em meio aquoso, resultando em uma suspensão turva, dificultando a determinação de pontos finais em testes de suscetibilidade (SAGAVE, 2014).

### 3.2 NISINA

A nisina é um peptídeo antimicrobiano sintetizado no ribossomo da bactéria *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (CLEVELAND, 2001). A produção de nisina está vinculada com à capacidade da bactéria fermentar a sacarose, sendo uma característica variável entre os lactococci (TOLEDO, 2000). A nisina pertence à classe dos lantibiótico e é identificada pelo número de identificação internacional INS como E234 de acordo com Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2023).

A solubilidade, estabilidade e a atividade biológica da nisina são altamente dependentes da temperatura, pH, e da natureza do substrato. Mesmo as bacteriocinas sendo altamente sensíveis às enzimas proteolíticas, a nisina apresenta estabilidade a tratamentos de alta pressão, tratamentos térmicos e exposição a ambientes ácidos, sendo comprovado um antimicrobiano eficaz para os alimentos (BOWER et al, 2002).

Os estudos sobre seu mecanismo de ação mostraram a membrana citoplasmática como o alvo primário, além da inibição da biossíntese de RNA, DNA, enzimas, de proteína, polissacarídeos e outros exemplos que levam a morte da célula (CLEVELAND, 2001). Estes mesmos autores mostraram a habilidade da nisina em inibir o crescimento microbiano de bactérias gram-positivas, inclusive as patogênicas de alto risco em alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, *Clostridium botulinum*, e *Listeria monocytogenes*.

A ação da nisina sobre as bactérias ocorre em duas etapas, sendo a primeira a adsorção não-específica da nisina sobre a parede celular, podendo ser reversível. Essa etapa da adsorção dependente do pH, que ocorre em valor mínimo de 3,0 e máximo de 6,5, da composição fosfolipídica da membrana citoplasmática dos microrganismos sensíveis, da presença de cátions divalentes e trivalentes ( $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  e  $Gd^{+3}$ ), e da concentração utilizada (MORENO, 2005). Já na segunda etapa, a nisina se torna insensível às proteases e as células sofrem mudanças irreversíveis. Sendo fortemente atraída pelos fosfolipídeos e lisossomos na membrana das bactérias, formando poros ou canais de 0,2-1,0 nm de diâmetro. A despolarização simultânea da membrana causa um realce rápido de componentes essenciais, como

íons K<sup>+</sup>, aminoácidos e ATP, levando a uma série de alterações que termina com a lise celular (MORENO, 2005).

Como as bactérias Gram-negativas possuem camadas de lipopolossacarídeo, possui uma maior proteção à célula. Porém, como esta camada possui caráter aniônico pode se ligar à molécula da nisina, que tem caráter catiônico, formando uma estrutura estável por interações eletrostáticas, mas mesmo assim, a nisina não conseguiria alcançar a membrana citoplasmática da célula (HELANDER, 2000).

### 3.3 TÉCNICAS DE ENCAPSULAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

Grandes indústrias buscam meios de estender a vida útil do produto, garantindo a qualidade nutricional, e controlando microrganismo, mas sem a adição de compostos químicos. Sendo necessário a utilização de compostos naturais, como por exemplo extratos de plantas e folhas (BALLESTEROS et al., 2017).

Os alimentos na indústria muitas vezes passam por diversos processos envolvendo altas temperaturas, como a pasteurização ou esterilização de leite e sucos, cozimento de produtos cárneos e pelletização de rações. Esses processos tornam inviável a utilização de probiótico, em razão de não serem capazes de resistir a altas temperaturas. Dessa maneira, a encapsulação nasce com o objetivo de oferecer proteção aos microrganismos probióticos, aumentando a sua sobrevivência em vários tipos de alimentos (HOMAYOUNI et al., 2008).

A encapsulação de partículas foi desenvolvida com os objetivos da liberação controlada de composto, solubilização e estabilização. Processo pelo qual o material ou materiais são revestidos por um outro tipo de material ou sistema, sendo denominado de agente encapsulante o material externo e interno chamado de material ativo (GUPTA et al., 2016).

Os métodos amplamente utilizados por pesquisadores e indústrias de preparação de cápsulas são físicos, químicos ou físico-químicos. A diferença dos métodos está relacionada no tipo de aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante (SOBEL et al., 2014).

Então os tipos de encapsulação podem ser de natureza física, química ou físico-química (SANTOS et al., 2000): (1) Métodos físicos: leiteo fluidizado, *spray drying*, liofilização *spray cooling* e outros; (2) Métodos físico-químicos: emulsificação

seguida de evaporação do solvente, coacervação ou separação de fases, e outros; (3) Métodos químicos: polimerização interfacial e inclusão molecular.

Os métodos possuem diferentes vantagens e desvantagens, escolha do processo utilizado está ligado com a função, termo de sensibilidade e solubilidade dos compostos ativos (TANEJA, 2012).

Diferentes técnicas de microencapsulação, materiais da parede e núcleo ativo podem formar diferenças morfológicas, como: formas, porosidade e integridade das partículas (GÓMEZ et al., 2018).

### **3.3.1 MATERIAL ENCAPSULANTE**

A escolha do material de parede é um importante fator do processo de encapsulação, visto que o agente influenciará tanto na eficiência quanto na estabilidade da cápsula. Os materiais mais utilizados nos processos de encapsulação são proteínas e polissacarídeos, sendo de origem natural ou sintético, sendo possível ainda utilizar sozinhos ou em conjunto (ALVARENGA BOTREL et al., 2012).

O material de parede interfere diretamente tanto na estabilidade da emulsão antes da secagem, quanto na capacidade de proteção do produto em pó, então é desejado algumas características como: possuir propriedades emulsificantes, formar um bom filme na interface, oferecer proteção ao encapsulado, baixo custo, baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos e não ser reativo com o material a ser encapsulado. Porém, praticamente nenhum material consegue ter todas essas propriedades, então na prática é utilizada paredes em combinação (CARNEIRO, 2011).

As paredes geralmente utilizadas são: proteínas (proteínas do leite ou soro de leite, gelatinas), gomas naturais (alginato, goma arábica, carragena), celuloses (carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose), carboidratos (amidos, dextrinas e sacarose), materiais inorgânicos (sulfato de cálcio e silicatos) e ainda lipídeos (parafina, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras) (CARMO et al., 2015).

