

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Nutrição**  
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



**Dissertação**

**Óleo Essencial de Sementes e Folhas de *Syzygium cumini* e Óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*: Potencial Antimicrobiano e Antioxidante**

**Carla Daiane Lubke Ucker**

**Pelotas, 2016**

**Carla Daiane Lubke Ucker**

**Óleo Essencial de Sementes e Folhas de *Syzygium cumini* e Óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*: Potencial Antimicrobiano e Antioxidante**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.**

Orientador: Eliezer Avila Gandra

Co-orientadores: Caroline Dellinghausen Borges

Francine Novack Victoria

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

U16o Ucker, Carla Daiane Lubke

Óleo essencial de sementes e folhas de *Syzygium cumini* e óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* : potencial antimicrobiano e antioxidante / Carla Daiane Lubke Ucker ; Eliezer Avila Gandra, orientador ; Caroline Dellinghausen Borges, Francine Novack Victoria, coorientadoras. — Pelotas, 2016.

167 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Óleos essenciais. 2. Encapsulação. 3. Antimicrobianos. 4. Antioxidante. I. Gandra, Eliezer Avila, orient. II. Borges, Caroline Dellinghausen, coorient. III. Victoria, Francine Novack, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Carla Daiane Lubke Ucker

Óleo Essencial de Sementes e Folhas de *Syzygium cumini* e Óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*: Potencial Antimicrobiano e Antioxidante

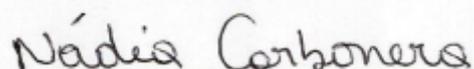
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data de defesa: 19 de outubro de 2016

Banca examinadora:



Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Eliezer Avila Gandra (Orientador). Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nádia Carbonera. Doutora em Engenharia e Ciências de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande.



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiane Kuka Valente Gandra. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã.

## Agradecimentos

A Deus pelo privilégio de poder realizar o curso de mestrado.

Aos meus pais, Hilmar e Helena, por toda ajuda nesse período.

À minha irmã Carmen, pela ajuda e incentivo.

Ao meu orientador, prof<sup>o</sup> Eliezer Avila Gandra, por todo o conhecimento passado, atenção, compreensão, incentivo e ajuda.

Às minhas co-orientadoras, Caroline Borges e Francine Victoria, pelo aprendizado e ajuda.

Às minhas amigas, Vanessa Oliveira e Cristina Gettens, por todo carinho, amizade, ajuda, incentivo e apoio.

Às estagiárias Natália e Roberta pela ajuda e amizade.

Ao prof<sup>o</sup> Rui por disponibilizar o Laboratório de Cromatografia e também reagentes, as meninas do laboratório Cristina Jansen, Josiane Rutz e Helene Abreu pela ajuda nas análises.

Ao prof<sup>o</sup> Rogério Freitag por disponibilizar o uso do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais e o equipamento Clevenger, e também a Ivandra pela disponibilidade de me ajudar durante o processo de extração.

À professora Massako pela doação do reagente DPPH.

Às técnicas do Laboratório de Físico-Química de Alimentos do campus Capão do Leão, Dionessa, Cleuza e Cristine, pela atenção.

À prof<sup>a</sup> Jozi Fagundes por disponibilizar a utilização do Laboratório de Microbiologia.

Às técnicas do laboratório do campus Anglo, Rose, Josi, Joana e Evelise, pelo carinho, ajuda e atenção.

À prof<sup>a</sup> Márcia Gularte pelo carinho e ajuda com meio de cultura.

À prof<sup>a</sup> Nádia Carbonera pelo carinho, disponibilidade e por aceitar participar da banca.

À prof<sup>a</sup> Tatiane Kuka Valente Gandra por aceitar participar da banca.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa.

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão,  
perder com classe  
e vencer com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve  
e a vida é muito para ser insignificante.*

*Augusto Branco*

## Resumo

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 em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Óleos essenciais obtidos de plantas podem apresentar propriedades antimicrobianas e antioxidantes, possibilitando sua utilização em alimentos e medicamentos. O jambolão (*Syzygium cumini*) e a *Melaleuca alternifolia*, ambos pertencentes à família Myrtaceae, podem ser utilizados na obtenção de óleo essencial. O forte odor característico e a insolubilidade dos óleos essenciais são fatores limitantes para sua aplicação, devido a isso uma alternativa para ampliar o uso é o processo de desodorização. Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar as características do óleo essencial de jambolão e óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*, microencapsular o óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* e avaliar suas propriedades. O óleo essencial de jambolão, extraído das sementes, apresentou como principal constituinte o  $\beta$ -cariofileno e não apresentou atividade antioxidante no método DPPH. Os óleos essenciais das folhas e sementes de jambolão apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Trichoderma* spp. e *Rizhopus* spp. O óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* apresentou baixo teor de compostos fenólicos e ausência de terpenos. Entretanto, apresentou atividade antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* e ausência de atividade antifúngica. Obteve-se alta eficiência de encapsulação do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* pela técnica de coacervação simples utilizando quitosana e ácido tânico, os resultados foram confirmados pela técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura. As micropartículas apresentaram formato irregular, tamanho distinto e inibição frente aos microrganismos avaliados, devido à propriedade antimicrobiana da quitosana, porém sem atividade antioxidante. Não foi observada influência quanto a presença do ácido tânico nas micropartículas. O óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* apresenta potencial de aplicação em

hambúrguer em função de ter apresentado atividade antimicrobiana *in situ* frente à *Escherichia coli*, já os óleos essenciais de jambolão não puderam ser analisados *in situ* devido ao baixo rendimento.

Palavras-chave: óleos essenciais; encapsulação; antimicrobianos; antioxidante.

## Abstract

UCKER, Carla Daiane Lubke. Essential oil of seeds and leaves of *Syzygium cumini* and deodorized oil of *Melaleuca alternifolia*: Antimicrobial and antioxidant potential. 2016. 169 f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Essential oils obtained from plants may have antimicrobial and antioxidant properties, allowing its use in food and medicine. The jambolan (*Syzygium cumini*) and *Melaleuca alternifolia*, both belonging to the Myrtaceae family can be used to obtain an essential oil. The strong characteristic odor and the insolubility of the essential oils are limiting factors for its use due to it an alternative to extend the use is the deodorization process. Thus the objective of this study was to evaluate the essential oil characteristics jambolan and deodorized oil *Melaleuca alternifolia*, microencapsulating the deodorized oil *Melaleuca alternifolia* and evaluate their properties. The essential oil jambolan, extracted from the seeds, presented as the main constituent the  $\beta$ -caryophyllene and did not show antioxidant activity in the DPPH method. Essential oils from the leaves and seeds jambolan showed antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Trichoderma* spp. and *Rizhopus* spp. The deodorized oil *Melaleuca alternifolia* showed low content of phenolic compounds and absence of terpenes. However, the oil showed antibacterial activity and no antifungal activity. It was obtained high encapsulation efficiency of deodorized oil *Melaleuca alternifolia* by simple coacervation technique using chitosan and tannic acid, the results were confirmed by Calorimetry Differential Scanning technique. The microparticles presented irregular size and distinctive shape. The microparticles showed potent inhibition compared to the microorganisms evaluated due to the antimicrobial property of chitosan, but no antioxidant activity. No significant differences were observed for the presence of tannic acid in the microparticles. The deodorized oil *Melaleuca alternifolia* has potential application in burger due to present antimicrobial activity against the *Escherichia coli*.

Key words: essential oils; encapsulation; antimicrobials; antioxidants.

## Lista de Figuras

### Revisão Bibliográfica

Figura 1	Semente, fruto, folha e árvore de jambolão.....	20
Figura 2	<i>Melaleuca alternifolia</i> .....	23

### Artigo 1

Figura 1	Cromatograma do óleo essencial de sementes de jambolão.....	101
----------	---	-----

### Artigo 2

Figura 1	Efeito do óleo desodorizado de <i>M. alternifolia</i> no ensaio DPPH.....	132
Figura 2	Termogramas de DSC.....	135
Figura 3	Micrografia de MEV das micropartículas.....	136
Figura 4	Micrografia de MEV das micropartículas.....	136

## Lista de Tabelas

### Revisão Bibliográfica

Tabela 1	Composição nutricional em 100 g de jambolão.....	20
Tabela 2	Composição fitoquímica de acordo com a parte da planta.....	21
Tabela 3	Concentração de óleos essenciais em algumas especiarias e atividade antimicrobiana dos compostos ativos.....	26

### Artigo 1

Tabela 1	Compostos presentes no óleo essencial de sementes de jambolão.	101
Tabela 2	Halos de inibição formados nos métodos de disco difusão e difusão em Agar, utilizando óleo essencial de folhas e sementes de jambolão.....	102
Tabela 3	Concentração inibitória mínima de óleo essencial de sementes de jambolão frente as bactérias <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	105
Tabela 4	Concentração bactericida mínima de óleo essencial de sementes de jambolão frente as bactérias <i>S. Typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	106
Tabela 5	Halos de inibição formados na técnica de difusão em Agar, usando os óleos essenciais de folhas e sementes de jambolão.....	108

### Artigo 2

Tabela 1	Atividade antimicrobiana de óleo desodorizado de <i>Melaleuca alternifolia</i> frente a <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	129
Tabela 2	Eficiência de encapsulação (%) dos compostos fenólicos do óleo desodorizado de <i>Melaleuca alternifolia</i> com quitosana e ácido tânico pelo método de coacervação simples.....	134

Tabela 3 Médias das concentrações de <i>Escherichia coli</i> em três formulações hambúrgueres armazenados em temperatura de 5 °C por até sete dias.....	139
---	-----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BDA	Agar Batata Dextrose
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCF	Cromatografia de Camada Fina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
BEM	Eosina Azul de Metileno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
G	Grama
GAE	Equivalente a Ácido Gálico
IC <sub>50</sub>	Concentração que Inibe 50% dos Radicais Presentes
LST	Lauril Sulfato de Sódio
M	Molar
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
Min	Minutos
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
NMP	Número Mais Provável
OE	Óleo Essencial
PCA	Agar Padrão para Contagem
PPM	Partes Por Milhão
Q	Quitosana
QIA	Quitosana impregnado com ácido tânico
QM	Quitosana e óleo desodorizado de Melaleuca alternifolia
QTM	Quitosana, ácido tânico e óleo desodorizado de Melaleuca alternifolia
QMIA	Quitosana e óleo desodorizado de Melaleuca alternifolia impregnado

com ácido tânico

QT Quitosana e ácido tânico

S Segundos

$\mu$ L Microlitros

$\mu$ g Microgramas

G Gravitacional

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>17</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Hipóteses</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>Revisão bibliográfica</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Compostos naturais</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Jambolão (<i>Syzygium cumini</i>)</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b><i>Melaleuca artemifolia</i></b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Atividade antioxidante</b>	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>Atividade antimicrobiana</b>	<b>25</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Métodos de avaliação do potencial antimicrobiano</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Salmonella Typhymurium</i>, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>30</b>
<b>2.6.1</b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>30</b>
<b>2.6.2</b>	<b><i>Salmonella Typhymurium</i></b>	<b>31</b>
<b>2.6.3</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b>32</b>
<b>2.6.4</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>33</b>
<b>2.7</b>	<b><i>Trichoderma</i> spp e <i>Rhizopus</i> spp</b>	<b>34</b>
<b>2.8</b>	<b>Microencapsulação</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Projeto de pesquisa</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Relatório do Trabalho de Campo</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b>Artigo 1</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Artigo 2</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Considerações Finais</b>	<b>149</b>
	<b>Referencias</b>	<b>150</b>

## 1 Introdução

Os conservantes químicos têm sido alvo de inúmeros estudos em função da possibilidade de apresentarem toxicidade ou potencial carcinogênico e/ou teratogênico, passando a ser uma questão considerada no momento da compra e do consumo dos alimentos. Constantes pressões são exercidas sobre as indústrias, para que desenvolvam alternativas naturais à preservação dos produtos alimentícios, bem como a remoção dos conservantes químicos utilizados. Uma das alternativas que merece destaque são os Sistemas Antimicrobianos Naturais (SAN), como os observados em extratos e óleos vegetais, resultantes de recursos renováveis (TASSOU et al., 1995; CARVALHO et al., 2006).

Antimicrobianos são substâncias que podem inibir a presença de microrganismos ou eliminá-los do meio em que se encontram, podem ter origem sintética ou natural. Devido ao aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos sintéticos, os estudos voltados à obtenção de antimicrobianos naturais têm aumentado em nível mundial, sendo que muitos extratos e óleos vegetais apresentam potencial antimicrobiano (RAMOS et al., 2007).

Nos óleos e extratos vegetais também podem estar presentes antioxidantes que consistem de substâncias capazes de inibir a oxidação através de diferentes mecanismos, retardando o início da oxidação ao desativar o oxigênio singlete ou eliminar/estabilizar radicais livres (OETTERER; REGITANO-d'ARCE; SPOTO, 2006).

Dentre as plantas utilizadas para obtenção de óleo essencial e extratos, encontram-se o jambolão (*Syzygium cumini*) e *Melaleuca alternifolia*, ambos pertencentes à família Myrtaceae, mas originários de regiões diferentes, sendo jambolão da Índia e *Melaleuca alternifolia* da Austrália (MORTON, 1987; HAMMER; CARSON; RILEY, 2016).

Os óleos essenciais podem ser obtidos de folhas, flores, frutos e sementes podendo ser aplicados em medicamentos e alimentos em função de suas propriedades (SILVA-SANTOS, 2006). Entretanto, são compostos complexos e voláteis, com forte odor característico, o que pode limitar a sua utilização (BAKKALI et al., 2006).

O jambolão possui diversos aproveitamentos, além de seus frutos poderem ser consumidos, a madeira da árvore pode ser utilizada comercialmente e o óleo essencial proveniente das sementes e das folhas pode ser obtido e utilizado por apresentar efeitos, tais como, antioxidantes, hipoglicemiantes, antialérgicos, anti-inflamatórios, antivirais e antibacterianos (CARVALHO, 2013). Da mesma forma, *Melaleuca alternifolia* pode fornecer óleo essencial com potencial antimicrobiano e antioxidante (CHEN et al., 2016).

Entretanto, a forma de utilização e estabilização das substâncias ativas que propiciam atividade antimicrobiana e/ou antioxidante influencia na eficácia de atuação destas sobre os microrganismos e/ou radicais livres, respectivamente. Nesse sentido, a microencapsulação, que é um processo em que ocorre o englobamento dessas substâncias utilizando finas camadas de polímeros, pode ocasionar a potencialização do efeito antimicrobiano e também das propriedades antioxidantes, além de proteger os compostos ativos de condições adversas de calor, luz e oxigênio. Dentre suas várias aplicações encontra-se a encapsulação de óleos (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Avaliar as características do óleo essencial de jambolão e óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*, microencapsular o óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* e avaliar suas propriedades.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Extrair os óleos essenciais das folhas e das sementes de jambolão (*Syzygium cumini*);
- Determinar a composição química do óleo essencial de sementes de jambolão;
- Avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante do óleo essencial de folhas e sementes de jambolão;
- Determinar a composição química do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*;

- Avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*;
- Microencapsular o óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* utilizando quitosana e ácido tânico pela técnica de coacervação simples;
- Caracterizar as micropartículas quanto à morfologia, eficiência de encapsulação, comportamento térmico, atividade antimicrobiana e antioxidante;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* e das micropartículas em hambúrgueres.

### 1.3 Hipóteses

- É possível extrair óleo essencial das folhas e sementes de jambolão (*Syzygium cumini*);
- O óleo essencial das folhas e sementes de jambolão possui potencial antioxidante e efeito antimicrobiano frente às bactérias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e fungos *Trichoderma* spp e *Rhizopus* spp.
- O óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* possui potencial antioxidante e efeito antimicrobiano frente às bactérias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e fungos *Trichoderma* spp e *Rhizopus* spp.
- É possível microencapsular o óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* utilizando quitosana e ácido tânico pela técnica de coacervação simples.
- A microencapsulação do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* potencializa as propriedades antimicrobianas e antioxidantes do óleo.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1 Compostos naturais**

Ultimamente tem aumentado a preocupação com a resistência dos microrganismos aos antibióticos comumente utilizados. O desenvolvimento dessa resistência ocorreu devido ao uso indiscriminado dessas substâncias, utilizando quantidades sub-terapêuticas nas terapias em humanos e também em animais, além do uso em plantas para facilitar seu desenvolvimento. Frente a isso, uma alternativa seriam os compostos naturais, como óleos essenciais e extratos vegetais (PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010).