Cada material de encapsulação possui suas características em particular, favorecendo utilizações para diferentes áreas, como por exemplo a utilização de polímeros ou blendas de polímeros biodegradáveis sendo naturais ou sintéticos em fármacos. Também temos o exemplo da utilização de poliésteres poli (3-

hidroxibutirato), poli ( $\epsilon$ caprolactona) e poli (ácido láctico) , utilizados para encapsular agrotóxicos, em razão da biodegradabilidade e pela degradação não apresentar toxicidade (HAYASHI, 2004).

Outro exemplo de material encapsulante de probióticos é o soro de leite, material líquido residual obtido a partir da coagulação do leite, por se tratar de resíduo, grande parte do soro de leite produzido é descartada indevidamente no solo e em rios, gerando problemas de poluição ambiental, isso ocorre por sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), dessa maneira alternativas tecnológicas vem sendo estuda para seu aproveitamento (SILVA; BOLINI, 2006).

### **3.4 Leitelho**

O leitelho é um subproduto da produção de manteigas, onde com a formação de grandes aglomerados de gordura, resulta na inversão de fases de uma emulsão óleo/água (creme) para uma emulsão água/óleo (manteiga). Nesses aglomerados, ocorre a formação de uma rede tridimensional, devido a inúmeros glóbulos de gorduras parcialmente coalescidos, ocorrendo a liberação de uma fase aquosa, denominada de leitelho (ROSA;PIRES, 2021).

A composição do leitelho se dá principalmente por água, extrato seco, gordura, proteína, lactose, sais e fosfolipídios. A concentração de fosfolipídios no leitelho é de aproximadamente 0,12% a 0,18%, essas moléculas apresentam em sua estrutura uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, caracterizada como molécula anfifílica. Os fosfolipídios também são as principais responsáveis por adsorverem diferentes interfaces, como, óleo/água, alterando as propriedades termodinâmicas, como por exemplo, a redução da tensão interfacial e estabilização destes sistemas. Sendo assim, podem atuar como bons agentes emulsificantes e/ou espumantes (DOS SANTOS, 2021).

Essas propriedades do leitelho torna-o um coproduto da fabricação da manteiga valioso para a utilização como ingrediente em diferentes produtos. Caseínas, proteínas do soro e lactose, também fazem parte da composição do leitelho, isso significa que pode ser utilizado em formulações que se utilizaria leite desnatado, e ainda com a vantagem da elevada concentração de fosfolipídios. Outro motivo que pode impulsionar sua utilização na indústria alimentícia é a sustentabilidade ambiental (ROSA; PIRES, 2021).



Além da possibilidade de se usá-lo em fabricações de alimentos o leiteiro vem sendo estudado como veículo para moléculas hidrofóbicas principalmente de interesse na área de alimentos e saúde, pois a presença de proteínas e lipídeos, fosfolipídios das membranas do glóbulo de gordura fazem dele um carreador interessante para moléculas bioativas hidrofóbicas, sendo capaz de carregar e estabilizar (ZHANG et al., 2020; ROSA; PIRES, 2021). Assim evitando o descarte de um produto com grande potencial tecnológico, econômico e, ainda, com tantas qualidades para os consumidores (ROSA; PIRES, 2021).

### 3.5 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NO ALIMENTOS

Cada vez mais o fator segurança alimentar torna-se uma questão básica, onde é desejável alimentos dentro dos padrões higiênicos satisfatórios. Geralmente as doenças provenientes de alimentos, se devem a vírus, toxinas, parasitas, bactérias, onde a sobrevivência e multiplicação variam de seus mecanismos de defesa e das condições do meio, dado geralmente pelos níveis de temperatura, oxigenação e pH, variando de acordo com cada alimento (MAIA; DONATO; FRAGA, 2015).

As doenças transmitidas por alimentos ocorrem quando um patógeno é ingerido com alimentos e se estabelece (e geralmente se multiplica) no hospedeiro humano, ou quando um patógeno toxigênico se estabelece em um produto alimentar e produz uma toxina, que é então ingerida pelo hospedeiro humano. Assim, as doenças transmitidas por alimentos são geralmente classificadas em: (a) infecção alimentar e (b) intoxicação alimentar (BINTSIS, 2017).

Dentre os patógenos alimentares, se destacam as bactérias que causam um grande número de doenças com efeitos significativos sobre saúde humana e economia, sendo as espécies mais prevalentes: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazakii*, sorotipos de *Escherichiacoli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp.* e *Yersinia enterocolitica* (BACON, 2003).

A maioria das bactérias patogênicas são mesófilas, com temperatura ótima de crescimento variando de 20 °C a 45 °C. No entanto, certos patógenos transmitidos por alimentos (psicotróficos), como *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*

são capazes de crescer sob condições de refrigeração ou temperaturas inferiores a 10 °C (BACON, 2003).

A conscientização sobre o impacto na saúde pública de patógenos transmitidos por alimentos tem crescido, e o surgimento de novos patógenos, e a forma de transmissão, está mudando ou está associada a novos veículos alimentares. Ainda a resistência a medicamentos entre os patógenos comuns e os patógenos transmitidos por alimentos em particular é um problema emergente (AKBAR; KUMAR-ANAL, 2011).

Práticas inadequadas de manipulação e saneamento de alimentos, sistemas regulatórios fracos, falta de educação para manipuladores de alimentos e mudança no perfil do consumidor, impactando na redução de aditivos químicos, são as principais razões para a ocorrência comum de doenças transmitidas por alimentos em diversos países (DISASSA et al., 2017).

### **3.6 CONTROLE DE BACTÉRIA POR ÓLEOS MICROENCAPSULADOS**

Diversos estudos e experimentos comprovam a efetividade de óleos microencapsulados como meio antibacteriana, como por exemplo, um estudo realizado por Borborema (2022), onde os resultados obtidos permitiram concluir que o óleo essencial apresentou atividade antibacteriana tanto in vitro e como antibiofilme em superfície de aço inoxidável com as linhagens de *S. aureus mutirresistentes*, mesmo utilizadas em baixas concentrações do óleo, provando seu potencial. Sua utilização em seu estado microencapsulado apresentou ainda mais efeitos antibiofilme quando comparado à utilização do óleo essencial em estado livre, podendo ser uma utilização alternativa em indústrias de alimentos e de produtos sanitizantes.

Autores como Ucker (2016), defendem a microencapsulação como um meio eficiente de combate a agente patógeno, onde observaram que existe alta eficiência de encapsulação do óleo desodorizado de *M. alternifolia*, com técnica de coacervação simples utilizando quitosana e ácido tânico, tendo sua confirmação pela técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura, apresentando uma potente inibição frente aos microrganismos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, resultado esperado principalmente devido à propriedade antimicrobiana da quitosana e baixa atividade antioxidante.

Então, muitos testes e estudos comprovam a viabilidade de se microencapsular e utilizar óleos essenciais para combate de agentes patógenos em alimentos, além diversos autores já comprovaram sua importância nas indústrias, principalmente nas indústrias de alimentos.

## 4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Tratou-se de um projeto experimental, sendo as análises realizadas nos laboratórios da UTFPR Campus Londrina.

### 4.1 Material

O leiteiro foi doado por uma empresa da cidade de Londrina/Pr. Todos os meios de cultura e reagentes utilizados pertencem ao laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LAmBA) da UTFPR.

O óleo de *M. alternifolia* (Madon & Amp; Betché) foi adquirido no comércio local; a nisina utilizada foi da marca Bela Vista.

### 4.2 Microrganismos

As bactérias indicadoras foram *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonela*, *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*. As culturas estavam estocadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol e armazenadas em freezer no laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LAmBA) da UTFPR.

As bactérias foram reativadas em 5 mL de caldo BHI (Brain Hearth Infusion), também disponibilizado pelo laboratório. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas.

### 4.3 Métodos

Neste capítulo demonstra como foi realizado o procedimento experimental, como metodologias de análises que serão aplicadas no óleo *M. alternifolia* e na nisina. Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LAmBA).

#### **4.3.1 Ensaio de Difusão em ágar da atividade antimicrobiana do óleo de *Melaleuca Alternifolia***

Para a avaliação da atividade antibacteriana do óleo de *M. alternifolia*, foi realizado pela técnica de difusão em ágar (WANG et al., 2020). Para esse teste, preparamos 20 mL de meio de ágar (BHI) e adicionados a cada placa de Petri. Após a solidificação, 100 µL de cada suspensão bacteriana ( $1 \times 10^7$  ufc/mL) foram uniformemente espalhadas na superfície do meio. Posteriormente, realizou-se orifícios no ágar (poços) e em cada poço foi adicionado 30 µL do óleo essencial concentrado, e também em solução a 10%.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

A eficiência do óleo comprovou-se a partir do diâmetro da zona de inibição, expressando a atividade antibacteriana do óleo. Água destilada estéril foi utilizada como controle negativo.

#### **4.3.2 Ensaio de Difusão em Ágar da atividade antimicrobiana da solução de nisina**

Uma solução de nisina a 2,5 mg/mL foi feita em água destilada e esterilizada em membrana filtrante 0,22 µm (MilliPore). A solução foi mantida sob refrigeração até o momento do uso. A atividade antimicrobiana foi realizada conforme descrito no item anterior.

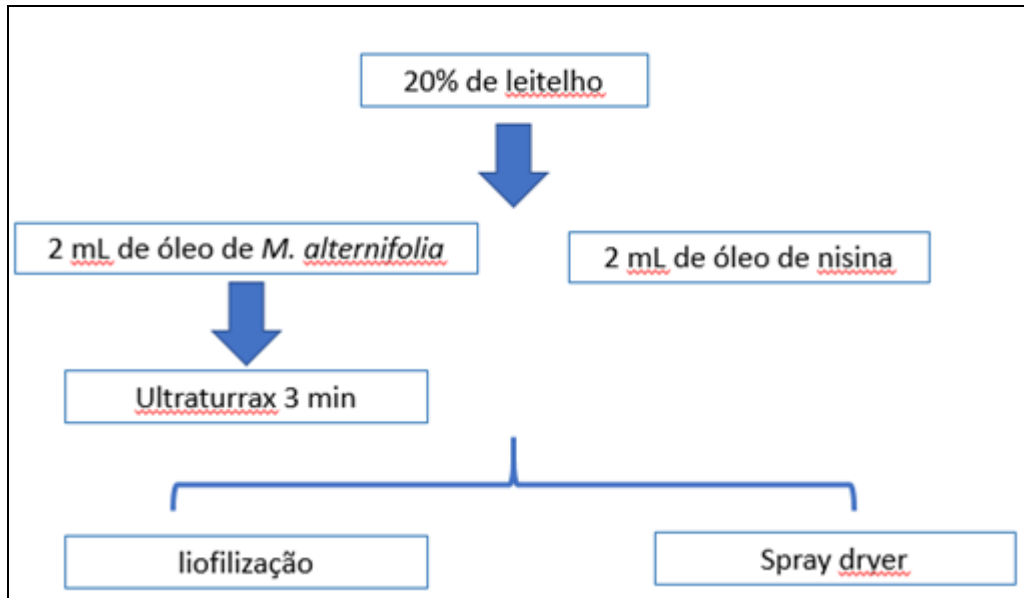
#### **4.3.3 Técnicas de microencapsulação**

A microencapsulação de óleo de *M. alternifolia* e nisina seguiu o esquema descrito na Figura 2. Cem mL de uma solução de leite (20%) foi preparada com água destilada e agitada até dissolução completa. Posteriormente, foi seguido o protocolo de emulsão com óleo de *M. alternifolia* ou mistura de solução de nisina seguido dos processos de encapsulação.

No processo de liofilização, as soluções foram distribuídas em placas de Petri e congeladas por 24 hs. Posteriormente, as placas foram levadas ao processo de liofilização por 24 hs.

Já o processo de *spray dryer*, seguiu-se os parâmetros de 190 °C na temperatura de entrada; temperatura de saída 100 °C; pressão de ar 5,0 kgf/cm<sup>2</sup> e taxa de fluxo 0,8 L/h. Os materiais obtidos, foram transferidos para tubos Falcon e mantidos sob refrigeração.