O uso dos compostos naturais em produtos alimentícios, os tornam mais atrativos ao consumidor, que cada vez mais se interessa por fontes naturais de conservação. Também são menos propensos a apresentarem toxicidade e podem inibir deteriorações causadas por microrganismos em alimentos (PEREIRA et al., 2005).

Além do potencial antimicrobiano, tais compostos podem apresentar atividade antioxidante, podendo evitar o desencadeamento de reação oxidativa no alimento e no organismo animal. Frutas e outros vegetais apresentam compostos antioxidantes diferentes e variados, como vitaminas C e E, carotenoides, e ainda podem conter polifenóis que auxiliam na redução de cânceres e do risco de doenças cardiovasculares (BROINIZI et al., 2007).

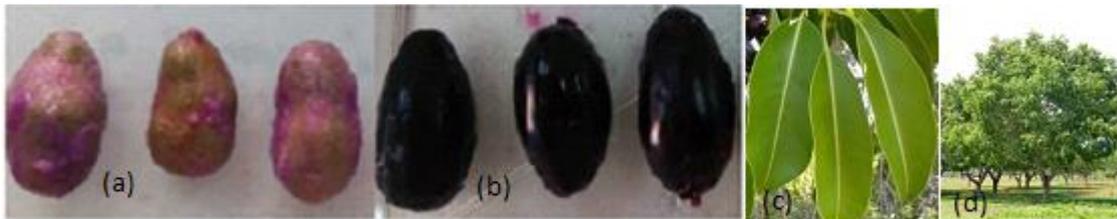
Os óleos essenciais constituem uma das fontes mais promissoras e baratas de constituintes com perfil biológico, apresentando grande alcance de sinergismo quando usado em combinação com antibióticos convencionais e drogas sintéticas, podendo ser aplicados como antimicrobianos e antioxidantes naturais (RASHID et al., 2013).

### **2.2 Jambolão (*Syzygium cumini*)**

Jambolão é um fruto carnoso tipo baga, em formato oval, alcançando de 3 a 4 centímetros de comprimento e 2 cm de diâmetro. É oriundo de uma árvore que pode chegar até 10 metros de altura com uma copa que alcança de 3 a 4,5 metros de

largura, possuindo uma folhagem farta, ramos cor acinzentada-claro e caule reto tipo lenhoso (MIGLIATO et al., 2006).

O período de frutificação é de janeiro a maio, sendo o fruto inicialmente de coloração branca, mudando para vermelha até que finalmente, quando maduro, se torna preto. Possui apenas uma semente envolvida pela polpa carnosa conhecida pelo sabor adstringente (BRASIL, 2015). Na figura 1 podem ser observadas a semente (a), o fruto (b), a folha (c) e a árvore (d).



**Figura 1:** (a) Semente, (b) fruto, (c) folha, (d) árvore do jambolão.

Com relação à composição nutricional, o fruto se destaca com índices mais elevados de fósforo e vitamina C, dentre os minerais e vitaminas, respectivamente (BRASIL, 2015). A composição do fruto pode ser observada na Tabela 1, obtida da Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO).

**Tabela 1.** Composição nutricional em 100 g de jambolão

Energia (Kcal)	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibra (g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)	Vit. C (mg)	Vit. B1 (mg)
41	0,5	0,1	10,6	1,8	3	4	27,1	0,17

Fonte: UNICAMP, 2011

Pode-se observar que o fruto possui maiores teores de carboidratos e fibras, sendo que, se comparado com frutas comumente consumidas, possui teor de carboidrato próximo ao abacaxi (12,3 g.100 g<sup>-1</sup> da fruta) e de fibras próximo à banana nanica (1,9 g.100 g<sup>-1</sup> da fruta) (UNICAMP, 2011). Possui teores de lipídios e calorias baixos, podendo, dessa forma, ser usado em dietas com restrições calóricas. Ainda apresenta pH em torno de 3,69 na polpa e 4,91 na semente, podendo, por isso, ser considerado um fruto ácido, já que para isso a espécie deve possuir um pH menor que 4,5 (PEREIRA et al., 2015).

Quanto à composição fitoquímica, esta varia de acordo com a parte da planta analisada, como pode ser observada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição fitoquímica de acordo com a parte da planta

Parte da Planta	Composição Fitoquímica
Folhas	Flavonoides glicosídeos acilados, quercetina, miricetina, miricetina 3-O-4-acetil-L-ramnopiranosídeo, triterpenoides, esterase, carboxilase galloyl e tanino.
Frutas	Rafinose, glicose, frutose, ácido cítrico, ácido gálico, ácido málico, antocianinas, delphinidina-3-gentiobioside, malvidina-3-laminabioside, petunidina-3-gentiobioside, cianidina diglicosídeo, penutidina e malvidina.
Sementes	Ricas em flavonoides.
Flores	Kaempferol, quercetina, miricetina, isoquercetina (quercetina-3-glicosídeo), miricetina-3-L-arabinosídeo, quercetina-3-D-galactosídeo, dihidromiricetina, ácido oleanólico, ácido acetil oleanólico, eugenol-triterpenóide A e eugenol-triterpenóide B.
Casca do caule	Ácido betulinico, friedelina, epifriedelanol, $\beta$ -sitosterol, eugenina e ésteres de ácidos graxos de epifriedelanol, $\beta$ -sitosterol, quercetina Kaempferol, miricetina, ácido gálico e elágico, bergeninas, flavonoides e taninos.

Fonte: AYYANAR e SUBASH-BABU, 2012.

Vizzotto e Pereira (2008), ao analisarem os frutos e sementes, observaram a presença de fenólicos totais na concentração de 1319,1 mg ácido clorogênico.100 g<sup>-1</sup> de sementes e 930,4 mg ácido clorogênico.100 g<sup>-1</sup> de frutos, e carotenoides totais

na concentração de 5,57 mg  $\alpha$ -caroteno.100 g<sup>-1</sup> de sementes e 0,43 mg  $\alpha$ -caroteno.100 g<sup>-1</sup> de fruto.

Somente o fruto possui a presença de antocianinas totais, com uma concentração de 141,8 (expressa em mg equivalente cianidina-3-glicosídeo.100 g<sup>-1</sup> amostra fresca) (VIZZOTTO; PEREIRA, 2008), sendo esse valor superior ao de outras frutas, como o mirtilo por exemplo, que é comumente conhecido por apresentar esses compostos, tendo 58, 95 mg.100 g<sup>-1</sup> de polpa (ROCHA, 2009). Os teores de carotenoides totais e fenólicos totais são superiores aos de butiá (5,5 e 906,54, respectivamente) e araçá vermelho (1,28 e 1036,0; respectivamente), frutas comuns na região sul (VIZZOTTO et al., 2012).

De acordo com Morton (1987), esse fruto possui reconhecidos efeitos na medicina popular, podendo ser utilizado cozido no tratamento de diarreia aguda e seu suco pode ser usado em casos de aumento de baço e para retenção de urina. O suco diluído em água pode ser usado para fazer gargarejo em casos de amigdalite e como loção para micose do couro cabeludo.

O jambolão possui diversas aplicações terapêuticas, como anti-inflamatória, antidiarreica, anticonvulsivante, no tratamento de diabetes, atividade antibiótica, antiemético, bactericida, entre outras dependendo da parte da planta utilizada (MIGLIATO, 2006). Segundo Vizzotto e Pereira (2008), podem ser utilizadas diversas partes da planta, como as cascas do caule, por exemplo, as quais atuam no controle da diabetes. Os frutos possuem ação antioxidante, hipoglicemiante e até mesmo anticarcinogênica, e as folhas controlam a diabetes, possuem ação antiviral, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antibacteriana.

O extrato de sementes acarreta diminuição dos índices de glicose no sangue, como foi percebido por Singh e Gupta (2007), em ratos diabéticos, também Sharma et al. (2011) observaram queda na glicemia em jejum, redução da hemoglobina glicosilada e aumento da atividade das enzimas chave da glicólise e redução significativa da atividade das enzimas chave de gliconeogênese.

## **2.2 *Melaleuca artemifolia***

O gênero *Melaleuca* pertence à família Myrtaceae, sendo que esta está distribuída por regiões tropicais e subtropicais, sendo divididas em duas subfamílias,

Myrtoidea que apresenta maior ocorrência na América tropical, e Leptospermoideae, que ocorre, principalmente, na Austrália, Malásia e Polinésia. Aqueles pertencentes a subfamília Leptospermoideae, incluem cerca de 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. *Melaleuca alternifolia* Cheel é usualmente conhecida na Austrália como “árvore de chá”, florescendo, principalmente, em áreas de pântano, próximas de rios (VIEIRA et al., 2004). Na figura 2 pode-se observar a planta.



**Figura 2:** *Melaleuca alternifolia*

Das folhas desta planta é obtido óleo essencial, o qual além de ser usado na medicina tradicional australiana, é também importante material para indústria farmacêutica, devido suas propriedades antimicrobiana e antioxidante, sendo utilizado em perfumes e cosméticos (CHEN et al., 2016).

Esse óleo é rico em monoterpenos, sendo o componente majoritário o terpinen-4-ol, seguido de 1,8-cineole,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpinene e *p*-cymene como majoritários (KIM et al., 2009).

Dentre seus diversos aproveitamentos, o potencial antimicrobiano desse óleo essencial já foi avaliado por Wilkinson e Cavanagh (2005), que observaram ação frente a *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* e Mazzarrino et al. (2015), frente a *Listeria monocytogenes*.

Entretanto, o forte odor característico apresentado pelos óleos essenciais e a insolubilidade são fatores limitantes para sua aplicação. Uma alternativa para reduzir o forte odor é o processo de desodorização por *winterização*. Nesse processo o óleo é resfriado a 6 °C, durante um período de 24 h, após é deixado em repouso de 6 a 8 h, ocorrendo a formação de cristais que são separados do óleo por filtração (LÓPEZ-MARTÍNEZ, CAMPRA-MADRID, GUIL-GUERRERO, 2004). Entretanto, a

desodorização pode ocasionar perda de compostos bioativos e alteração das propriedades do óleo.

### **2.3 Atividade antioxidante**

De acordo com a ANVISA (1965), antioxidantes são substâncias com a capacidade de retardar o surgimento de alterações oxidativas em alimentos. O interesse por tais substâncias tem aumentado nos últimos anos devido às implicações dos radicais livres sobre o organismo humano. Apesar de esses radicais serem produzidos a partir da oxidação, que é um processo normal durante a respiração, também podem ser prejudiciais quando originados de uma disfunção biológica, sendo produzidos em excesso (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Espécies reativas de oxigênio podem originar uma reação de peroxidação lipídica em membranas celulares, além de serem danosas ao DNA e causar oxidação de proteínas, essas reações podem acelerar o envelhecimento e causar doenças degenerativas como câncer, catarata, entre outras (SOUSA et al., 2007). Em alimentos podem causar alterações no sabor, aroma e coloração.

Os antioxidantes possuem dois mecanismos de ação, sendo classificados como primários e secundários, os primários interrompem a cadeia da reação ao doar elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, dessa forma transforma-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagem com radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode exercer reação com outro radical livre. Já os secundários, retardam o início da autooxidação através de mecanismos variados, como sequestro de oxigênio, complexação de metais, absorção de radiação ultravioleta, decomposição de hidroperóxidos ou desativação de oxigênio singlete (ANGELO; JORGE, 2007).

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante de frutas, entre esses o DPPH, que consiste de um método baseado na captura do radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) por antioxidantes resultando em uma absorbância de 515 nm, sendo que sua obtenção pode ocorrer de forma direta quando o reagente é diluído em meio orgânico (RUFINO et al., 2007).

O DPPH é um radical livre estável que apresenta um elétron desemparelhado que se desloca por toda a molécula (SHARMA; BHAT, 2009), o fato de se deslocar atribui à molécula a cor violeta (ALVES et al., 2010). O ensaio fundamenta-se em

medir a capacidade antioxidante da substância analisada em sequestrar o radical DPPH, ocorrendo a redução a hidrazina. Caso uma substância atue como doador de átomos de hidrogênio, a obtenção da hidrazina se dá com a alteração simultânea da cor violeta para amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

Muitas frutas podem apresentar atividade antioxidante, como é o caso do jambolão, que apresentou em análise de DPPH um valor de IC<sub>50</sub> (redução de 50% da concentração inicial de DPPH) de 94,98% para o extrato de sementes (LUZIA; JORGE, 2009) e das folhas foram relatados atividade antioxidante de extratos aquoso e hidroalcoólico na análise de DPPH, com valores de IC<sub>50</sub> de 83,23% e 119,13% respectivamente (SOARES, 2013).

## **2.4 Atividade antimicrobiana**

Antimicrobianos são substâncias que podem eliminar ou impedir o desenvolvimento de microrganismos. Sua origem pode ser bacteriana ou fúngica, ser sintético ou natural. Esses compostos são amplamente usados em terapias, porém o uso inadequado e exagerado, tanto em pessoas como em animais, pode resultar em alta resistência dos microrganismos a estas substâncias, as quais devem ser utilizadas de forma racional e conhecendo o tipo e a finalidade a que se destina (RAMOS et al., 2007), e o mesmo ocorre quando são utilizados na indústria de alimentos para conservação de produtos alimentícios.

Os antimicrobianos podem ser classificados de acordo com os microrganismos suscetíveis como antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários; de acordo com a origem como antibióticos (quando produzidos por microrganismos) e quimioterápicos (quando sintetizados em laboratório); de acordo com o efeito que causam sobre o microrganismo como bactericida (quando eliminam os microrganismos) e como bacteriostático (quando impedem o desenvolvimento dos microrganismos). Podem agir de diferentes formas, atuando sobre processos metabólicos como replicação cromossômica, inibição da síntese proteica e inibição metabólica; e sobre estruturas dos microrganismos como na parede celular e na membrana citoplasmática (BARROS; MACHADO; SPRINZ, 2013).

Quando um microrganismo tem a capacidade de se multiplicar em presença de um antimicrobiano, considera-se que este é resistente a essa substância, já quando o microrganismo não consegue se desenvolver, porém não é eliminado

mesmo em altas concentrações, pode-se dizer que este possui tolerância ao antimicrobiano (MACHADO; BARROS, 2006).

Devido ao aumento da resistência microbiana aos antimicrobianos e ao fato de alguns conservantes químicos apresentarem toxicidade ou potencial carcinogênico e/ou teratogênico, tem aumentado o interesse em meios de conservar os alimentos de maneira mais natural, porém, atualmente, poucos antimicrobianos naturais são permitidos pela legislação como os ácidos orgânicos fracos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e determinados quelantes, além de compostos antimicrobianos que podem ser encontrados em especiarias como os óleos essenciais. Em relação a esses, Forsythe (2010) descreve algumas especiarias que possuem óleos essenciais com atividade antimicrobiana, conforme pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração de óleos essenciais em algumas especiarias e atividade antimicrobiana dos compostos ativos

Especiarias	Óleo essencial na especiaria (%)	Compostos antimicrobianos em destilado ou extrato	Concentração do agente antimicrobiano (ppm)	Organismos
Pimenta-da-Jamaica ( <i>Pimenta dioica</i> )	3,0-5,0	Eugenol, Metil eugenol	1000 150	Levedura, <i>Acetobacte</i> <i>Clostridium</i> <i>botulinum</i> 67 B.
Cássia ou canela chinesa ( <i>Cinnamomum cassis</i> )	1 ,2	Aldeído cinâmico, Acetato cinamil	10-100	Levedura, <i>Acetobacter</i> .
Cravo ( <i>Syzgium aromaticum</i> )	16,0- 19,0	Eugenol, Acetato de eugenol	1000 150	Levedura, <i>Clostridium</i> <i>botulinum</i> , <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> .
Canela em casca ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	0,5-1,0	Aldeído cinâmico, Eugenol	10-1000 100	Levedura, <i>Acetobacter</i> , <i>Clostridium</i>

				<i>botulinum</i> 67 B, <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> . <i>Clostridium</i> <i>botulinum</i> 67 B,
Alho ( <i>Allium sativum</i> )	0,3-0,5	Alilsulfonil, Alilsulfito	10-100	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> , Levedura, Bactéria. Levedura,
Mostarda ( <i>Sinapisnigra</i> )	0,5-1,0	Alilisotiocianato	22-100	<i>Acetobacter</i> , <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> . <i>Vibrio</i>
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	0,2-0,8	Timol, Carvacrol	100 100-120	<i>parahaemolyticus</i> , <i>Clostridium</i> <i>botulinum</i> A, B, E. <i>Vibrio</i>
Tomilho ( <i>Thymus vulgaris</i> )	2,8	Timol, Carvacrol	100 100	<i>parahaemolyticus</i> , <i>Clostridium</i> <i>botulinum</i> 67 B, Bactéria Gram- positiva, <i>Aspergillus</i> <i>parasiticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , Aflatoxina B1 e G1.

---

Fonte: FORSYTHE, 2010.

A maioria dos óleos essenciais tem caráter hidrofóbico e por isso atuam no rompimento da membrana celular, fazendo com que ocorra a perda de funcionalidade, porém para que ocorra a eliminação dos microrganismos no alimento é necessária alta quantidade de antimicrobiano, tornando sensorialmente intolerável, por isso geralmente são usadas concentrações que se restringem a inibir a multiplicação dos microrganismos (FORSYTHE, 2010).

Os óleos essenciais podem apresentar diferentes efeitos antimicrobianos. Santurio et al. (2007) ao comparar os óleos de tomilho, orégano e canela, frente à 20 sorovares de *Salmonella enterica*, observaram que os isolados do sorovar Derby são menos suscetíveis ao óleo de orégano, porém o inverso ocorre quando usado tomilho ou canela. Já o isolado do sorovar Mbandaka é claramente sensível ao óleo de tomilho, mas mais resistente ao orégano ou canela, isso demonstra que existe certa especificidade em relação à ação dos óleos sobre os microrganismos.

O óleo essencial de eucalipto é capaz de inibir o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6.538, *Escherichia coli* ATCC 8.739, *Salmonella epidermidis* ATCC 12.228, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9.027 e *Candida albicans* ATCC 10.231, mostrando que os óleos essenciais podem ser utilizados não apenas contra bactérias, mas também contra fungos (FRANCO et al., 2005). Além disso, podem apresentar atividade acaricida como a apresentada pelo óleo essencial de embiriba, planta típica do nordeste (PONTES et al., 2007).

Em relação as bactéria serem gram positivas ou gram negativas, geralmente as gram negativas apresenta menor sensibilidade aos óleos essenciais do que as gram positivas, devido a presença da camada de polissacrídeos na parede celular (SILVA et al., 2009). Porém alguns óleos essenciais podem conter em sua composição substâncias que facilitam sua penetração nessa camada, por isso a presença de proteínas porinas, a permeabilidade da membrana das bactérias e a distribuição intracelular dos constituintes dos óleos essenciais possuem influencia direta no modo de difusão e ação desses sobre as bactérias, desta forma a atuação dos óleos essenciais pode variar em relação a diferentes grupos de microrganismos (VALERIANO et al., 2012).

#### **2.4.1 Métodos de avaliação do potencial antimicrobiano**

É possível medir a resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) (MACHADO; BARROS, 2006).

Concentração inibitória mínima é a menor quantidade de antimicrobiano com capacidade de inibir o desenvolvimento do microrganismo, sendo que podem ocorrer variações entre cepas da mesma bactéria. Já a concentração bactericida mínima é a

menor quantidade de antimicrobiano com capacidade de eliminar o microrganismo, sua determinação é mais complexa e trabalhosa (MACHADO; BARROS, 2006).

Existem muitos trabalhos que utilizam esses métodos para avaliar o potencial antimicrobiano de óleo essencial, como Castro et al. (2007) que analisaram a atividade antibacteriana de própolis do nordeste e sudeste, para isso usaram os métodos de CIM e CBM atingindo resultados satisfatórios, da mesma forma Aumeeruddy-Elalfia, Gurib-Fakimb e Mahomoodallya (2015) avaliaram a atividade antibacteriana de 9 plantas medicinais utilizando esses métodos.

Existem também outros métodos para verificar se uma substância possui efeito antimicrobiano sobre determinado microrganismo, são eles: ensaios bioautográficos, de diluição e de difusão (SILVEIRA et al., 2009).

Os ensaios bioautográficos utilizam placas de cromatografia de camada fina (CCF) para fazer a análise, os constituintes separados entram em contato com placas de Agar antecipadamente inoculadas com o microrganismo que está sendo testado, se houver formação de zonas de inibição de crescimento microbiano significa que existem componentes antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2009).

O ensaio de diluição consiste em utilizar um meio de cultura líquido onde é inserido o microrganismo testado e, posteriormente, se adiciona as substâncias a serem analisadas, quando passar o período de incubação, o desenvolvimento microbiano é verificado por leitura turbidimétrica por meio de espectrofotômetro em comprimento de onda adequado (SILVEIRA et al., 2009).

O ensaio de difusão se baseia na difusão da substância a ser analisada em meio sólido contendo o microrganismo. Após a difusão há o surgimento de um halo em que não ocorre o desenvolvimento microbiano, sendo este chamado de halo de inibição, é um método quantitativo onde o resultado pode ser graduado. Podem ser usados tipos distintos de reservatórios como poços feitos no meio de cultura, discos de papel e cilindros de porcelana ou aço inoxidável, a maneira como a substância entra em contato com o meio de cultura contendo o microrganismo é que difere o tipo de método difusão, entre os mais comuns estão o disco difusão, o método dos cilindros e o de poços (SILVEIRA et al., 2009).

O mais comumente utilizado é o disco difusão, Victoria et al. (2012) utilizaram esse método para avaliar o potencial antimicrobiano das folhas de pitangueira alcançando resultados positivos, bem como Gavanji et al. (2014) que compararam a

atividade antimicrobiana de antibióticos artificiais com óleos essenciais através deste método.

## **2.5 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhymurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

### **2.5.1 *Listeria monocytogenes***

*Listeria* spp. são bactérias Gram positivas, no formato de bastonetes curtos e cocobacilos com tendência de formação de cadeias com três a cinco células, possuem relação filogenética com as espécies de *Lactobacillus* e, da mesma forma que as bactérias lácticas homofermentativas, não têm capacidade de produzir gás, porém produzem catalase e ácido a partir da glicose (MADIGAN et al., 2010).

São aeróbias facultativas, não formam esporos, possuem 0,5 µm de largura e 1-1,5 µm de comprimento. O gênero *Listeria* é, atualmente, composto por quinze espécies: *Listeria monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* e *L. grandensis* (WELLER et al., 2015), sendo que apenas *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* são patógenos. *L. monocytogenes* pode infectar o homem e animais, enquanto a *L. ivanovii* é um agente patogênico de animais, estando raramente envolvida em casos que acometem o homem (LIU, 2006).

Por possuírem uma alta resistência frente alterações de concentração de sal, pH e temperatura, podem ser encontradas em diferentes ambientes como em alimentos, água, efluentes e solo. *L. monocytogenes* é capaz de permanecer por longo tempo em condições hostis, conseguindo realizar sua multiplicação sob temperaturas de refrigeração (2°C – 4°C), exigindo uma atenção maior das indústrias, até porque sua presença pode acarretar grave doença e está relacionada a muitos episódios de doenças transmitidas por alimentos, envolvendo tipos distintos como queijo, molhos, produtos cárneos e leite (PERES, 2010).

A doença causada por essa bactéria é chamada listeriose, está relacionada com casos de aborto, septicemia e meningite, atingindo principalmente neonatais, gestantes, idosos e imunodeprimidos, sendo raros os casos envolvendo pessoas saudáveis (FAI et al., 2011).

Estudos recentes reportam o efeito de diferentes óleos essenciais na inibição do crescimento deste microrganismo, como o caso do óleo essencial das folhas de pitanga (*Eugenia uniflora*) (VICTORIA et al., 2012), e óleos essenciais comerciais de laranja que apresentaram tal efeito frente a *L. monocytogenes* e *L. innocua* (FRIEDLY et al., 2009).

### 2.5.2 *Salmonella* Typhimurium

*Salmonella* spp. são bactérias Gram negativas, móveis, não esporuladas, anaeróbias facultativas e, com exceção da *Salmonella* Typhi, não apresentam cápsula (SAMARANAYAKE, 2012). Fazem parte da família Enterobacteriaceae, que abrange as espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo que essa última contém as linhagens patogênicas divididas em seis subespécies e 2564 sorovares (SANTURIO et al., 2007).

Os problemas causados pela bactéria podem ser separados em três grupos: febre tifoide, febre entérica e salmonelose.

Febre tifoide é causada por *Salmonella* Typhi, atinge somente o homem sem possuir reservatórios nos animais. O modo mais comum de transmissão é através de alimentos e água contaminados com fezes, entre os sintomas envolvidos estão septicemia, vômitos, diarreia e febre alta, sendo que a pessoa contaminada pode se tornar portador assintomático, constituindo em uma fonte da doença. O tempo de incubação pode variar de 7 a 21 dias e os sintomas podem perdurar por até 8 semanas, podendo levar a óbito.

Febre entérica é causada por *Salmonella* Paratyphi A, B e C, os sintomas incluem gastroenterite, vômitos e febre, podendo ocorrer septicemia. A bactéria pode ser transmitida através do consumo de água e alimentos como mariscos, vegetais crus, leite e ovos, o tempo de incubação pode variar de 6 a 48 horas podendo durar até três semanas.

A salmonelose é causada pelos demais sorovares de *Salmonella*, é o tipo de infecção causada por *Salmonella* mais comum, leva a uma infecção gastrointestinal sendo que os principais sintomas são vômitos, dores abdominais e febre baixa, raramente ocorrem óbitos. O tempo de incubação é de 12 a 36 horas, podendo perdurar por até 72 horas. Pode ser transmitida por alimentos contaminados como carne e ovos crus (SHINOHARA et al., 2008).

Essa infecção possui importância relevante, influenciando no comércio internacional, sendo uma preocupação para as autoridades sanitárias. Por sua vasta disseminação entre animais, podendo resistir por grande tempo no meio ambiente, tem um papel de destaque em saúde pública (SANTURIO et al., 2007).

*Salmonella* Typhimurium está comumente envolvida em casos de salmonelose infantil, possuindo resistência a grande parte dos antimicrobianos normalmente utilizados para terapia (SHINOHARA et al., 2008). O aumento da resistência desse microrganismo impulsionou estudos com antimicrobianos naturais como o trabalho de Basti, Misaghi e Khaschabib (2007) que avaliaram o efeito antimicrobiano de uma planta típica do Iran conhecida como Avishan Shirazi (*Zataria multiflora* Boiss.), que atingiu resultados satisfatórios frente a *Salmonella* Typhimurium, e Yun et al (2015) que testaram um revestimento com óleo essencial de canela e mostarda em tomate cereja em substituição a revestimentos artificiais alcançando a inativação da bactéria.

### **2.5.3 *Escherichia coli***

São bactérias Gram negativas, pertencem à família Enterobacteriaceae, sendo encontradas na microbiota entérica de animais. Comumente pode-se isolar em alimentos como leite e produtos refrigerados (CAMPOS et al., 2006).

Algumas linhagens de *Escherichia coli* são patogênicas, essas são separadas em seis grupos: enteroinvasoras, enterohemorrágicas, enteroagregativas, enteropatogênicas, enterotoxigênicas e de aderência difusa, subdivididas por sua habilidade de invasão celular, produzir toxinas ou modo de apresentação dos sinais clínicos nos animais e/ou no homem (RIBEIRO et al., 2006).

*Escherichia coli* êntero-hemorrágica (EHEC) produz uma toxina chamada Verotoxina, a qual é semelhante à Shiga toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*. Após ser ingerido um alimento contaminado com essa bactéria, mais precisamente a linhagem O157:H7, se aloja no intestino delgado e a Verotoxina é originada, acarretando desde diarreia sanguinolenta até insuficiência renal. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é responsável pela chamada diarreia dos viajantes, que é uma infecção entérica que leva a diarreia aquosa, comumente ocorre em pessoas que estão viajando, já que os habitantes locais já estão imunes à bactéria. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) não é invasiva nem produz toxinas, está

envolvida com casos de diarreia infantil e em bebês. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) causa doença invasiva do cólon, sendo responsável por diarreia aquosa, que por vezes pode ser sanguinolenta (MADIGAN et al., 2010).

*Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) causa uma diarreia aguda e persistente que ocorre, principalmente, em crianças de países em desenvolvimento (REGUA-MANGIA et al., 2009). A *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) possui a característica de se aderir de forma difusa em cultura de células epiteliais “*in vitro*”, pode causar infecções no trato urinário e a patogenicidade entérica ainda não é confirmada (BARBOSA, 2010).

Para poder inibir a presença desta bactéria pode-se aplicar óleo essencial de diferentes plantas, como o obtido das folhas de eucalipto, que mostrou ser um bom agente antibacteriano (BACHIR; BENALI, 2012), assim como o óleo essencial de uma planta conhecida popularmente como vassoura (*Baccharis dracunculifolia* D.C.) apresentou inibição ao desenvolvimento do microrganismo (FERRONATTO et al., 2007).

#### **2.5.4 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus* spp. são bactérias Gram positivas, em formato de cocos, catalase positiva, podendo medir 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, não são móveis nem formam esporos, normalmente não possuem cápsula. Possuem diversas formas, podendo estar sozinha, em pares, em cadeias curtas ou reunidas em formato de cacho de uva, isso se deve a divisão celular que é feita em três planos perpendiculares. Faz parte da família Micrococcae, bem como os gêneros *Stomatococcus*, *Micrococcus* e *Planococcus* (SANTOS et al., 2007).

Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por 49 espécies e 26 subespécies (EUZÉBY, 2015), podendo se isolar 17 delas de amostras biológicas humanas, sendo o *Staphylococcus aureus* a espécie de maior interesse, a qual está comumente envolvida com variadas infecções em seres humanos e em casos intoxicação alimentar (SANTOS et al., 2007).

Os *Staphylococcus* estão presentes naturalmente na pele e no trato respiratório superior das pessoas, consistindo em um microrganismo oportunista. A facilidade de desenvolvimento do *S. aureus* em alimentos bem como sua capacidade de produzir toxinas termorresistentes (enterotoxinas), faz com que

frequentemente esteja envolvido com casos de intoxicação alimentar, causando náuseas, diarreia e vômitos dentro de uma a seis horas (MADIGAN et al., 2010).

Existem outras doenças causadas pelo *S. aureus* podendo ocorrer devido a invasão de tecidos ou pelas toxinas, são elas: sico (bicho-de-pé), carbúnculo, foliculite (infecção do folículo piloso), furúnculos situados na região cervical posterior, antraz, hidradenite (inflamação das glândulas sudoríparas), impetigo e hordéolo (terçol) (SANTOS et al., 2007).

Métodos alternativos vêm sendo pesquisados para inibir a presença desse microrganismo, Packer e Luz (2007) avaliaram o potencial antimicrobiano de 6 óleos essenciais: de copaíba, alecrim, melaleuca, alho, andiroba e própolis frente *S. aureus*, obtendo resultados satisfatórios, sendo que o de alecrim e o de melaleuca apresentaram os mais expressivos. Da mesma forma Martucci et al. (2015) analisaram o potencial antimicrobiano de orégano e lavanda para inibir este microrganismo concluindo que esses óleos exibem boas propriedades antimicrobianas, inibindo o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*.

## **2.6 *Trichoderma* spp e *Rhizopus* spp.**

*Trichoderma* spp. é um fungo de vida livre, encontrado no solo e na madeira, em locais de clima tropical e temperado, sendo que pode ser encontrado em uma concentração de  $10^1$  até  $10^3$  propágulos por grama de solo (HARMAN et al., 2004).

Apresenta a capacidade de decompor e auxiliar na mineralização de resíduos vegetais, facilitando a disponibilidade de nutrientes para plantas, sendo por isso um agente ecológico importante (SAITO et al., 2009).

Pode ser utilizado no controle de fitopatogênicos, auxiliando o desenvolvimento das plantas devido a inibir a presença de outros tipos de fungos e bactérias (MACHADO et al., 2012). Porém, apesar dessas vantagens, o *Trichoderma* faz parte do grupo de tricoteceno, o qual pode produzir micotoxinas capazes de causar problemas a saúde de quem consome um alimento que as contém, como náuseas e diarreia (FREIRE et al., 2007).

*Rhizopus* spp. faz parte da ordem Mucolares, estes possuem uma ampla distribuição geográfica, podendo estarem presentes em frutas, vegetais em decomposição, solo e excreções de animais. Apresentam baixa virulência, porém

podem causar infecções oportunistas, as colônias são visíveis a olho nú, possuindo manchas pretas e aspecto felpudo (FREY; CORNEJO; DIAZ, 2012).

Pode causar podridão em frutos no período pós-colheita, invadindo os tecidos na presença de ferimentos e causando um apodrecimento rápido. A podridão causada tem como característica ser mole e aquosa, tendo um desenvolvimento de micélios brancos seguido de esporângios negros. Temperatura de 25 °C e umidade alta auxiliam o crescimento desse fungo, cuidados devem ser tomados durante o transporte e armazenamento de frutas (KIMATI et al., 1997).