**Figura 2 – Processo de encapsulação de óleo de *M. alternifolia* e nisina**



Fonte: Autoria própria, 2023.

Para o controle negativo foi utilizado apenas o leiteiro nas mesmas condições.

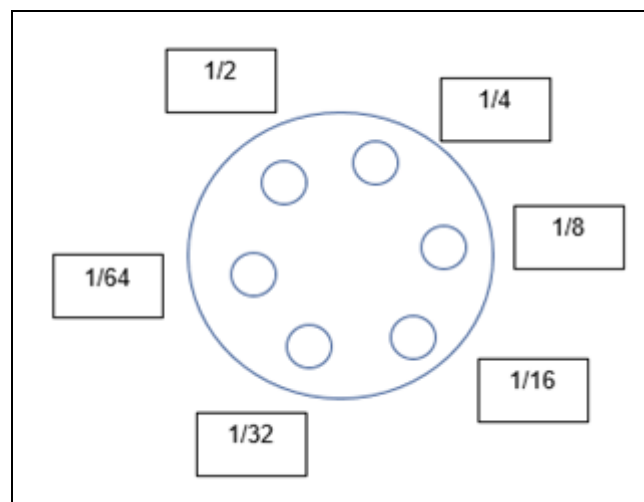
Após o processo de encapsulação, uma solução de 5 mg/mL de cada produto encapsulado foi preparada em água destilada estéril e testado a atividade antimicrobiana como na figura 2.

#### **4.2.5 Atividade antimicrobiana e determinação da concentração Inibitória Mínima (CIM) do material encapsulado**

CIM é definida como a menor concentração de óleo ou nisina encapsulada, que não apresentou crescimento antimicrobiano (PIRBALOUTI et al., 2016). Inicialmente, a solução de 5 mg/mL de óleo ou nisina encapsulada foi suspensa em água destilada e esterilizada em membrana filtrante 0,22 µm (MilliPore). Em seguida, o método de dupla diluição foi utilizado para atingir a faixa de concentração final de 1:64.

Posteriormente, 20 mL de meio BHI ágar foram adicionados a cada placa de Petri. Após a solidificação, 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensão bacteriana ( $1 \times 10^7$  ufc/mL) foram espalhadas na superfície do meio, e foram feitos orifícios no ágar (poços) e em cada poço foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de cada diluição do material encapsulado (Figura 3). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e a CIM foi considerado como sendo a diluição onde não apresentou halo de inibição.

**Figura 3 – Esquema da Concentração Inibitória Mínima utilizada nos testes antimicrobianos**



Fonte: Autoria própria, 2023.

#### 4.2.4 Teste de Estabilidade do Material Microencapsulado

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

#### 4.2.6 Medida de rendimento

O rendimento foi calculado como a razão entre o peso do pó coletado após a liofilização e a quantidade inicial de sólidos na suspensão inicial (ROCCIA et al., 2014 ).

#### 4.2.7 Solubilidade

Amostras de pó (2,5 g) foi colocado em 50 mL de água destilada em béquer de vidro e misturadas por 5 min a 500 rpm usando uma mesa agitadora ( HETTIARACHCHI; VORONIN; HARTE, 2019 ).

As suspensões obtidas foram centrifugadas a 700 × g por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi seco em estufa incubadora a 100 °C até obtenção de peso seco constante. A solubilidade foi calculada conforme a Figura 4.

**Figura 4 – Equação de solubilidade**

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{\text{Soluble solid (W}_s\text{)}}{\text{Total solid (W}_t\text{)}} * 100$$

**Fonte: Hettiarachchi; Voronin; Harte, 2019**

#### 4.2.8 Teor de Umidade

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

#### 4.2.9 Curvas de morte bacteriana

A curva de morte das bactérias teste foi realizada para verificar a ação antimicrobiana do material encapsulado durante o tempo determinado (PIRBALOUTI et al., 2016). Os isolados bacterianos ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) foram inoculadas em 10 mL de meio BHI líquido e adicionado 2 mL da suspensão dos encapsulados. Os caldos foram incubados a 37 °C por 24 h, sob agitação a 180 rpm em agitador rotativo. A cada tempo, uma alíquota foi retirada se realizou-se a contagem de unidade formadora de colônia.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os capítulos abaixo apresentam os resultados obtidos com as análises desenvolvidas.

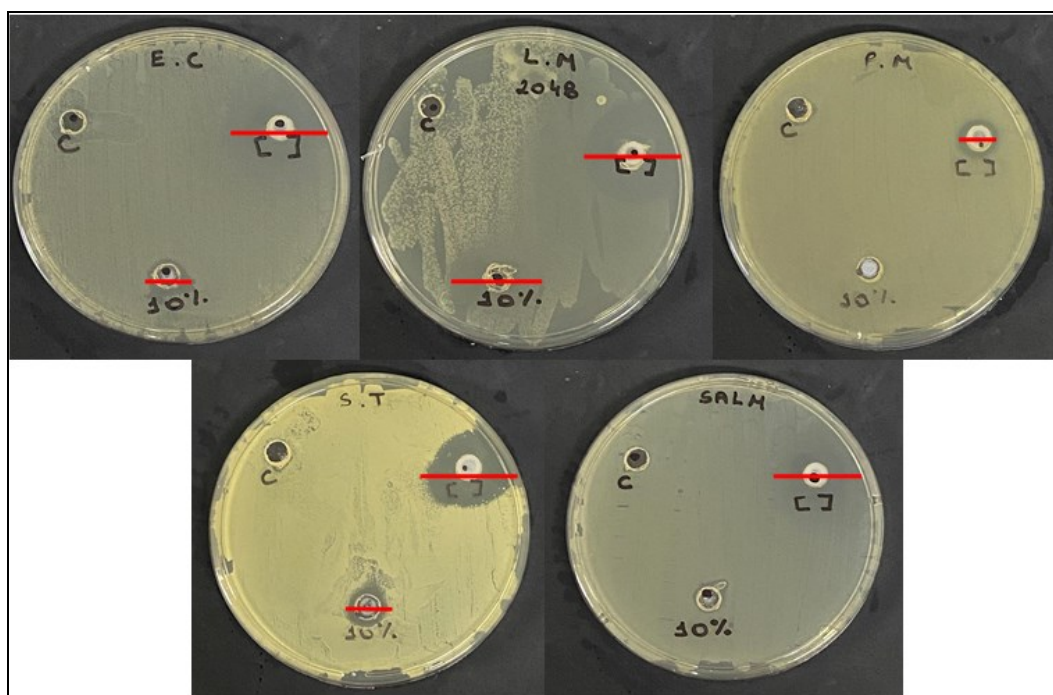
### 5.1 Ensaio de Difusão em ágar da atividade antimicrobiana do óleo de *M. alternifolia* e nisina

A Figura 5 apresenta o halo de inibição e a Figura 6 apresenta o tamanho do halo em mm, das bactérias teste *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Salmonella* sp. com o óleo de *M. alternifolia* pura e na solução a 10%.

Diversos estudos mostram que o TTO possui efeito bactericida in natura e bacteriostático em baixas concentrações (VAN VUUREN, SULIMAN e VILJOEN,2009).

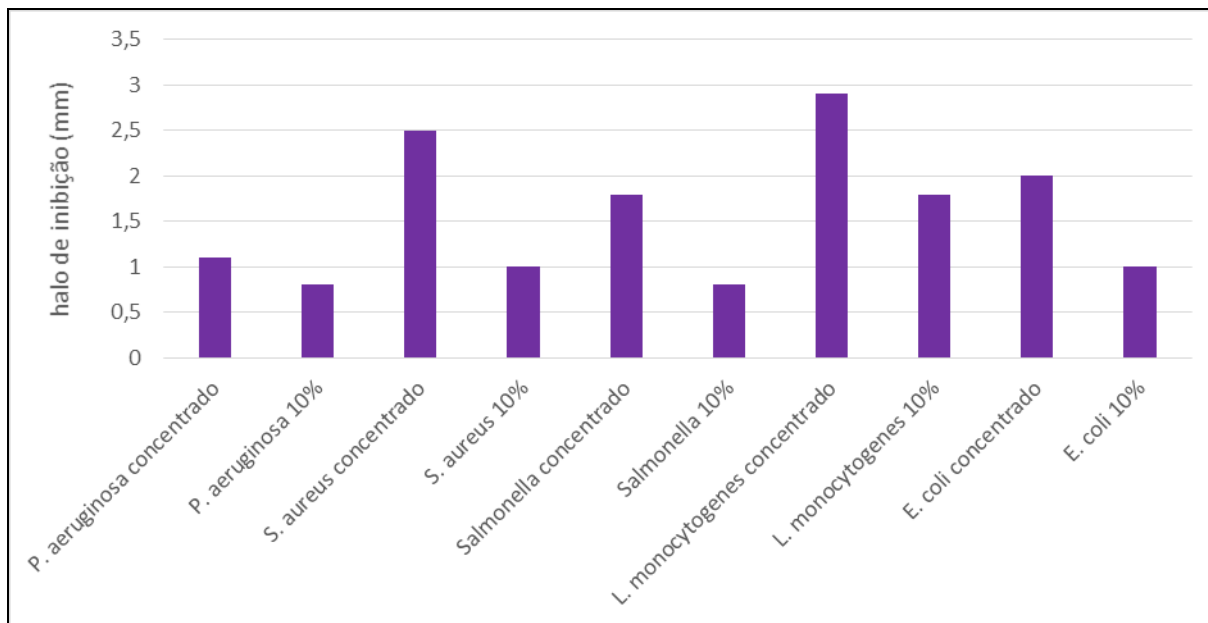
Óleos essenciais são sensíveis na presença de luz, calor, presença de oxigênio, umidade entre outros, sofrendo oxidação e o/ou degradação, por isso, para utilização se faz necessário o desenvolvimento de técnicas que protejam as propriedades desses óleos (HOSSEINI et al., 2013).

Figura 5 – Halo de inibição formado pelas bactérias teste com óleo de *M. alternifolia*



Fonte: Autoria própria, 2023.

**Figura 6 – Tamanho do halo de inibição formado com o óleo concentrado e solução 10%**



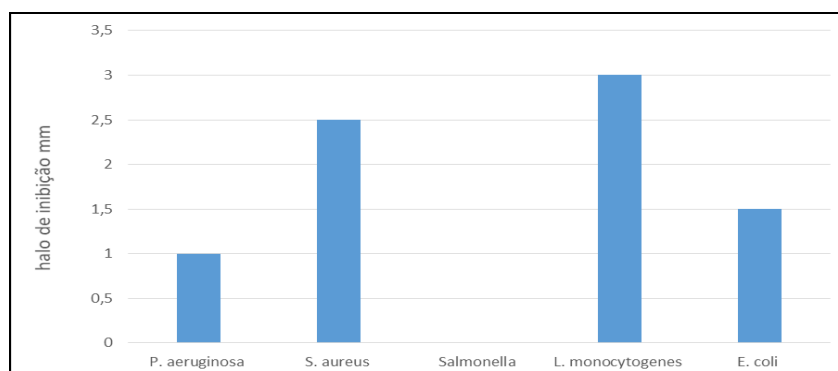
Fonte: Autoria própria, 2023.

Observou-se que o TTO apresentou atividade antimicrobiana contra as principais bactérias patogênicas presentes em alimentos.

Conforme apresentado na Figura 7, observa-se que a solução de nisina 2,5 mg/mL também inibiu as bactérias testadas, com exceção da *Salmonella*, visto que a nisina apresenta melhor inibição em bactérias Gram-positiva, e *Salmonella* é Gram-negativa. Então já foi inesperado a nisina inibir *E. coli*.

Foi realizado um teste de inibição com nisina e TTO juntos, mas os resultados não foram satisfatórios, não apresentando halo de inibição maior, portanto, utilizamos esses agentes antimicrobianos isolados.

**Figura 7 - Halo de inibição formado com nisina**



Fonte: Autoria própria, 2023.

## 5.2 TECNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO

Foram testadas duas técnicas de encapsulação, sendo por Spray Dryer e liofilização.