## **2.7 Microencapsulação**

A encapsulação é uma técnica em que substâncias, como conservantes, nutrientes, entre outras, são acondicionadas em cápsulas que, se aprovadas para o consumo, podem ser consumidas. Pode ser definida como um processo em que ocorre a retenção de uma substância (agente ativo) dentro de outra substância (material de parede). A substância encapsulada pode também ser chamada de recheio ou núcleo e a que forma a cápsula de cobertura, parede ou encapsulante (NEDOVIC et al., 2011).

De acordo com o tamanho, as cápsulas são separadas em três grupos: macro, que são maiores que 5000 µm; micro, que possuem tamanho entre 0,2-5000 µm; e nano, que são menores que 0,2 µm (REBELLO, 2009).

Em relação à disposição do núcleo e cobertura, são classificadas de duas maneiras: as que o núcleo está claramente fixado no centro da cápsula, sendo circulado por um filme determinado e contínuo do material de cobertura; e as que o núcleo é disperso de forma uniforme em uma matriz. Pode-se dizer que o primeiro funciona como um sistema tipo reservatório, caracterizando as “verdadeiras microcápsulas”, já o segundo funciona como um sistema matricial, o que caracteriza as microsferas. A diferença básica entre as microsferas e as microcápsulas é que na primeira uma pequena parte da substância encapsulada fica exposta na superfície, o que não ocorre nas microcápsulas, estas podem ter mais de um núcleo ou diversas coberturas para um mesmo núcleo (AZEREDO, 2005).

A microencapsulação pode ser utilizada na indústria de alimentos devido aos seguintes fatores: diminui interações da substância que forma o núcleo com o ambiente; reduz a velocidade de evaporar ou de transferir compostos do núcleo para

o ambiente; aumenta a facilidade de manipular a substância encapsulada; permite que se possa ter controle da liberação; reduz odores e sabores estranhos; e possibilita que o composto encapsulado se disperse de forma homogênea em um produto alimentício (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Diversas substâncias podem ser utilizadas como coberturas, como exemplo as gomas (carragena, goma arábica, alginato de sódio), carboidratos (açúcar, amido, celuloses, dextrinas, xarope de milho), quitosana (fonte alternativa obtida da casca de crustáceos), lipídeos (ácido esteárico, cera, óleos e gorduras hidrogenadas, monoglicerídeos e diglicerídeos, parafina, triestearina), proteínas (albumina, caseína, gelatina, glúten), etc (SUAVE et al., 2006). Desses, a quitosana tem sido um dos principais materiais de cobertura utilizados na encapsulação de óleo essencial, como óleo essencial de laranja (GONSALVES et al., 2009), de citronela (HSIEH; CHANG; GAO, 2006), entre outros. É obtida, geralmente, a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino e sua estrutura é formada por unidades de  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-D-glucose e  $\beta$ -(1-4)-2-amino-D-glucose (ELSABEE; ABDU, 2013).

Apesar das características da quitosana possibilitarem seu uso como material encapsulante, quando utilizada isoladamente pode não apresentar as propriedades desejadas, limitando a sua utilização. A adição de um agente reticulante permite modificar as características do material de parede, como a solubilidade, digestibilidade, propriedades térmicas e mecânicas. O ácido tânico pode ser utilizado para este fim, pois interage com biopolímeros como a quitosana por interações não covalentes, como interações iônicas, hidrofóbicas e de hidrogênio, proporcionando uma estrutura mais rígida (SIONKOWSKA et al., 2015).

Existem diversas metodologias de encapsulação, a escolha vai depender de critérios como as características químicas e físicas do núcleo e do revestimento, tamanho exigido do fragmento, utilidade do produto final, forma de liberação requerida, custos e quantidade de produção. Dentre estas se destacam: atomização, extrusão, leite fluidizado, coacervação, secagem em tambor, liofilização, inclusão molecular e inclusão em lipossomas (AZEREDO, 2005). Destas dar-se-á maior ênfase a coacervação, pois será a técnica utilizada no trabalho.

O termo coacervação é originário do latim, sendo que “co” significa união e “acervus” agregação de partículas (VANDEGAER, 1974).

A coacervação é uma interação baseada na complexação que ocorre da mistura de soluções de substâncias com cargas opostas, formando complexos, que, por repulsão do solvente, precipitam, formando duas fases: uma delas, chamada “rica em polímeros”, contendo o coacervado precipitado, e outra chamada “pobre em polímeros”, na qual permanece o solvente da solução (STRAUSS; GIBSON, 2004). A coacervação pode ser de dois tipos: simples, em que a separação da fase líquida ocorre pela adição de um eletrólito à solução coloidal, ou complexa, que resulta da neutralização mútua de dois coloides carregados com cargas opostas em solução aquosa. A coacervação simples envolve um único polímero e ocorre pela remoção do solvente que envolve as moléculas do coloide, por meio do uso de outro composto que compete com o polímero pela água, como sais ou álcoois. Com a saída do solvente, as moléculas do polieletrólito se aproximam e formam aglomerados (VASILIU; POPA; RINAUDO, 2005).

Na literatura, há poucos relatos disponíveis em relação à encapsulação do óleo essencial de melaleuca, e nenhum com o óleo desodorizado.

Pérez-Limiñana et al. (2014) avaliaram a encapsulação de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* utilizando carboximetilcelulose e gelatina por coacervação complexa. Os resultados demonstraram que as propriedades das micropartículas foram fortemente dependentes da concentração dos polímeros utilizadas.

A encapsulação de óleo de melaleuca com alginato de sódio e sal de amônio quaternário de quitosana por coacervação complexa foi avaliada por Chen et al. (2016). As micropartículas apresentaram forma esférica, estabilidade térmica e prolongaram o efeito antimicrobiano.

Comin et al. (2016) demonstraram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* encapsulado em lipídeos nanoestruturados por alta pressão de homogeneização, é capaz de reduzir a formação de biofilmes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3 Projeto de pesquisa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS - UFPEL  
PPGNA – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS**



**Extração, caracterização e microencapsulação do óleo essencial de sementes e folhas de jambolão (*Syzygium cumini*)**

Carla Daiane Lubke Ucker

Pelotas, novembro de 2015.

CARLA DAIANE LUBKE UCKER

**Extração, caracterização e microencapsulação do óleo essencial de sementes e folhas de jambolão (*Syzygium cumini*)**

Projeto de Qualificação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas.

Orientador – Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Co-orientadoras – Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caroline Dellinghausen Borges  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francine Novack Victoria

Carla Daiane Lubke Ucker

Pelotas, novembro de 2015.

Banca Examinadora:  
Dr.<sup>a</sup> Marina Couto Pereira (Membro efetivo)  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla R. B. Mendonça (Membro suplente)

### Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição nutricional em 100g de jambolão .....	10
Tabela 2. Composição centesimal da polpa e semente de jambolão .....	11
Tabela 3. Composição fitoquímica de acordo com a parte da planta .....	12
Tabela 4. Compostos presentes em frutos e sementes de jambolão .....	12
Tabela 5. Concentração de óleos essenciais em algumas especiarias e atividade antimicrobiana dos compostos ativos .....	17
Tabela 6. Delineamento experimental para extração de óleo essencial de jambolão ( <i>Syzygium cumini</i> ) .....	32
Tabela 7. Delineamento experimental para avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais de jambolão ( <i>Syzygium cumini</i> ) .....	32
Tabela 8. Delineamento experimental para caracterização dos compostos presentes nos óleos essenciais das amostras .....	33
Tabela 9. Delineamento experimental para análise do potencial antioxidante dos compostos presentes nos óleos .....	33
Tabela 10. Delineamento experimental para análise dos microencapsulados .....	34

**Lista de Figuras**

Figura 1: Cronograma das atividades.....	42
Figura 2: Orçamento.....	44

## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	44
<b>2 Revisão Bibliográfica</b> .....	46
<b>2.1 Jambolão (<i>Syzygium cumini</i>)</b> .....	19
<b>2.2 Atividade Antioxidante</b> .....	24
2.2.1 <i>Métodos de Avaliação da Atividade Antioxidante</i> .....	51
<b>2.3 Atividade Antimicrobiana</b> .....	25
2.3.1 <i>Métodos de Avaliação do Potencial Antimicrobiano</i> .....	28
<b>2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Salmonella Typhymurium</i>, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	30
2.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	30
2.4.2 <i>Salmonella Typhymurium</i> .....	31
2.4.3. <i>Escherichia coli</i> .....	32
2.4.4 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
<b>2.5 Microencapsulação</b> .....	35
<b>3 Hipóteses</b> .....	18
<b>4 Objetivos e Metas</b> .....	65
<b>4.1 Objetivo Geral</b> .....	65
<b>4.2 Objetivos Específicos</b> .....	65
<b>4.3 Metas</b> .....	65
<b>5 Material e Métodos</b> .....	67
<b>5.1 Material</b> .....	67
5.1.1 <i>Óleo Essencial</i> .....	67
5.1.2 <i>Microrganismos</i> .....	68
5.1.3 <i>Microencapsulação</i> .....	68
<b>5.2 Métodos</b> .....	69
5.2.1 <i>Delineamento Experimental</i> .....	69
5.2.2. <i>Extração do Óleo essencial</i> .....	71
5.2.3 <i>Microencapsulação</i> .....	72
5.2.4 <i>Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais de jambolão (<i>Syzygium cumini</i>) e das microcápsulas</i> .....	73
5.2.5 <i>Caracterização dos compostos presentes nos óleos essenciais de jambolão (<i>Syzygium cumini</i>)</i> .....	74
5.2.6 <i>Análise do potencial antioxidante dos compostos presentes nos óleos essenciais de jambolão (<i>Syzygium cumini</i>)</i> .....	75
5.2.7 <i>Avaliação estatística dos resultados</i> .....	78
<b>6 Resultados e Impactos Esperados</b> .....	79
<b>7 Cronograma de Atividades</b> .....	80

**8 Orçamento .....81**  
**Referências .....83**

## 1 Introdução

Os conservantes químicos têm sido alvo de inúmeros estudos em função da possibilidade de apresentarem toxicidade ou potencial carcinogênico e/ou teratogênico, passando a ser uma questão considerada no momento da compra e do consumo dos alimentos. Constantes pressões são exercidas sobre as indústrias, para que desenvolvam alternativas naturais à preservação dos produtos alimentícios, bem como a remoção dos conservantes químicos utilizados. Uma das alternativas que merece destaque são os Sistemas Antimicrobianos Naturais (SAN), como os observados em extratos e óleos vegetais, resultantes de recursos renováveis (TASSOU et al., 1995; CARVALHO et al., 2006).

Antimicrobianos são substâncias que podem inibir a presença de microrganismos ou eliminá-los do meio em que se encontram, podem ter origem sintética ou natural. Devido ao aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos sintéticos, os estudos voltados à obtenção de antimicrobianos naturais têm aumentado em nível mundial, sendo que muitas frutas apresentam potencial antimicrobiano.

Nos óleos e extratos vegetais também podem estar presentes antioxidantes que consistem de substâncias capazes de inibir a oxidação através de diferentes mecanismos, retardando o início da oxidação ao desativar o oxigênio singlete ou eliminar/estabilizar radicais livres (OETTERER; REGITANO-d'ARCE; SPOTO, 2006).

Dentro desse contexto, o jambolão, também conhecido no Brasil como ameixa-roxa, azeitona-do-nordeste, guapê, jalão, jambuí e jamelão (BRASIL, 2015), pertence a família *Myrtaceae* e é originário da Índia (MORTON, 1987). Possui diversos aproveitamentos, além de seus frutos poderem ser consumidos, a madeira da árvore utilizada comercialmente, o óleo essencial proveniente das sementes e das folhas pode ser obtido e utilizado por apresentarem efeitos, tais como, antioxidantes, hipoglicemiantes, antialérgicos, anti-inflamatórios, antivirais e antibacterianos (CARVALHO, 2013).

Entretanto, a forma de utilização e estabilização das substâncias ativas que propiciam atividade antimicrobiana e/ou antioxidante influencia na eficácia de atuação destas sobre os microrganismos e/ou radicais livres,

respectivamente. Nesse sentido, a microencapsulação pode potencializar o efeito antimicrobiano e também as propriedades antioxidantes, além de proteger os compostos ativos de condições adversas de calor, luz e oxigênio, e promover uma liberação controlada do composto ativo em locais específicos. Dentre suas várias aplicações encontra-se a conservação de óleos essenciais.

Os óleos essenciais podem ser obtidos de folhas, flores e frutos, podendo ter várias aplicações em medicamentos e alimentos (SILVA-SANTOS, 2006). São compostos naturais, complexos e voláteis, sendo sua principal característica o odor intenso que possuem. A principal forma de obter óleo essencial é através do processo de hidrodestilação (BAKKALI et al., 2006). Alguns óleos podem apresentar efeito antimicrobiano, como Reddy e Jose (2013) observaram em óleo essencial de jambolão frente à bactérias Gram positivas e negativas, podendo este ser comparado à antimicrobianos artificiais tradicionalmente utilizados.

O presente estudo tem como objetivo extrair, caracterizar e encapsular o óleo das sementes e folhas de jambolão, visando sua aplicação como antimicrobiano e antioxidante de alimentos.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Jambolão (*Syzygium cumini*)

Jambolão é um fruto carnoso tipo baga, em formato oval, alcançando de 3 a 4 centímetros de comprimento e 2 centímetros de diâmetro. É oriundo de uma árvore que pode chegar até 10 metros de altura com uma copa que alcança de 3 a 4,5 metros de largura, possuindo uma folhagem farta, ramos cor acinzentada-claro e caule reto tipo lenhoso (MIGLIATO, et al, 2006).

O período de frutificação é de janeiro a maio, sendo o fruto inicialmente de coloração branca, mudando para vermelha até que finalmente, quando maduro, se torna preta. Possui apenas uma semente envolvida pela polpa carnosa conhecida pelo sabor adstringente. Com relação a composição nutricional, o fruto se destaca com índices mais elevados de fósforo e vitamina C, dentre os minerais e vitaminas, respectivamente (BRASIL, 2015). A composição do fruto pode ser observada na Tabela 1, obtida da Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO).

Tabela 1. Composição nutricional em 100 g de jambolão

Energia (Kcal)	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibra (g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)	Vit. C (mg)	Vit. B1 (mg)
41	0,5	0,1	10,6	1,8	3	4	27,1	0,17

Fonte: UNICAMP, 2011

Pode-se observar que a fruta possui maiores teores de carboidratos e fibras, sendo que, se comparado com frutas comumente consumidas, possui teor de carboidrato próximo ao abacaxi (12,3 g/100 g da fruta) e de fibras próximo a banana nanica (1,9 g/100 g da fruta) (UNICAMP, 2011).

Na composição centesimal ocorre uma pequena variação entre a polpa e as sementes, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Composição centesimal da polpa e semente de jambolão

Componentes*	Polpa	Semente
Umidade (g.100g <sup>-1</sup> )	79,50 ± 0,42	54,77 ± 1,55
Matéria Seca (g.100g <sup>-1</sup> )	20,50 ± 0,42	45,23 ± 1,55
Extrato Etéreo (g.100g <sup>-1</sup> )	0,35 ± 0,08	0,39 ± 0,10
Proteínas (g.100g <sup>-1</sup> )	0,97 ± 0,20	3,09 ± 0,15
Cinzas (g.100g <sup>-1</sup> )	0,41 ± 0,02	0,95 ± 0,04
Fração Glicídica (g.100g <sup>-1</sup> )	17,96 ± 0,21	37,50 ± 1,69
Calorias (Kcal)	78,91 ± 1,59	166,15 ± 6,41

\* Teores médios ± desvio padrão, expressos em matéria integral.

Fonte: PEREIRA et al, 2015.

Possui teores de lipídios e calorias baixos, podendo, dessa forma, ser usado em dietas com restrições calóricas. Ainda apresenta pH em torno de 3,69 na polpa e 4,91 na semente, podendo, por isso, ser considerada uma fruta ácida, já que para isso a espécie deve possuir um pH menor que 4,5 (PEREIRA et al, 2015).