Na primeira técnica, houve grande acúmulo de pó na saída do equipamento, perdendo rendimento, e nos testes antimicrobianos não houve formação de halo de inibição com nenhum agente antimicrobiano (nisina e TTO).

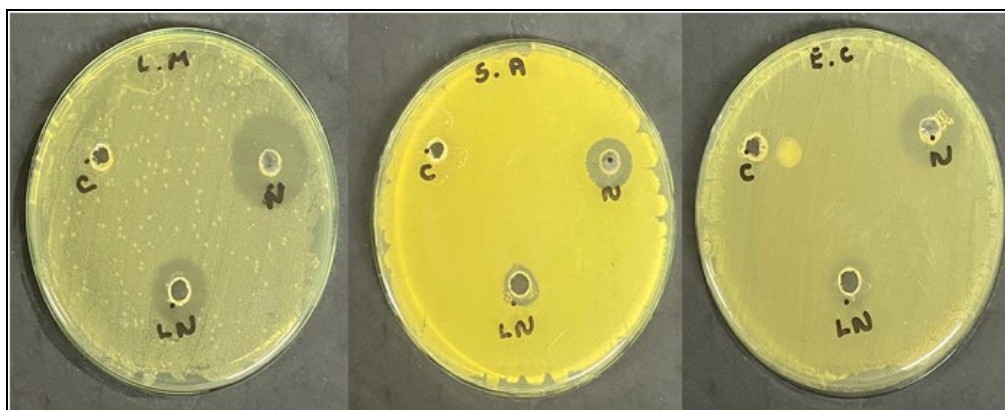
Provavelmente pela alta temperatura utilizada no equipamento de Spray Dryer. Já na técnica de liofilização, obtivemos material em pó fino, que foi utilizado em todos os testes.

## 5.3 Atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do material microencapsulado

Ao testar a inibição do TTO e leiteiro microencapsulado, não houve formação de halo; já o microencapsulado leiteiro e nisina houve halo de inibição para as bactérias *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*; porém não obteve-se o resultado quanto a bactéria *P. aeruginosa* não apresentando halo de inibição (Figura 8). O controle foi o leiteiro nas mesmas condições do teste de liofilização.

Embora a microencapsulação de óleos essenciais sejam uma alternativa viável para a proteção dos princípios ativos antimicrobianos naturais (AGUIAR et al., 2014), no estudo realizado não se obteve a encapsulação de TTO nas condições testadas. Novos estudos, material e condições de microencapsulação devem ser testados.

Figura 8 – Atividade antimicrobiana da nisina microencapsulada



Fonte: Autoria própria, 2023.

A Figura 9 representa a CIM da nisina microencapsulada contra *S. aureus*; sendo a diluição de 1:64 o valor para as demais bactérias testadas. Este resultado significa que mesmo em menores diluições, a nisina microencapsulada apresentou atividade antimicrobiana.

O teste antimicrobiano foi feito após 30 e 60 dias após a liofilização, sendo que a atividade antimicrobiana foi mantida na mesma eficiência, mostrando a estabilidade do produto.

Estas cápsulas poderiam ser usadas como agentes conservantes naturais na produção de alimentos ou obtenção de embalagens ativas, tendo como consequência direta a redução de conservantes químicos na sua formulação naturais (AGUIAR et al., 2014).

**Figura 9 – Concentração inibitória mínima**



Fonte: Autoria própria, 2023.

#### **5.4 Rendimento, solubilidade e Umidade da nisina encapsulada**

As propriedades físicas das amostras de pó são apresentadas na Tabela 1. Todos os testes foram realizados com o controle leite liofilizado. O rendimento foi considerado muito bom e a solubilidade e umidade da nisina microencapsulada foi maior que o controle. A solubilidade em água é um forte indicador de reticulações do leite liofilizado com nisina.

Tabela 1 - Propriedades físicas das amostras

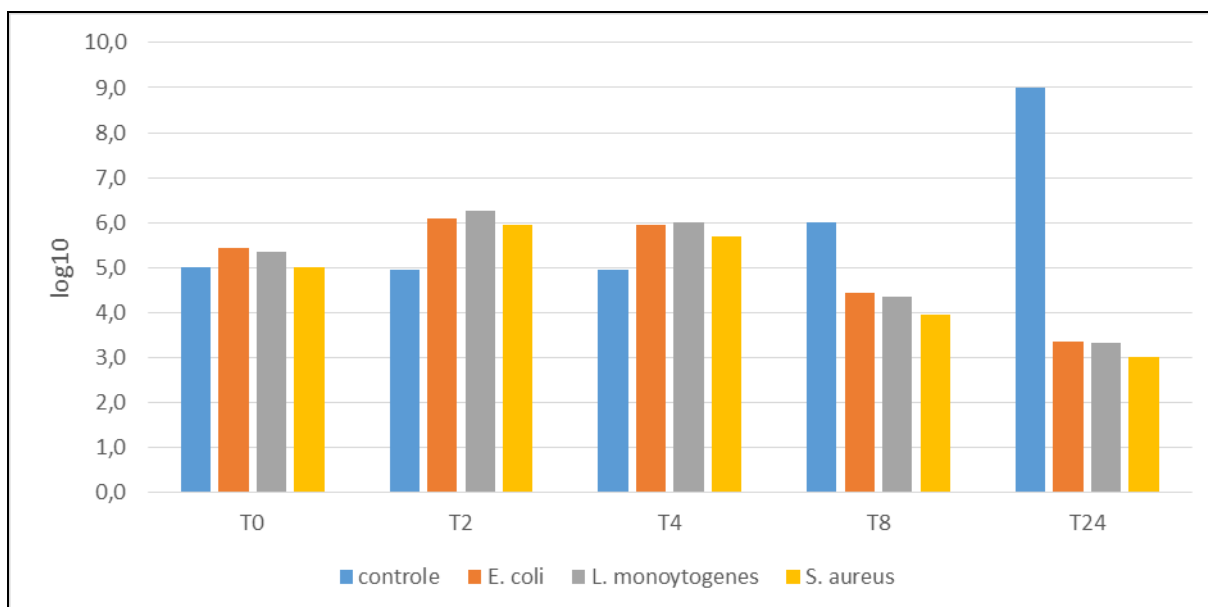
| Amostras                | Rendimento(%) | Solubilidade (%) | Umidade (%) |
|-------------------------|---------------|------------------|-------------|
| Controle                | 87            | 14               | 47          |
| Nisina microencapsulada | 86            | 20               | 43    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

Fonte: Autoria própria, 2023.

### 5.5 Curvas de morte bacteriano

A Figura 10 apresenta a curva de morte das bactérias testadas e a nisina encapsulada. Observamos que a partir de 8 h de incubação, a nisina encapsulada em leiteiro em contato com as bactérias já havia redução das bactérias testada, mantendo a inibição com 24 h. Esses resultados são muito promissores para utilizar a nisina encapsulada no controle de patógenos alimentares.

Figura 10 – Curva de crescimento



Fonte: Autoria própria, 2023.

## 6 CONCLUSÃO

Pelas pesquisas realizadas pode-se concluir que o óleo essencial de *M. alternifolia* não encapsulada apresentou ação antimicrobiana contra as cinco bactérias testadas, porém nas técnicas utilizadas de encapsulamento não se obteve o mesmo resultado. Novos protocolos e novas metodologias devem ser desenvolvidas para uma melhor análise de encapsulação do óleo de Melaleuca.

A nisina encapsulada em leiteiro pela técnica de liofilização, mostrou-se promissora, mantendo estabilidade e atividade antimicrobiana após 60 dias de armazenamento. Mostrando uma alternativa de utilização para o subproduto leiteiro, além de potencial conservante natural em alimentos, contribuindo então para a prevenção da contaminação dos alimentos por microrganismos nocivos à saúde humana e pelo aumento da vida útil dos mesmos.

Então para controle antimicrobiano em alimentos sem aditivos químicos destaca-se a importância do encapsulamento de compostos bioativos. O uso de técnicas de microencapsulação requer a participação de diferentes profissionais, sendo necessária a adesão desses conceitos nas diferentes áreas do saber, assim como a ampliação de estudos aplicando tais técnicas.

Ou seja, a microencapsulação mostra o potencial de combate antimicrobiano, em uma sociedade que precisa otimizar os recursos e minimizar os desperdícios sem perder a efetividade.

## REFERÊNCIAS

ANVISA, (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). **Regulamento técnico mercosul (RTM)**. 02 de dezembro. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/rtm\\_alimentos.asp](http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/rtm_alimentos.asp). Acesso em: 07 de abril de 2023.

ALVARENGA BOTREL, Diego et al. Avaliação das condições de secagem por pulverização nas propriedades do óleo essencial de orégano microencapsulado. **Revista Internacional de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 47, n. 11, p. 2289-2296, jan. 2012.

AGUIAR, U.N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de Croton zehntneri com  $\beta$ -Ciclodextrina. **Química Nova.**, Piauí, v. 37, p. 50-55, jan 2014.

AKBAR, Ali; ANAL, Anil Kumar. Preocupações com a segurança alimentar e patógenos transmitidos por alimentos, Salmonella, Escherichia coli e Campylobacter. **Revista de Biologia da FUUAST**. v. 1, n. 1, p. 5-17, jun. 2011.

BACON, R. Todd; SOFOS, John N. Características dos perigos biológicos em alimentos. **Manual de segurança alimentar**. v. 10, p. 157-95, maio 2003.

BURT, S. Óleos essenciais: suas propriedades antibacterianas e potenciais aplicações em alimentos. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, p. 223–253, jan. 2004.

BAKKALI, Fadil e cols. Efeitos biológicos de óleos essenciais – **uma revisão**. **Toxicologia alimentar e química**. v. 46, n. 2, p. 446-475, maio 2008.

BALLESTEROS, Lina F. et al. Encapsulação de compostos fenólicos antioxidantes extraídos da borra de café por liofilização e spray-drying usando diferentes materiais de revestimento. **Química dos alimentos**. v. 237, p. 623-631, abril. 2017.

BINTSIS, Thomas. Patógenos de origem alimentar. **AIMS microbiologia**. v. 3, n. 3, p. 529, maio. 2017.

BOWER, CK e cols. Barreiras proteicas antimicrobianas à adesão bacteriana: avaliação in vitro e in vivo de materiais implantáveis tratados com nisina. **Colóides e Superfícies B: Biointerfaces**. v. 25, n. 1, p. 81-90, abril. 2002.

BVS (Ministério da saúde). **Segurança dos Alimentos, responsabilidade de todos!**. Disponível em: < <https://bvsmms.saude.gov.br/07-6-seguranca-dos-alimentos-responsabilidade-de-todos-dia-mundial-da-seguranca-dos-alimentos/#:~:text=Atualmente%2C%20no%20mundo%2C%20estima%2D,com%20125%20mil%20mortes%20anuais>>. Acesso em: 02 de novembro de 2022.

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

DO CARMO, Eloá Lourenço; DE BARROS FERNANDES, Regiane Victória; BORGES, Soraia Vilela. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**. v. 1, n. 2, p. 30-44, maio 2015.

CARNEIRO, H. C. F. **Microencapsulação de óleo de linhaça por spray drying: influência da utilização de diferentes combinações de materiais de parede**. 2011.113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2011.

MAIA, Tatiana Faria; DONATO, Alexandre de; FRAGA, Marcelo Elias. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 17, n. 1, p. 105-116, jun. 2015.

CLEVELAND, Jennifer e cols. Bacteriocinas: antimicrobianos seguros e naturais para a preservação de alimentos. **Jornal internacional de microbiologia alimentar**. v. 71, n. 1, p. 1-20, jul. 2001.

DISASSA, Nigatu et al. Prevalência e padrão de suscetibilidade antimicrobiana de E. coli O157: H7 isolada de leite de vaca cru tradicionalmente comercializado na cidade de Asosa e arredores, oeste da Etiópia. **Medicina veterinária internacional**. v. 2017, p. 55-60, fev. 2017.

DOS SANTOS, Sarah Oliveira et al. **Aproveitamento de leiteiro no desenvolvimento de bebida láctea fermentada**. 2021. 36 f. Monografia



(Especialização em Tecnologia em Alimentos). Instituto Federal do Paraná, Goiana, Goiás, 2021.