Quanto à composição fitoquímica, esta varia de acordo com a parte da planta analisada, como pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição fitoquímica de acordo com a parte da planta

Parte da Planta	Composição Fitoquímica
Folhas	Flavonóides glicosídeos acilados, quercetina, miricetina, miricetina 3-O-4-acetil-L-ramnopiranosídeo, triterpenóides, esterase, carboxilase galloyl e tanino.
Frutas	Rafinose, glicose, frutose, ácido cítrico, ácido gálico, ácido málico, antocianinas, delphinidina-3-gentiobioside, malvidina-3-laminabioside, petunidina-3-gentiobioside, cianidina diglicosídeo, penutidina e malvidina.
Sementes	Ricas em flavonoides.
Flores	Kaempferol, quercetina, miricetina, isoquercetina (quercetina-3-glicosídeo), miricetina-3-L-arabinosídeo, quercetina-3-D-galactosídeo, dihidromiricetina, ácido oleanólico, ácido acetil oleanólico, eugenol-triterpenóide A e eugenol-triterpenóide B.
Casca do caule	Ácido betulínico, friedelina, epi-friedelanol, $\beta$ -sitosterol, eugenina e ésteres de ácidos graxos de epi-friedelanol, $\beta$ -sitosterol, quercetina Kaempferol, miricetina, ácido gálico e elágico, bergeninas, flavonoides e taninos.

Fonte: AYYANAR e SUBASH-BABU, 2012.

Vizzoto e Pereira (2008), ao analisarem os frutos e sementes, observaram os seguintes compostos presentes, conforme a Tabela 4:

Tabela 4. Compostos presentes em frutos e sementes de jambolão

	Semente	Fruto
Fenólicos Totais <sup>1</sup>	1319,1 $\pm$ 174,3 a *	930, 4 $\pm$ 50,6 b *
Carotenóides Totais <sup>2</sup>	5,57 $\pm$ 0,19 a	0,43 $\pm$ 0,02 b

\* Médias de três repetições  $\pm$  desvio padrão. Números seguidos de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0.05%.

<sup>1</sup> Compostos fenólicos totais expresso em mg do equivalente ácido clorogênico/100g amostra fresca; <sup>2</sup> Carotenóides totais expresso em mg equivalente  $\alpha$ -caroteno/100g amostra fresca.

Fonte: Vizzoto e Pereira (2008).

Somente o fruto possui a presença de antocianinas totais, com uma concentração de  $141,8 \pm 50,4$  (expressa em mg equivalente cianidina-3-glicosídeo/100g amostra fresca) (VIZZOTO E PEREIRA, 2008), sendo esse valor superior ao de outras frutas, como o mirtilo por exemplo, que é comumente conhecido por apresentar esses compostos, tendo  $58,95 \pm 13,27$  mg/ 100g de polpa (ROCHA, 2009). Os teores de carotenoides totais e fenólicos totais são superiores aos de butiá ( $5,5 \pm 0,5$  e  $906,54 \pm 56,06$  respectivamente) e araçá vermelho ( $1,28 \pm 0,07$  e  $1036,0 \pm 27,5$  respectivamente), frutas comuns na região sul (VIZZOTO, et al, 2012).

De acordo com Morton (1987) esse fruto possui reconhecidos efeitos na medicina popular, podendo ser utilizado cozido no tratamento de diarreia aguda e seu suco pode ser usado em casos de aumento de baço e para retenção de urina. O suco diluído em água pode ser usado para fazer gargarejo em casos de amigdalite e como loção para micose do couro cabeludo.

O jambolão possui diversas aplicações terapêuticas, como anti-inflamatória, antidiarreica, anticonvulsivante, no tratamento de diabetes, atividade antibiótica, antiemético, bactericida, entre outras dependendo da parte da planta utilizada (MIGLIATO, 2006). Segundo Vizzoto e Pereira (2008), podem ser utilizadas diversas partes da planta, como as cascas do caule, por exemplo, as quais atuam no controle da diabetes. Os frutos possuem ação antioxidante, hipoglicemiante e até mesmo anticarcinogênica, e as folhas controlam a diabetes, possuem ação antiviral, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antibacteriana.

O extrato de sementes acarreta diminuição dos índices de glicose no sangue, como foi percebido por Singh e Gupta (2007) em ratos diabéticos, também Sharma et al (2011) observaram queda na glicemia em jejum, redução da hemoglobina glicosilada e aumento da atividade das enzimas chave da glicólise e redução significativa da atividade das enzimas chave de gliconeogênese.

## **2.2 Atividade Antioxidante**

De acordo com a ANVISA (1965), antioxidantes são substâncias com a capacidade de retardar o surgimento de alterações oxidativas em alimentos. O

interesse por tais substâncias tem aumentado nos últimos anos devido às implicações dos radicais livres sobre o organismo humano. Apesar de esses radicais serem produzidos a partir da oxidação, que é um processo normal durante a respiração, também podem ser prejudiciais quando originados de uma disfunção biológica, sendo produzidos em excesso (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Espécies reativas de oxigênio podem originar uma reação de peroxidação lipídica em membranas celulares, além de serem danosas ao DNA e causar oxidação de proteínas, essas reações podem acelerar o envelhecimento e causar doenças degenerativas como câncer, catarata, entre outras (SOUSA et al., 2007). Em alimentos podem causar alterações no sabor, aroma e coloração.

Os antioxidantes possuem dois mecanismos de ação, sendo classificados como primários e secundários, os primários interrompem a cadeia da reação ao doarem elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, dessa forma transforma-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagem com radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode exercer reação com outro radical livre. Já os secundários, retardam o início da autooxidação através de mecanismos variados, como sequestro de oxigênio, complexação de metais, absorção de radiação ultravioleta, decomposição de hidroperóxidos ou desativação de oxigênio singlete (ANGELO e JORGE, 2007).

Muitas frutas podem apresentar atividade antioxidante, como é o caso do jambolão, que apresentou em análise de DPPH um valor de  $EC_{50}$  (redução de 50% da concentração inicial de DPPH) de 94,98% para o extrato de sementes (LUZIA e JORGE, 2009), em análise de ABTS usando extrato da fruta obteve-se valores que variaram de  $4,8 \pm 0,6$  TEAC (capacidade antioxidante equivalente Trolox) a  $11,0 \pm 0,6$  TEAC de acordo com pH de 1,0 a 9,0 respectivamente (FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011) e das folhas foram relatados atividade antioxidante de extratos aquoso e hidroalcoólico na análise de DPPH, com valores de  $EC_{50}$  de  $83,23 \pm 7,85$  e  $119,13 \pm 21,54$  respectivamente (SOARES, 2013).

### 2.2.1 Métodos de Avaliação da Atividade Antioxidante

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante de frutas, entre estes DPPH, ABTS e Peroxidação lipídica do ácido linoleico. O método DPPH baseia-se na captura do radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) por antioxidantes resultando em uma absorbância de 515 nm, sendo que sua obtenção pode ocorrer de forma direta quando o reagente é diluído em meio orgânico (RUFINO, et al, 2007).

O DPPH é um radical livre estável que apresenta um elétron desemparelhado que se desloca por toda a molécula (SHARMA e BHAT, 2009), o fato de se deslocar atribui à molécula a cor violeta (ALVES, et al, 2010). O ensaio fundamenta-se em medir a capacidade antioxidante da substância analisada em sequestrar o radical DPPH, ocorrendo a redução a hidrazina. Caso uma substância atue como doador de átomos de hidrogênio, a obtenção da hidrazina se dá com a alteração simultânea da cor violeta para amarelo pálido (ALVES, et al, 2010).

O método ABTS se baseia na captura do radical ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), o qual pode ser originado por reações eletroquímicas, enzimáticas ou químicas. Através desse método pode ser medida a atividade antioxidante de substâncias de natureza lipofílica e hidrofílica (RUFINO, et al, 2007). Geralmente o radical ABTS é gerado através de reação química com perssulfato de potássio, dessa forma ocorre a formação de uma coloração esverdeada. Quando ocorre a mistura da substância antioxidante com o radical, o radical  $ABTS^+$  é reduzido a ABTS, e assim acontece a perda da coloração. Esse é um método simples, que pode ser utilizado em análises de rotina em laboratórios, apresenta uma boa solubilidade e diversos máximos de absorção (TIVERON, 2010).

O método de peroxidação lipídica do ácido linoleico se baseia na inibição da peroxidação lipídica do ácido linoleico através do teste de TBARS (formação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico) (CHOI et al, 2002). Ocorre uma reação entre as substâncias formadas a partir da peroxidação de lipídeos com o ácido tiobarbitúrico, originando um composto que apresenta absorbância a 532 nm (ABRAHÃO et al, 2012).

### 2.3 Atividade Antimicrobiana

Antimicrobianos são substâncias que podem eliminar ou impedir o desenvolvimento de microrganismos. Sua origem pode ser bacteriana ou fúngica, ser sintético ou natural. Esses compostos são amplamente usados em terapias, porém o uso inadequado e exagerado, tanto em pessoas como em animais, pode resultar em alta resistência dos microrganismos a estas substâncias, as quais devem ser utilizadas de forma racional e conhecendo o tipo e a finalidade a que se destina (RAMOS et al., 2007), e o mesmo ocorre quando são utilizados na indústria de alimentos para conservação de produtos alimentícios.

Os antimicrobianos podem ser classificados de acordo com os microrganismos suscetíveis como antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários; de acordo com a origem como antibióticos (quando produzidos por microrganismos) e quimioterápicos (quando sintetizados em laboratório); de acordo com o efeito que causam sobre o microrganismo como bactericida (quando eliminam os microrganismos) e como bacteriostático (quando impedem o desenvolvimento dos microrganismos). Podem agir de diferentes formas, atuando sobre processos metabólicos como replicação cromossômica, inibição da síntese proteica e inibição metabólica; e sobre estruturas dos microrganismos como na parede celular e na membrana citoplasmática (BARROS; MACHADO; SPRINZ, 2013).

Quando um microrganismo tem a capacidade de se multiplicar em presença de um antimicrobiano, considera-se que este é resistente a essa substância, já quando o microrganismo não consegue se desenvolver, porém não é eliminado mesmo em altas concentrações, pode-se dizer que este possui tolerância ao antimicrobiano (MACHADO; BARROS, 2006).

Devido ao aumento da resistência microbiana aos antimicrobianos e ao fato de alguns conservantes químicos apresentarem toxicidade ou potencial carcinogênico e/ou teratogênico, tem aumentado o interesse em meios de conservar os alimentos de maneira mais natural, porém, atualmente, poucos antimicrobianos naturais são permitidos pela legislação como os ácidos orgânicos fracos,  $H_2O_2$  e determinados quelantes, além de compostos antimicrobianos que podem ser encontrados em especiarias como os óleos essenciais. Em relação a estes, Forsythe (2010) descreve algumas especiarias

que possuem óleos essenciais com atividade antimicrobiana conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração de óleos essenciais em algumas especiarias e atividade antimicrobiana dos compostos ativos

Especiarias	Óleo essencial na especiaria (%)	Compostos antimicrobianos em destilado ou extrato	Concentração do agente antimicrobiano (ppm)	Organismos
Pimenta-da-Jamaica ( <i>Pimenta dioica</i> )	3,0-5,0	Eugenol, Metil eugenol	1000 150	Levedura, <i>Acetobacter</i> , <i>Clostridium botulinum</i> 67 B.
Cássia ou canela chinesa ( <i>Cinnamomum cassis</i> )	1,2	Aldeído cinâmico, Acetato cinamil	10-100	Levedura, <i>Acetobacter</i> .
Cravo ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	16,0-19,0	Eugenol, Acetato de eugenol	1000 150	Levedura, <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
Canela em casca ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	0,5-1,0	Aldeído cinâmico, Eugenol	10-1000 100	Levedura, <i>Acetobacter</i> , <i>Clostridium botulinum</i> 67 B, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium botulinum</i> 67 B,
Alho ( <i>Allium sativum</i> )	0,3-0,5	Alilsulfonil, Alilsulfito	10-100	<i>Listeria monocytogenes</i> , Levedura, Bactéria.
Mostarda ( <i>Sinapis nigra</i> )	0,5-1,0	Alilisotiocianato	22-100	Levedura, <i>Acetobacter</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> .
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	0,2-0,8	Timol, Carvacrol	100 100-120	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> A, B, E. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ,
Tomilho ( <i>Thymus vulgaris</i> )	2,8	Timol, Carvacrol	100 100	<i>Clostridium botulinum</i> 67 B, Bactéria Gram-positiva, <i>Aspergillus parasiticus</i> ,

---

Fonte: Forsythe, 2010.

A maioria dos óleos essenciais tem caráter hidrofóbico e por isso atuam no rompimento da membrana celular, fazendo com que ocorra a perda de funcionalidade, porém para que ocorra a eliminação dos microrganismos no alimento é necessária alta quantidade de antimicrobiano, tornando sensorialmente intolerável, por isso geralmente são usadas concentrações que se restringem a inibir a multiplicação dos microrganismos (FORSYTHE, 2010).

Os óleos essenciais podem apresentar diferentes efeitos antimicrobianos. Santurio et al, (2007) ao comparar os óleos de tomilho, orégano e canela frente à 20 sorovares de *Salmonella entérica* observaram que os isolados do sorovar Derby são menos suscetíveis ao óleo de orégano, porém o inverso ocorre quando usado tomilho ou canela. Já o isolado do sorovar *Mbandaka* é claramente sensível ao óleo de tomilho, mas mais resistente ao orégano ou canela, isso demonstra que existe certa especificidade em relação a ação dos óleos sobre os microrganismos.

O óleo essencial de eucalipto é capaz de inibir o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6.538, *Escherichia coli* ATCC 8.739, *Salmonella epidermidis* ATCC 12.228, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9.027 e *Candida albicans* ATCC 10.23, mostrando que os óleos essenciais podem ser utilizados não apenas contra bactérias, mas também contra fungos (FRANCO, et al, 2005). Além disso, podem apresentar atividade acaricida como a apresentada pelo óleo essencial de embiriba, planta típica do nordeste (PONTES, et al, 2007).

### 2.3.1 Métodos de Avaliação do Potencial Antimicrobiano

É possível medir a resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) (MACHADO e BARROS, 2006).

Concentração inibitória mínima é a menor quantidade de antimicrobiano com capacidade de inibir o desenvolvimento do microrganismo, sendo que

podem ocorrer variações entre cepas da mesma bactéria. Já a concentração bactericida mínima é a menor quantidade de antimicrobiano com capacidade de eliminar o microrganismo, sua determinação é mais complexa e trabalhosa. Quando a concentração bactericida mínima for 32 vezes ou mais superior a concentração inibitória mínima considera-se que o microrganismo é tolerante ao antimicrobiano (MACHADO e BARROS, 2006).

Existem muitos trabalhos que utilizam esses métodos para avaliar o potencial antimicrobiano de óleo essencial, como Castro et al (2007) que analisaram a atividade antibacteriana de própolis do nordeste e sudeste, para isso usaram os métodos de CIM e CBM atingindo resultados satisfatórios, da mesma forma Aumeeruddy-Elalfia, Gurib-Fakimb e Mahomoodallya (2015) avaliaram a atividade antibacteriana de 9 plantas medicinais utilizando esses métodos.

Existem também outros métodos para verificar se uma substância possui efeito antimicrobiano sobre determinado microrganismo, são eles: ensaios bioautográficos, de diluição e de difusão (SILVEIRA et al.,2009).

Os ensaios bioautográficos utilizam placas de cromatografia de camada fina (CCF) para fazer a análise, os constituintes separados entram em contato com placas de Agar antecipadamente inoculadas com o microrganismo que está sendo testado, se houver formação de zonas de inibição de crescimento microbiano significa que existem componentes antimicrobianos (SILVEIRA et al.,2009).

O ensaio de diluição consiste em utilizar um meio de cultura líquido onde é inserido o microrganismo testado e posteriormente se adiciona as substâncias a serem analisadas, quando passar o período de incubação o desenvolvimento microbiano é verificado por leitura turbidimétrica por meio de espectrofotômetro em comprimento de onda adequado (SILVEIRA et al.,2009).

O ensaio de difusão se baseia na difusão da substância a ser analisada em meio sólido contendo o microrganismo. Após a difusão há o surgimento de um halo em que não ocorre o desenvolvimento microbiano, sendo este chamado de halo de inibição, é um método quantitativo onde o resultado pode ser graduado. Podem ser usados tipos distintos de reservatórios como poços feitos no meio de cultura, discos de papel e cilindros de porcelana ou aço inoxidável, a maneira como a substância entra em contato com o meio de

cultura contendo o microrganismo é que difere o tipo de método de difusão, entre os mais comuns estão o disco de difusão, o método dos cilindros e o de poços (SILVEIRA et al., 2009).

O mais comumente utilizado é o disco de difusão, Victoria, et al (2012) utilizaram esse método para avaliar o potencial antimicrobiano das folhas de pitangueira alcançando resultados positivos, bem como Gavanji et al (2014) que compararam a atividade antimicrobiana de antibióticos artificiais com óleos essenciais através deste método.

## **2.4 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

### **2.4.1 *Listeria monocytogenes***

*Listeria* spp. são bactérias Gram positivas, no formato de bastonetes curtos e cocobacilos com tendência de formação de cadeias com três a cinco células, possuem relação filogenética com as espécies de *Lactobacillus* e, da mesma forma que as bactérias lácticas homofermentativas, não têm capacidade de produzir gás, porém produzem catalase e ácido a partir da glicose (MADIGAN et al., 2010).

São aeróbias facultativas, não formam esporos, possuem 0,5 µm de largura e 1-1,5 µm de comprimento. O gênero *Listeria* é, atualmente, composto por dez espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, e *L. weihenstephanensis* (ZHANG et al., 2007; HALTER, NEUHAUS e SCHERER, 2013), sendo que apenas *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* são patógenos. *Listeria monocytogenes* pode infectar o homem e animais, enquanto a *Listeria ivanovii* é um agente patogênico de animais, estando raramente envolvida em casos que acometem o homem (LIU, 2006).

Por possuírem uma alta resistência frente a alterações de concentração de sal, pH e temperatura, podem ser encontradas em diferentes ambientes como em alimentos, água, efluentes e solo. *Listeria monocytogenes* é capaz de permanecer por longo tempo em condições hostis, conseguindo realizar sua multiplicação sob temperaturas de refrigeração (2°C – 4°C), exigindo uma

atenção maior das indústrias, até porque sua presença pode acarretar grave doença e está relacionada a muitos episódios de doenças transmitidas por alimentos, envolvendo tipos distintos como queijo, molhos, produtos cárneos e leite (PERES, 2010).

A doença causada por essa bactéria é chamada listeriose, está relacionada com casos de aborto, septicemia e meningite, atingindo principalmente neonatais, gestantes, idosos e imunodeprimidos, sendo raros os casos envolvendo pessoas saudáveis (FAI, et al., 2011).

Estudos recentes reportam o efeito de diferentes óleos essenciais na inibição do crescimento deste microrganismo, como o caso do óleo essencial das folhas de pitanga (*Eugenia uniflora*) (VICTORIA et al, 2012), e óleos essenciais comerciais de laranja que apresentaram tal efeito frente a *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* (FRIEDLY et al, 2009).

#### 2.4.2 *Salmonella Typhymurium*

*Salmonella* spp são bactérias Gram negativas, móveis, não esporuladas, anaeróbias facultativas e, com exceção da *Salmonella typhi*, não apresentam cápsula (SAMARANAYAKE, 2012). Fazem parte da família Enterobacteriaceae, que abrange as espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo que essa última contém as linhagens patogênicas divididas em seis subespécies e 2564 sorovares (SANTURIO, et al., 2007).

Os problemas causados pela bactéria podem ser separados em três grupos, são eles: febre tifoide, febre entérica e salmonelose.

Febre tifoide é causada por *Salmonella typhi*, atinge somente o homem sem possuir reservatórios nos animais. O modo mais comum de transmissão é através de alimentos e água contaminados com fezes, entre os sintomas envolvidos estão septicemia, vômitos, diarreia e febre alta, sendo que a pessoa contaminada pode se tornar portador assintomático, constituindo em uma fonte da doença. O tempo de incubação pode variar de 7 a 21 dias e os sintomas podem perdurar por até 8 semanas, podendo levar a óbito.

Febre entérica é causada por *Salmonella paratyphi* A, B e C, os sintomas incluem gastroenterite, vômitos e febre, podendo ocorrer septicemia. A bactéria pode ser transmitida através do consumo de água e alimentos como

mariscos, vegetais crus, leite e ovos, o tempo de incubação pode variar de 6 a 48 horas podendo durar até três semanas.

Salmonelose é causada pelos demais tipos de *Salmonella*, é o tipo de infecção causada por *Salmonella* mais comum, leva a uma infecção gastrointestinal sendo que os principais sintomas são vômitos, dores abdominais e febre baixa, raramente ocorrem óbitos. O tempo de incubação é de 12 a 36 horas, podendo perdurar por até 72 horas. Pode ser transmitida por alimentos contaminados como carne e ovos crus (SHINOHARA et al., 2008).

A salmonelose possui importância relevante, influenciando no comércio internacional, sendo uma preocupação para as autoridades sanitárias. Por sua vasta disseminação entre animais, podendo resistir por grande tempo no meio ambiente, tem um papel de destaque em saúde pública (SANTURIO et al., 2007).

*Salmonella* Typhimurium está comumente envolvida em casos de salmonelose infantil, possuindo resistência a grande parte dos antimicrobianos normalmente utilizados para terapia (SHINOHARA et al., 2008). O aumento da resistência deste microrganismo impulsionou estudos com antimicrobianos naturais como o trabalho de Basti, Misaghi e Khaschabib (2007) que avaliaram o efeito antimicrobiano de uma planta típica do Iran conhecida como Avishan Shirazi (*Zataria multiflora* Boiss.), atingindo resultados satisfatórios frente a *Salmonella* Typhimurium, e Yun et al (2015) que testaram um revestimento com óleo essencial de canela e mostarda em tomate cereja em substituição a revestimentos artificiais alcançando a inativação da bactéria.

#### 2.4.3. *Escherichia coli*

São bactérias Gram negativas, pertencem à família Enterobacteriaceae, sendo encontradas na microbiota entérica de animais. Comumente pode-se isolar em alimentos como leite e produtos refrigerados (CAMPOS et al., 2006).

Algumas linhagens de *Escherichia coli* são patogênicas, essas são separadas em seis grupos: enteroinvasoras, enterohemorrágicas, enteroagregativas, enteropatogênicas, enterotoxigênicas e de aderência difusa, subdivididas por sua habilidade de invasão celular, produzir toxinas ou modo

de apresentação dos sinais clínicos nos animais e/ou no homem (RIBEIRO et al, 2006).

*Escherichia coli* êntero-hemorrágica (EHEC) produz uma toxina chamada Verotoxina, a qual é semelhante à Shiga toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*. Após ser ingerido um alimento contaminado com esta bactéria, mais precisamente a linhagem O157:H7, se aloja no intestino delgado e a Verotoxina é originada, acarretando desde diarreia sanguinolenta até insuficiência renal. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é responsável pela chamada diarreia dos viajantes, que é uma infecção entérica que leva a diarreia aquosa, comumente ocorre em pessoas que estão viajando, já que os habitantes locais já estão imunes à bactéria. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) não é invasiva nem produz toxinas, está envolvida com casos de diarreia infantil e em bebês. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) causa doença invasiva do cólon, sendo responsável por diarreia aquosa, que por vezes pode ser sanguinolenta (MADIGAN et al., 2010).

*Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) causa uma diarreia aguda e persistente que ocorre, principalmente, em crianças de países em desenvolvimento (REGUA-MANGIA et al, 2009). A *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) possui a característica de se aderir de forma difusa em cultura de células epiteliais “*in vitro*”, pode causar infecções no trato urinário e a patogenicidade entérica ainda não é confirmada (BARBOSA, 2010).

Para poder inibir a presença desta bactéria pode-se aplicar óleo essencial de diferentes plantas, como o obtido das folhas de eucalipto, que mostrou ser um bom agente antibacteriano (BACHIR e BENALI, 2012), assim como o óleo essencial de uma planta conhecida popularmente como vassoura (*Baccharis dracunculifolia* D.C.) apresentou inibição ao desenvolvimento do microrganismo (Ferronato et al, 2007).

#### 2.4.4 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus* spp são bactérias Gram positivas, em formato de cocos, catalase positiva, podendo medir 0,5-1,5 µm de diâmetro, não são móveis nem formam esporos, normalmente não possuem cápsula. Possuem diversas formas, podendo estar sozinha, em pares, em cadeias curtas ou reunidas em

formato de cacho de uva, isso se deve a divisão celular que é feita em três planos perpendiculares. Faz parte da família *Micrococcae*, bem como os gêneros *Stomatococcus*, *Micrococcus* e *Planococcus* (SANTOS et al., 2007).

Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por 49 espécies e 26 subespécies (EUZÉBY, 2015), podendo se isolar 17 delas de amostras biológicas humanas, sendo o *S. aureus* a espécie de maior interesse, a qual está comumente envolvida com variadas infecções em seres humanos e em casos intoxicação alimentar (SANTOS et al., 2007).

Os *Staphylococcus* estão presentes naturalmente na pele e no trato respiratório superior das pessoas, consistindo em um microrganismo oportunista. A facilidade de desenvolvimento do *Staphylococcus aureus* em alimentos bem como sua capacidade de produzir toxinas termorresistentes (enterotoxinas), faz com que frequentemente esteja envolvido com casos de intoxicação alimentar, causando náuseas, diarreia e vômitos dentro de uma a seis horas (MADIGAN et al., 2010).

Existem outras doenças causadas pelo *Staphylococcus aureus* podendo ocorrer devido a invasão de tecidos ou pelas toxinas, são elas: sico (bicho-de-pé), carbúnculo, foliculite (infecção do folículo piloso), furúnculos situados na região cervical posterior, antraz, hidradenite (inflamação das glândulas sudoríparas), impetigo e hordéolo (terçol) (SANTOS et al., 2007).

Métodos alternativos vêm sendo pesquisados para inibir a presença deste microrganismo, Packer e Luz (2007) avaliaram o potencial antimicrobiano de 6 óleos essenciais: de copaíba, alecrim, melaleuca, alho, andiroba e própolis frente *Staphylococcus aureus*, obtendo resultados satisfatórios, sendo que o de alecrim e o de melaleuca apresentaram os mais expressivos. Da mesma forma Martucci et al (2015) analisaram o potencial antimicrobiano de orégano e lavanda para inibir este microrganismo concluindo que esses óleos exibem boas propriedades antimicrobianas, inibindo o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*.

## 2.5 Microencapsulação

A encapsulação é uma técnica em que substâncias, como conservantes, nutrientes, entre outras, são acondicionadas em cápsulas que, se aprovadas

para o consumo, podem ser consumidas. Pode ser definida como um processo em que ocorre a retenção de uma substância (agente ativo) dentro de outra substância (material de parede). A substância encapsulada pode também ser chamada de recheio ou núcleo e a que forma a cápsula de cobertura, parede ou encapsulante (NEDOVIC et al, 2011).

De acordo com o tamanho, as cápsulas são separadas em três grupos: macro, que são maiores que 5000  $\mu\text{m}$ ; micro, que possuem tamanho entre 0,2-5000  $\mu\text{m}$ ; e nano, que são menores que 0,2  $\mu\text{m}$  (REBELLO, 2009).

Em relação à disposição do núcleo e cobertura, são classificadas de duas maneiras: as que o núcleo está claramente fixado no centro da cápsula, sendo circulado por um filme determinado e contínuo do material de cobertura; e as que o núcleo é disperso de forma uniforme em uma matriz. Pode-se dizer que o primeiro funciona como um sistema tipo reservatório, caracterizando as “verdadeiras microcápsulas”, já o segundo funciona como um sistema matricial, o que caracteriza as microsferas. A diferença básica entre as microsferas e as microcápsulas é que na primeira uma pequena parte da substância encapsulada fica exposta na superfície, o que não ocorre nas microcápsulas, estas podem ter mais de um núcleo ou diversas coberturas para um mesmo núcleo (AZEREDO, 2005).

A microencapsulação pode ser utilizada na indústria de alimentos devido aos seguintes fatores: diminui interações da substância que forma o núcleo com o ambiente; reduz a velocidade de evaporar ou de transferir compostos do núcleo para o ambiente; aumenta a facilidade de manipular a substância encapsulada; permite que se possa ter controle da liberação; reduz odores e sabores estranhos; e possibilita que o composto encapsulado se disperse de forma homogênea em um produto alimentício (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Diversas substâncias podem ser utilizadas como coberturas, como exemplo as gomas (carragena, goma arábica, alginato de sódio), carboidratos (açúcar, amido, celuloses, dextrinas, xarope de milho), quitosana (fonte alternativa obtida da casca de crustáceos), lipídeos (ácido esteárico, cera, óleos e gorduras hidrogenadas, monoglicerídeos e diglicerídeos, parafina, triestearina), proteínas (albumina, caseína, gelatina, glúten), etc (SUAVE et al, 2006). Destes, a quitosana tem sido um dos principais materiais de cobertura

utilizados na encapsulação de óleo essencial, como óleo essencial de laranja (GONSALVES et al, 2009), de citronela (HSIEH; CHANG; GAO, 2006), entre outros.

Os compostos mais utilizados como núcleo são vitaminas, minerais, aromas e, mais recentemente, microrganismos probióticos, peptídeos bioativos e uma variedade de classes de bioativos (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Existem diversas metodologias de encapsulação, a escolha vai depender de critérios como as características químicas e físicas do núcleo e do revestimento, tamanho exigido do fragmento, utilidade do produto final, forma de liberação requerida, custos e quantidade de produção. Dentre estas se destacam: atomização, extrusão, leite fluidizado, coacervação, secagem em tambor, liofilização, inclusão molecular e inclusão em lipossomas (AZEREDO, 2005). Destas dar-se-á maior ênfase a coacervação, pois será a técnica utilizada no trabalho.

O termo coacervação é originário do latim, sendo que “co” significa união e “acervus” agregação de partículas (VANDEGAER, 1974).

A coacervação é uma interação baseada na complexação que ocorre da mistura de soluções de substâncias com cargas opostas, formando complexos, que, por repulsão do solvente, precipitam, formando duas fases: uma delas, chamada “rica em polímeros”, contendo o coacervado precipitado, e outra chamada “pobre em polímeros”, na qual permanece o solvente da solução (STRAUSS; GIBSON, 2004). A coacervação pode ser de dois tipos: simples, em que a separação da fase líquida ocorre pela adição de um eletrólito à solução coloidal, ou complexa, que resulta da neutralização mútua de dois coloides carregados com cargas opostas em solução aquosa. A coacervação simples envolve um único polímero e ocorre pela remoção do solvente que envolve as moléculas do coloide, por meio do uso de outro composto que compete com o polímero pela água, como sais ou álcoois. Com a saída do solvente, as moléculas do polieletrólito se aproximam e formam aglomerados (VASILIU; POPA; RINAUDO, 2005).

Peng et al. (2014) microencapsularam óleo essencial de sementes de mostarda utilizando o método de coacervação e revestimento de goma arábica, concluindo que as microcápsulas apresentam estabilidade química frente a

diferentes temperaturas e pHs, podendo ser utilizadas em embalagens e como forma de aplicação de substâncias antimicrobianas. Dima et al. (2014) microencapsularam óleo essencial de pimenta utilizando a técnica de coacervação e revestimento de quitosana, concluindo que essa é uma boa alternativa para uso deste óleo em produtos alimentícios, principalmente em carnes.

### 3 Hipóteses

O óleo essencial das folhas e sementes de jambolão (*Syzygium cumini*) possui potencial antioxidante e efeito antimicrobiano frente à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

É possível microencapsular o óleo de jambolão utilizando quitosana pela técnica de coacervação simples.

A microencapsulação do óleo de jambolão propicia proteção dos compostos bioativos contra a degradação e com isto preserva suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes durante o armazenamento e processamento, bem como sua liberação controlada.

## 4 Objetivos e Metas

### 4.1 Objetivo Geral

Extrair, caracterizar e encapsular o óleo das sementes e folhas de jambolão (*Syzygium cumini*), visando sua aplicação como antioxidante e antimicrobiano de alimentos.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Extrair os óleos essenciais das folhas e da semente de jambolão;
- Determinar o rendimento dos óleos essenciais extraídos de folhas e sementes de jambolão (*Syzygium cumini*);
- Determinar a composição química dos óleos essenciais de folhas e sementes de jambolão (*Syzygium cumini*);
- Avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante do óleo essencial de folhas e sementes de jambolão;
- Microencapsular o óleo essencial de jambolão utilizando quitosana pela técnica de coacervação simples;
- Caracterizar as microcápsulas quanto à morfologia, tamanho, eficiência de encapsulação, comportamento térmico, atividade antimicrobiana e antioxidante, liberação e estabilidade durante a estocagem.

### 4.3 Metas

- Extrair dos óleos essenciais das folhas e sementes de jambolão (*Syzygium cumini*);
- Determinar a composição do óleo essencial através de métodos cromatográficos e espectrofotométricos;
- Avaliar o potencial antioxidante;
- Comprovar que o óleo essencial das folhas e sementes de jambolão (*Syzygium cumini*) possui efeito antimicrobiano frente às bactérias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;

- Microencapsular o óleo de jambolão utilizando quitosana como material de parede;
- Proteger os compostos bioativos do óleo de jambolão microencapsulado e com isto preservar a atividade antimicrobiana e antioxidante, bem como propiciar a liberação controlada dos compostos;
- Pelo menos um artigo científico publicado ou aceito para publicação em periódicos com alto impacto técnico científico na área de Nutrição e Alimentos;
  - Pelo menos quatro trabalhos apresentados em eventos científicos de importância na área;
  - Um mestre titulado e dois alunos de iniciação científica treinados;
- Uma dissertação concluída e material para início de uma tese.