DE SOUZA BORBOREMA, Daniele Pereira et al. Atividade antibacteriana e antibiofilme de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* microencapsulado e não microencapsulado. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**. v. 11, n. 6, p. 3-4, maio. 2022.

DA SILVA, Thaianne Marques et al. Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**. v. 37, n. 5, p. 49-55, jun 2015.

GUENTHER, Ernesto; ALTHAUSEN, Darrell. Os óleos essenciais. **Nova York: Van Nostrand**. v.1, p. 80-85, abril. 1948.

GILLES, Martin e cols. Composição química e propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de três espécies de eucalipto australiano. **Química dos Alimentos**. v. 119, n. 2, p. 731-737, jun. 2010.

GÓMEZ, Diego et al. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo e frigoríficos na Espanha. **Alimentos**. v. 4, n. 3, p. 271-282, abril. 2015.

GUPTA, Suphla et al. Encapsulamento: Retenção de óleo essencial/sabores/aromas nos alimentos. **Encapsulações**. v.2, p. 229-268, jun. 2016.

GHASEMI PIRBALOUTI, Abdollah et al. Composição química, atividade antioxidante e antibacteriana dos óleos essenciais de *Ferulago angulata*. **Biologia Farmacêutica**. v. 54, n. 11, p. 2515-2520, maio. 2016.

ROCCIA, Paola et al. Influência das condições de operação do spray-drying na qualidade do óleo de girassol em pó. **Tecnologia do Pó**. v. 254, p. 307-313, maio 2014.

MORENO, Izildinha et al. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Food Science and Technology**. v. 19, p. 23-28, jan. 2005.

RODRÍGUEZ, Eva et al. Diversidade de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de leite cru. **International Dairy Journal**. v. 10, n. 1-2, p. 7-15, abril. 2000.

ROSA, Livia Neves Santa e PIRES, Ana Clarice Dos Santos. Leiteiro: um coproduto versátil. **MilkPoint**. V.1 p. 1-2. fev. 2021.

SANTOS, Juliana Cantalino et al. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, abril 2011.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v. 3, n. 16, p. 26-30, jun. 2000.

SOBEL, Roberto; VERSIC, Ronald; GAONKAR, Anilkumar G. Introdução à microencapsulação e entrega controlada em alimentos. **Microencapsulação na indústria de alimentos**. V. 1 p. 3-12, abril. 2014.

SAGAVE, Lauren et al. **Atividade de diferentes formulações de Melaleuca alternifolia e terpinen-4-ol em isolados de Rhodococcus equi de diferentes origens**. 2014. 39 f. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2014.

SILVA, Karla; BOLINI, Helena Maria André. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 116-122, abril. 2006.

UCKER, Carla Daiane Lubke. **Óleo essencial de sementes e folhas de Syzygium cumini e óleo desodorizado de Melaleuca alternifolia: Potencial antimicrobiano e antioxidante**. 2016. 169 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

VAN VUUREN, SF; SULIMAN, S.; VILJOEN, AM A atividade antimicrobiana de quatro óleos essenciais comerciais em combinação com antimicrobianos convencionais. **Cartas em microbiologia aplicada**. v. 48, n. 4, p. 440-446, jan 2009.

Oliveira, M.M.M., et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, Botucatu. v.13, n.1, p.8-16, abril. 2011.

OZKAN, Gulay e cols. Uma revisão dos métodos de microencapsulação de antioxidantes alimentares: princípios, vantagens, desvantagens e aplicações. **Química dos alimentos.** v. 272, p. 494-506, jun. 2019.

TANEJA, Amit e SINGH, Harjinder. Desafios para a entrega de ácidos graxos n-3 de cadeia longa em alimentos funcionais. **Revisão anual de ciência e tecnologia de alimentos.** v. 3, p. 105-123, maio 2012.

HAYASHI, Toshio. Polímeros biodegradáveis para uso biomédico. **Progresso na ciência dos polímeros.** v. 19, n. 4, p. 663-702, jun. 2004.

HALL, Monique Canal et al. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais Nerol e Melaleuca puros e microencapsulados. **Brazilian Journal of Health Review.** v. 3, n. 3, p. 5331-5345, maio 2020.

HELANDER, Ilkka M.; MATTILA-SANDHOLM, Tiina. Barreira de permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas com referência especial à nisina. **Jornal internacional de microbiologia alimentar.** v. 60, n. 2-3, p. 153-161, maio. 2000.

HETTIARACHCHI, Charith A.; VORONIN, Graça L.; HARTE, Federico M. Secagem por atomização de leite condensado processado por jato de alta pressão. **Journal of Food Engineering.** v. 261, p. 1-8, abril. 2019.

HOSSEINI, Seyed Fakhreddin et al. Método de duas etapas para encapsulamento de óleo essencial de orégano em nanopartículas de quitosana: preparação, caracterização e estudo de liberação in vitro. **Polímeros de carboidratos.** v. 95, n. 1, p. 50-56, jan. 2013.

HOMAYOUNI, A. et al. Efeito da microencapsulação e amido resistente na sobrevivência probiótica e propriedades sensoriais de sorvete simbiótico. **Química dos alimentos.** v. 111, n. 1, p. 50-55, jan. 2008.

HILL, Laura E.; GOMES, Carmem; TAYLOR, T. Mateus. Caracterização de complexos de inclusão de beta-ciclodextrina contendo óleos essenciais (trans-cinamaldeído, eugenol, casca de canela e extratos de botões de cravo) para

aplicações de liberação antimicrobiana. **LWT-Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 51, n. 1, p. 86-93, abril. 2013.

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

ZHANG, Yuyu et al. Leiteiro como material de parede para microencapsulação de óleos ômega-3 por secagem por pulverização. **LWT-Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 127, p. 109-120, jul. 2020.

WANG, Xin e cols. Atividade antibacteriana e mecanismo do óleo essencial de gengibre contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Moléculas**. v. 25, n. 17, p. 3955, abril. 2020.

WOLFFENBUTTEL, Adriana Nunes. Óleos Essenciais. **Informativo CRQ-V**. v. 6 n. 105 p. 06-07, out. 2022.