## 5 Material e Métodos

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Óleo Essencial

As amostras de jambolão provenientes da coleção de frutíferas da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS (safra 2015), serão coletadas em estágio maduro, sanitizadas com solução clorada 100 ppm e mantidas sob congelamento (-18°C) até o momento da extração do óleo essencial.

Para realizar a extração do óleo essencial, no caso das folhas, é necessário nitrogênio líquido, água destilada, grau, pistilo, manta e aparelho clevenger, já para as sementes, nitrogênio líquido, água destilada, moinho de bolas, manta e aparelho clevenger.

Para a caracterização do óleo serão necessários hexano P.A. e gás hélio, aparelho de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e coluna capilar (VICTORIA et al, 2012).

Para analisar o potencial antioxidante se analisará a captura dos radicais livres sintéticos DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sulfônico)), para o primeiro serão utilizados DPPH, álcool etílico P.A., acetona P.A., água destilada, agitador de tubos de ensaio, balança analítica, balão volumétrico 100 mL e 1000 mL, cronômetro digital, cubetas de vidro (4 x 1 cm), espectrofotômetro, pipeta automática (10-1000 µL), proveta de 50 mL, tubos de ensaio com tampa de rosca (8 mL); e para o segundo, além do que já foi citado, ABTS, persulfato de potássio, trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido-carboxílico) e balão volumétrico de 10 e 50 mL (RUFINO et al, 2007).

Outra análise de atividade antioxidante que será utilizada é a peroxidação lipídica do ácido linoleico, para isso serão necessários ácido linoleico (20 mM), Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (4 mM), ácido ascórbico (2 mM), ácido tricloroacético (5,5%), ácido tiobarbitúrico, NaOH, estufa, centrifuga e espectrofotômetro (CHOI et al, 2002).

### 5.1.2 Microrganismos

Serão utilizadas cepas padrão das espécies *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832), os quais estão mantidos em glicerol (propano-1,2,3-triol) sob congelamento e serão reativadas, para isso será utilizado caldo enriquecido não seletivo BHI (*Brain Heart Infusion*) e caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) com extrato de levedura, Agar TSA (*Tryptone Soy Agar*), NaCl, placas de petry descartáveis, alça de platina e estufa.

Para a análise do potencial antimicrobiano será utilizada a técnica de disco difusão, para isso será necessário swab estéril, placas de petry descartáveis com Agar Muller-Hinton, discos de papel filtro e estufa.

Para analisar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) serão necessários tubos de ensaio, meio BHI Agar, suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, microplacas com 96 poços e estufa.

### 5.1.3 Microencapsulação

Para a microencapsulação serão necessários goma quitosana, solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>, emulsificante Tween 80, ácido acético 5% (v/v), filtro de papel, água destilada, ultraturrax e liofilizador.

Para confirmar a encapsulação serão utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria diferencial de varredura (DSC). Também será determinada a eficiência de encapsulação, a atividade antioxidante e antimicrobiana das microcápsulas, o perfil de liberação e estabilidade dos compostos. Para isso serão necessárias soluções de ácido cítrico 0,1 M e fosfato dissódico, 0,3 % de enzima pepsina, 0,1 % da enzima pancreatina, microscópio de varredura eletrônica, Analisador DSC, lâmpada de 100 W, frascos de vidro, refrigerador, centrifuga e estufa.

## 5.2 Métodos

### 5.2.1 Delineamento Experimental

No primeiro ensaio experimental as variáveis independentes utilizadas serão as amostras de folha e sementes de jambolão (*Syzygium cumini*). A variável dependente (resposta) será a avaliação do rendimento da extração. A relação entre essas variáveis pode ser observada na Tabela 6.

Tabela 6. Delineamento experimental para a extração do óleo essencial de jambolão (*Syzygium cumini*)

Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes	
Amostra	Folhas	Avaliação	Rendimento
	Sementes		

Considerando o primeiro delineamento onde teremos duas amostras e cinco avaliações com três repetições (2x1x3) teremos um total de seis determinações.

No segundo ensaio experimental as variáveis independentes utilizadas serão amostras de óleo essencial obtidas de folhas e sementes de jambolão (*Syzygium cumini*), os microrganismos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como a técnica de microencapsulação. A variável dependente (resposta) será o efeito antimicrobiano avaliado através das técnicas disco difusão, concentração mínima inibitória e concentração bactericida mínima. A relação entre essas variáveis pode ser verificada na Tabela 7.

Tabela 7. Delineamento experimental para avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais de jambolão (*Syzygium cumini*)

Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes	
Amostra	Folha		
	Sementes		Disco difusão
Microrganismos	<i>Listeria monocytogenes</i>	Avaliações	MIC
	<i>Salmonella</i>		MCB
	Typhimurium		
	<i>Staphilococcus aureus</i>		
	<i>Escherichia coli</i>		

Considerando o segundo delineamento onde teremos duas amostras, quatro microrganismos e três avaliações com três repetições (2x4x3x3) teremos um total de 72 determinações.

No terceiro delineamento será feita a caracterização das amostras (óleo essencial da folha e sementes de jambolão) quanto aos compostos presentes, como pode ser observada na Tabela 8.

Tabela 8. Delineamento experimental para caracterização dos compostos presentes nos óleos essenciais das amostras

Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes	
Amostra	Folhas	Caracterização por Cromatografia	Fenóis Totais
	Sementes	Gasosa	
			Fenóis Individuais

Considerando o terceiro delineamento, onde teremos duas amostras, quatro componentes para serem avaliados com três repetições (2x4x3), teremos um total de 24 determinações.

O potencial antioxidante dos óleos será avaliado, como mostrado na Tabela 9.

Tabela 9. Delineamento experimental para análise do potencial antioxidante dos compostos presentes nos óleos

Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes	
Amostra	Folhas		DPPH
	Sementes	Avaliações	ABTS
			Peroxidação Lipídica do ácido linoleico

Considerando o quarto delineamento onde teremos duas amostras, três avaliações com três repetições (2x3x3) teremos um total de 18 determinações.

A microencapsulação será de acordo com o delineamento presente na Tabela 10.

Tabela 10. Delineamento experimental para análise dos microencapsulados

Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes
Microencapsulado 1	Eficiência de encapsulação
Microencapsulado 2	Comportamento térmico
	Avaliações Morfologia
	Atividade antimicrobiana
	Atividade antioxidante
	Perfil de liberação
	Estabilidade
Óleo essencial das sementes não encapsulado (controle)	Comportamento térmico
	Avaliações Atividade antimicrobiana
	Atividade antioxidante
	Estabilidade

Considerando o quinto delineamento, onde temos duas amostras, sete avaliações com três repetições (2x7x3) teremos um total de 42 determinações, somados a amostra não encapsulada com quatro avaliações e três repetições (1x4x3), num total de 12 determinações.

### 5.2.2. Extração do Óleo essencial

Para realizar a extração do óleo essencial primeiramente será feita a maceração, que consiste em colocar a amostra em contato com o nitrogênio

líquido e triturar, para isso será utilizado grau e pistilo, no caso das folhas, e moinho de bolas, no caso das sementes. Após o procedimento será realizada a hidrodestilação do material, utilizando o aparelho clewenger, para isso será adicionado 400 g da amostra em um balão volumétrico de 1000 mL e será acrescentado o dobro de água destilada, ou seja, 800 mL, em seguida, o balão será acoplado em uma manta e será anexado ao clewenger, a manta será ligada e aguardara-se o início da extração, totalizando 3 horas de processo. O óleo obtido ficará retido no aparelho, será utilizada uma pipeta descartável para retirá-lo e transferi-lo para um frasco de vidro âmbar, então será armazenado sob congelamento.

### 5.2.3 *Microencapsulação*

A microencapsulação será realizada através do método de coacervação simples. Para isto, uma solução de quitosana 5 % (p/v) será preparada em 100 mL de solução de ácido acético 5% (v/v), após a dissolução, 1 mL do óleo essencial e emulsificante Tween 80 serão adicionados e homogeneizados, dependendo do tratamento. Em seguida esta solução será gotejada, com o auxílio de uma pipeta descartável, em uma solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>, após as partículas formadas serão mantidas em NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup> por 30 minutos sob agitação para completa precipitação, posteriormente serão lavadas com água destilada até atingir pH 7,0 e secas através de liofilização (PARIZE, 2003).

Serão realizadas as seguintes avaliações nos encapsulados:

- Eficiência de encapsulação: a eficiência da encapsulação será determinada através da diferença entre o conteúdo de compostos fenólicos encontrado na superfície das microcápsulas e os compostos encapsulados, como descrito por Zheng et al. (2011).
- Morfologia das partículas: a morfologia e o tamanho das microcápsulas serão avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura (PARIZE, 2003).
- Comportamento térmico: será determinado por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), conforme metodologia utilizada por Wu et al. (2008).

- Perfil de liberação dos compostos encapsulados: será avaliada a liberação dos compostos fenólicos totais em estudo *in vitro* simulando os fluídos gástrico e intestinal (RUTZ, 2013).
- Estabilidade: a estabilidade ao armazenamento das microcápsulas será realizado em temperatura refrigerada de 4 e 25 °C e na presença ou ausência de luz e analisada em tempos de 0, 30, 60 e 90 dias através da determinação dos compostos fenólicos totais (RUTZ, 2013).

#### 5.2.4 Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais de jambolão (*Syzygium cumini*) e das microcápsulas

A avaliação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de jambolão (*Syzygium cumini*) será realizada pelo método de disco difusão de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (CLSI 2005), e pela determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações.

Para realizar a reativação dos microrganismos, as culturas congeladas mantidas em glicerol serão transferidas, com o auxílio da alça de platina, para o caldo BHI, no caso da *Listeria monocytogenes* será utilizado o caldo TSB com extrato de levedura, e então serão incubados em estufa durante 24 horas a 37 °C. Em seguida, uma alçada do isolado será transferida e estriada em placas contendo Agar Triptona de Soja (TSA) e incubadas por 24 horas a 37 °C, para que ocorra o isolamento das colônias. Das colônias que se desenvolverem no Agar serão extraídas uma alçada e ressuspensa em solução salina (NaCl 0,85%), a qual será padronizada em concentração 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) usando comparação visual e diluição da solução salina inoculada.

Serão usados três tipos de amostras: óleo essencial sem microencapsulação, microencapsulação 1 (sem emulsificante) e microencapsulação 2 (com emulsificante); como branco será utilizada água destilada.

Na técnica do disco difusão, a solução salina que foi inoculada será em seguida semeada através de espalhamento utilizando swab estéril na superfície de placas contendo Agar Muller-Hinton. Depois de seco, serão adicionados discos de papel filtro contendo concentrações equivalentes a 10 µL de óleo essencial sobre o Agar, posteriormente as placas serão incubadas por 24 horas a 35 °C e ocorrerá a medição dos halos de inibição.

Na técnica de CIM (Concentração Inibitória Mínima), serão utilizadas microplacas de 96 poços, nestes serão acrescentados 100 µL de caldo BHI previamente inoculado, após serão adicionados 100 µL de óleo essencial em concentrações variando de 0,1-12 mg/mL (diluição seriada de razão 2). Será utilizada água destilada como controle e após procede-se a incubação por 24 horas a 37 °C. Em seguida da incubação, serão adicionados 30 µL de corante Resazurina (0,01%; m/v) para auxiliar na visualização dos poços com crescimento bacteriano. Transcorrido 3 horas de incubação, os poços em que não foi alterada a coloração serão considerados com ausência de bactérias viáveis, caso contrário irá se considerar com presença.

Na técnica de Concentração Bactericida Mínima, serão usados 10 µL do meio de cultura considerados com ausência de bactérias viáveis, os quais serão semeados em placas de Petri contendo Agar BHI e incubados por 24 horas a 37 °C. A CBM será considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

#### *5.2.5 Caracterização dos compostos presentes nos óleos essenciais de jambolão (*Syzygium cumini*)*

A caracterização do óleo essencial das folhas e sementes de jambolão será conforme metodologia usada por Victoria et al (2012), sendo realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Para isso o óleo será dissolvido em hexano e um volume de 1 µL de óleo será injetado no cromatógrafo utilizando coluna capilar, a temperatura programada será de 40 °C a 250 °C a 10 minutos, tendo como carreador o gás hélio (3mL/min). Os compostos presentes no óleo serão identificados com base na comparação dos índices de retenção e espectro de massa deste com os padrões presentes na biblioteca do aparelho.

Para determinação de fenóis totais será utilizado espectroscopia na região visível através do método de Folin-Ciocalteu com modificações (SOUSA et al, 2007) e para avaliar o índice de retenção será feita a determinação do índice de Kovats de acordo com Lenz et al (2011).

#### *5.2.6 Análise do potencial antioxidante dos compostos presentes nos óleos essenciais de jabolão (*Syzygium cumini*)*

A análise de potencial antioxidante será conforme descrito por Rufino et al (2007), através dos métodos de capacidade sequestrante de radicais livres sintéticos: DPPH e ABTS, e da capacidade de inibir a oxidação do ácido linoleico.

No ensaio de capacidade sequestrante do radical DPPH serão feitas soluções de álcool etílico a 50%, de acetona a 70%, de DPPH 0,06 mM e controle de álcool etílico, acetona e água. Para determinar a curva do DPPH serão preparadas soluções a partir da solução inicial de DPPH (60  $\mu$ M) em balões volumétricos de 10 mL variando a concentração de 10  $\mu$ M a 50 $\mu$ M. Em local com ausência de luz, se faz a transferência de uma quantidade, em torno de 4 mL, de cada solução de DPPH (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 60  $\mu$ M) para as cubetas de vidro e procede-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm, usando álcool etílico como branco para realizar a calibração do aparelho. Colocar as concentrações de DPPH no eixo X e as suas respectivas absorbâncias no eixo Y para calcular a equação da reta e, assim, obter a curva de DPPH.

Para determinar a atividade antioxidante, preparam-se três diluições diferentes do óleo em triplicata, em local com ausência de luz procede-se a transferência de quantidades de 0,1 mL de cada diluição do óleo para tubos de ensaio contendo 3,9 mL do radical DPPH (0,06 Mm) e realizar uma homogeneização em agitador de tubos. Adicionar 0,1 mL das soluções controle à 3,9 mL do radical DPPH e misturar, para calibrar o espectrofotômetro utilizar álcool etílico como branco. Deve-se fazer o monitoramento das leituras (515 nm) a cada minuto para se observar a diminuição da absorbância até sua estabilização.

Depois da leitura, fazer a equação da curva de DPPH para saber o consumo em  $\mu\text{M}$  de DPPH e após modificar para g DPPH conforme abaixo:

$$y = ax - b$$

Onde:

$y$  = Absorbância inicial do controle / 2

$x$  = resultado em  $\mu\text{M}$  DPPH

Obs.: converter para g DPPH, através da transformação:

g DPPH = ( $\mu\text{M}$  DPPH / 1.000.000) \* 394,3 (peso molecular do DPPH).

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições do óleo, colocar a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X e determinar a equação da reta mostrada abaixo:

$$y = - ax + b$$

Onde:

$y$  = Absorbância inicial do controle / 2

$x$  =  $\text{EC}_{50}$  (mg/L) (concentração do extrato necessária para reduzir 50% do radical DPPH)

Para calcular a atividade antioxidante total deve-se substituir a absorbância equivalente a 50% da concentração do DPPH pelo  $y$  (na equação acima) e encontrar o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH ( $\text{EC}_{50}$ ).

A partir do resultado (mg/L) encontrado na equação acima, divide-se por 1.000 para ter o valor em g e, após, divide-se pelo valor encontrado em g DPPH para obter o resultado final na equação abaixo que é expresso em g fruta (porção comestível) / g DPPH.

$$\text{g fruta / g DPPH} = (\text{EC}_{50} \text{ (mg/L)} / 1.000 * 1) / \text{g DPPH}$$

Para análise de ABTS serão preparadas soluções de metanol a 50%, acetona a 70%, ABTS 7mM, persulfato de potássio 140 mM, padrão de trolox 2 mM e radical ABTS<sup>+</sup>. Para se obter a curva-padrão de trolox, a partir da solução padrão de trolox (2000  $\mu\text{M}$ ), prepara-se, nos balões volumétricos de 10 mL, soluções que variam de 100  $\mu\text{M}$  a 1500  $\mu\text{M}$  de concentração. Então em um local sem luminosidade se faz a transferência de uma quantidade de 30  $\mu\text{l}$  de cada solução de trolox para tubos de ensaio, misturando com 3,0 mL de solução do radical ABTS e homogeneizando em agitador de tubos. Aguarda-se

6 minutos para efetuar a leitura (734 nm) e para calibração do espectrofotômetro utiliza-se como branco o álcool etílico.

Colocam-se as concentrações de trolox ( $\mu\text{M}$ ) no eixo X e suas respectivas absorbâncias no eixo Y e calcula-se a equação da reta, a partir desta pode-se calcular a absorbância referente a 1000  $\mu\text{M}$  de trolox, como na equação abaixo:

$$y = - ax + b$$

Onde:

x = 1000  $\mu\text{M}$  do trolox

y = absorbância correspondente a 1000  $\mu\text{M}$  de trolox

Para determinar a atividade antioxidante total se faz nos tubos de ensaio três diluições diferentes do óleo em triplicata, então em local sem luminosidade, transfere-se uma quantidade de 30  $\mu\text{L}$  de cada diluição para tubos de ensaio contendo 3,0 mL de radical ABTS<sup>+</sup> e homogeneíza em agitador de tubos. Para efetuar a leitura (734 nm), espera-se 6 minutos e calibra-se usando como branco o álcool etílico. Coloca-se a absorbância no eixo Y, a diluição (mg/L) no eixo X e efetua-se a equação da reta, para o cálculo da atividade antioxidante total se substitui na equação da reta a absorbância equivalente a 1000  $\mu\text{M}$  do padrão trolox. O valor obtido para o termo X corresponde à diluição da amostra (mg/L) que equivale a 1.000  $\mu\text{M}$  de trolox, como na equação abaixo.

Cálculo das diluições do extrato (mg/L) equivalente a 1.000  $\mu\text{M}$  de trolox:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = Absorbância correspondente a 1.000  $\mu\text{M}$  de trolox

x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000  $\mu\text{M}$  de trolox

A partir do resultado (x) obtido na equação acima, dividi-se por 1.000 para ter o valor em g. O resultado final é calculado pela divisão de 1.000 ( $\mu\text{M}$ ) pelo valor de X(g) e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em  $\mu\text{M}$  trolox / g de fruta (porção comestível).

Cálculo final expresso em ( $\mu\text{M}$  trolox / g)

$$X(\text{g}) = x / 1.000$$

$$Z = 1000 / X(\text{g}).1$$

A análise de peroxidação lipídica do ácido linoleico será feita como descrita por Choi et al (2002), onde será efetuada uma reação da mistura contendo 500 µl de ácido linoléico (20 mM), 500 mL de Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), 100 µl de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (4 mM) e uma concentração variável de cada extrato (óleo essencial). A peroxidação do ácido linoleico será iniciada pela adição de 100 µl de ácido ascórbico (2 mM), incubados por 30 minutos à 37 °C e terminada pela adição de ácido tricloroacético (5,5%). Será adicionado 1 mL da mistura em 250 µl de ácido tiobarbitúrico e depois em 50 mM de NaOH, seguido por aquecimento durante 10 minutos. As misturas serão centrifugadas à 3500xg por 10 minutos e a absorbância das substâncias que reagiram ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no sobrenadante serão lidas em 532 nm. A porcentagem de atividade antioxidante será convertida utilizando a seguinte equação:

$$\text{Inibição da peroxidação do ácido linoleico (\%)} = (\text{Ac}-\text{As}) \times 100 / (\text{Ac}-\text{As})$$

Onde: Ac=Ab é o controle (sem extrato); As=Ab é o extrato; An=Ab é o branco (sem extrato e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O).

#### *5.2.7 Avaliação estatística dos resultados*

Os resultados serão avaliados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) quando necessário, utilizando-se o programa Statística 7.0 (StatSoft, Inc.).

## **6 Resultados e Impactos Esperados**

Como resultado espera-se que os óleos essenciais de jambolão tenha potencial antioxidante, efeito antimicrobiano e que a microencapsulação preserve estas características durante o processamento e armazenamento de alimentos, bem como propicie a liberação controlada dos compostos.

Como impacto espera-se poder ampliar a utilização dessa fruta, que apresenta baixo aproveitamento industrial e comercial.

Também busca-se contribuir para o desenvolvimento de novos compostos com menor toxicidade ao ser humano, e para desenvolvimento de conservantes alimentícios menos agressivos, originados de matérias-primas abundantes na região, diminuindo a dependência de países do exterior e de formulações de conservantes químicos.



## Orçamento

O orçamento será de acordo com o quadro abaixo.

Quadro 2: Orçamento.

<b>Descrição</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor Total</b>
Microplacas de poliestireno com 96 cavidades com tampa	15	80,05
Cloreto de Sódio (NaCl)	Frasco de 500g	8,20
Agar Triptona de Soja (TSA)	Frasco de 500g	207,70
Placas de petri descartável	200 placas	59,60
Extrato de Levedura (YE)	Frasco de 500g	173,25
Infusão Cérebro e Coração (BHI)	Frasco de 500g	218,65
Caldo Triptona de Soja (TSB)	Frasco de 500g	182,75
Etanol P. A.	1L	15,45
Papel toalha	1 Pacote	14,50
Caixa porta ponteira de 200 microlitros	5	21,00
Ponteiras de 200 microlitros	Pacote com 1000 unidades	6,45
Ponteiras de 300 microlitros	Pacote com 1000 unidades	15,9
Nitrogênio líquido (recarga)	5 L	120,00
Hexano P. A.	1 L	19,85
Gás hélio pureza grau 6	1 m <sup>3</sup>	454,41
DPPH	1 g	844,50
ABTS	1 g	592,50
Acetona P. A.	1 L	23,55
Persulfato de Potássio	250 g	24,40
Trolox	1 g	309,00
Ácido Linoleico P. A.	25 g	460,00
Tris HCl	100 g	45,00
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1000 g	31,05

Ácido Ascórbico	500 g	73,45
Ácido Tricloroacético	250 g	44,75
Ácido Tiobarbitúrico	25 g	860,00
Goma Quitosana	250 g	559,50
NaOH	1000 g	48,45
Tween 80	1 L	54,80
Ácido Acético	1 L	23,55
Papel Filtro	1Pct	4,55
<b>TOTAL</b>		<b>5596,81</b>

## Referências

ABRAHÃO, S. A. et al. Atividade Antioxidante *In Vitro* e *In Vivo* de Café Bebida Mole. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 47, n. 1, Brasília, 2012.

ALVES, C. Q., et al. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *In vitro* em Substratos Orgânicas. **Quím. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

AUMEERUDDY-ELALFIA, Z.; GURIB-FAKIMB, A.; MAHOMOODALLYA, F. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. **Industrial Crops and Products**, n. 71, p. 197–204, 2015.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A Review of its Phytochemical Constituents and Traditional Uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 240-246, 2012.

BACHIR, R. G.; BENALI, M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 9, p. 739–742, 2012.

BAKKALI, F., et al. Biological Effects of Essential oils – Review. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 446-475, 2006.

BARBOSA, M. M. C. **Identificação Sorológica e Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos em Amostras de Escherichia coli Isoladas de Peixes e Água de Pesque-pagues**. 2010. 50 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARROS, E.; MACHADO, A.; SPRINZ, E. **Antimicrobianos - Consulta Rápida**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 556 p.

BASTI, A. A.; MISAGHI, A.; KHASCHABIB, D. Growth Response and Modelling of the Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil, pH and Temperature on *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 973–981, 2007.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, Brasília, D F, 09 abr. 1965.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Alimentos Regionais Brasileiros**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 486 p.

CABRAL, I. S. R., et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-27, 2009.

CAMPOS, M. R. H., et al. Caracterização Fenotípica pelo Antibiograma de Cepas de *Escherichia coli* Isoladas de Manipuladores, de Leite Cru e de Queijo “Minas Frescal” em um Laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1221-1227, 2006.

CARVALHO, C. R. D. Relação entre Parâmetros Ecofisiológicos e a Produção de Óleo Essencial em Espécies Arbóreas. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2013.

CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M.; GRECO, D. P. Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemisiadracunculus Linn. (Asteraceae)*, variedade inodora – estragão - frente à *Salmonella sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.26, p. 75 - 79, 2006.

CASTRO, M. L., et al. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Quim. Nova**, v. 30, N. 7, p. 1512-1516, 2007.

CHOI, C. W., et al. Antioxidant Activity And Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medicinal Plants And Flavonoids By Assay-Guided Comparison. **Plant Science**, v.163, p. 1161 – 1168, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana**. 6 ed. CLSI documento M07-A06. 23, 2, 2005.

DIMA, C., et al. Reprint of "Microencapsulation of essential oil of pimento [Pimentadiaoica (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method". **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v. 25, p. 97–105, 2014.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

FAI, A. E. C., et al. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v.16, n.2, 2011.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1571-1578, 2011.

FATHI, M.; MARTÍN, Á.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, p. 18-39, 2014.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FERRONATTO, R., et al. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais Produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharisuncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17, p. 224-230, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 606 p.

FRANCO, J., et al. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptuscinerea* F. Mull. exBenth., Myrtaceae, extraído em

diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 15, p. 191-194, 2005.

FRIEDLY, E. C., et al. In Vitro Antilisterial Effects of Citrus Oil Fractions in Combination With Organic Acids. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, 2009.

GAVANJI, S., et al. Antimicrobial and Cytotoxic Evaluation of Some Herbal Essential Oils in Comparison With Common Antibiotics in Bioassay Condition. **Integrative Medicine Research**, n.3, p. 142–152, 2014.

GONSALVES, J. K. M. C., et al. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, 2009.

HALTER, E. L.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 641–647, 2013.

HSIEH, W.; CHANG, C.; GAO, Y. Controlled release properties of Chitosan encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 209–214, 2006.

LENZ, G. F., et al. Determinação do Índice de Kovats para Mistura de Alcoóis Utilizando Software Simulador de Cromatografia Gasosa. In ENCONTRO DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 3, 2011, Toledo. **Anais...** Toledo, 2011.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, n. 55, p. 645–659, 2006.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Composição Centesimal, Potencial Antioxidante e Perfil dos Ácidos Graxos de Sementes de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 2, p. 219-223, 2009.

MACHADO, A.; BARROS, E. **Antimicrobianos em Pediatria - Consulta Rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2006, 296 p.

MADIGAN, M. T., et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1126 p.

MARTUCCI, J. F. et al. Oregano and Lavender Essential Oils as Antioxidant and Antimicrobial Additives of Biogenic Gelatin Films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 205–213, 2015.

MIGLIATO, K. F. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farm. Bonaerense**, n.25, p. 310-314, 2006.

MORTON, Julia F. Jambolan. In: MORTON, Julia F. **Fruits of warm climates**. Miami: Universidade de Michigan, 1987. p. 375–378.

NEDOVIC, V. et al. An Overview Of Encapsulation Technologies For Food Applications. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1806 – 1815, 2011.

OETTERER, M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2006, 613 p.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para Avaliação e Pesquisa da Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17, p. 102-107, 2007.

PARIZE, A. L. **Microencapsulação e Liberação Controlada do Corante Natural de Urucum Utilizando Matriz Polimérica de Quitosana**. 2003. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PENG, C., et al. Chemical Composition, Antimicrobial Property and Microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) Seed Essential Oil by Complex Coacervation. **FoodChemistry**, n. 165, p. 560–568, 2014.

PERES, N. D. et al. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.4, 2010.

PONTES, W. J. T., et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopiasericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychusurticae* Koch). **Quím. Nova**, v.30, n.4, São Paulo, 2007.

RAMOS, et al. **Antimicrobianos em Ginecologia e Obstetrícia**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 373 p.

REBELLO, F. F. P. Microencapsulação De Ingredientes Alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, P. 134-144, 2009.

REDDY, L. J., JOSE, B. Evaluation of Antibacterial and DPPH Radical Scavenging Activities of the Leaf Extracts and Leaf Essential Oil of *Syzygium cumini* linn. from South India. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, vol 5, 2013.

REGUA-MANGIA, A. H., et al. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): Filotipagem e Resistência a Antimicrobianos em um Enteropatógeno Emergente. **Revista Patologia Tropical**, v. 38, n.1, 2009.

RIBEIRO, M. G., et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v.58, n.5, 2006.

ROCHA, F. I. G. **Avaliação da Cor e da Atividade Antioxidante da Polpa e Extrato de Mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) em Pó**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

RUFINO, M. S. M., et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza: EMBRAPA Comunicado Técnico 127, 2007, 4 p.

RUFINO, M. S. M., et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +**. Fortaleza: EMBRAPA Comunicado Técnico 128, 2007, 4 p.

RUTZ, J. K. **CARACTERIZAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DE SUCO DE PITANGA ROXA (*Eugenia uniflora* L.)**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

SAMARANAYAKE, L. **Fundamentos de Microbiologia e Imunologia na Odontologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012, 360 p.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTURIO, J. M., et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.803-808, 2007.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidante assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009.

SHINOHARA, S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1669-1674, 2008.

SILVA-SANTOS, A., et al. Análise Técnica, Econômica e de Tendências da Indústria Brasileira de Óleos Essenciais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais Papel Virtual**, v. 8, n. 14, 2006.

SILVEIRA, L. M. S., et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de Agar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, n.90, p. 124-128, 2009.

SOARES, J. J. **Avaliação da Atividade Antioxidante *In vitro* e *In vivo* de Extratos Preparados a Partir das Folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2013.

SOUSA, C. M. M., et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STRAUSS, G.; GIBSON S. M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 1, p. 81-89, 2004.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

TASSOU, C. C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish filests in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere on air. **Journal of Food Protection**, n. 59, p. 31-34, 1995.

UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4 ed. Campinas: UNICAMP, 2011, 161 p.

VANDEGAER, J. E. **Microencapsulation: Processes and Applications**. New York: Springer, 1974. 180 p.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 5, p. 923-932, 2005.

VICTORIA, F. N., et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, n. 50, p. 2668–2674, 2012.

VIZZOTTO, M., et al. Polpas de Frutas: Fontes de Compostos Antioxidantes. In: 4<sup>o</sup> Simpósio de Segurança Alimentar, 2012, Gramado. Anais eletrônico... Gramado: FAURGS-RS, 2012. Disponível em:<  
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/70976/1/0000000890-Polpas-Gramado-Marcia-e-Jair.pdf>> Acesso em: 08 nov. 2015.

VIZZOTTO, M., PEREIRA, M. C. **Caracterização das Propriedades Funcionais do Jambolão**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 79. Pelotas: EMBRAPA, 2008. 27 p.

ZHANG, Y., et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 47 – 53, 2007.

ZHENG, L.; DING, Z.; ZHANG, M.; SUN, J. Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. **Journal of Food Engineering**, v.104, n.1, p. 89-95, 2011.

WU, T-H.; YEN, F-L.; LIN, L-T.; TSAI, T-R.; LIN, C-C.; CHAM, T-M. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin 95 nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.346, p.160–168, 2008.

YUN, J., et al. Natural surface coating to inactivate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and maintain quality of cherry tomatoes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, n. 16, p. 59–67, 2015.

#### **4 Relatório do Trabalho de Campo**

Em função de problemas relacionados a atrasos em compras e na entrega de reagentes, falta de recursos para compra de novos materiais e reagentes e no caso específico do jambolão, em função da sazonalidade, da escassez da matéria-prima, do baixo rendimento de extração do óleo, não foi possível realizar as etapas de atividade antimicrobiana pelo método CIM e CBM, bem como a caracterização química e a análise antioxidante do óleo essencial das folhas de jambolão, nem a microencapsulação do óleo essencial de jambolão. Só foi possível realizar um ensaio de DPPH, devido à falta de reagente. Em função destas limitações optou-se por realizar a microencapsulação com o óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*.

## 5 Artigo 1

Caracterização, atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de folhas e sementes de jambolão (*Syzygium cumini*)

Ucker, C. D. L.; Rodrigues, N. C.; Carvalho, R. B.; Borges, C. D.; Victoria, F. N.; Zambiasi, R. C.; Freitag, R.; Jacob, R.; Hartwig, D.; Gandra, E. A.

### Resumo

O jambolão (*Syzygium cumini*) pertence à família Myrtaceae, sendo mais conhecido popularmente por suas aplicações no tratamento de doenças, do que pelo consumo do fruto. Pode ser utilizado na obtenção de óleos essenciais, os quais são metabólitos secundários de plantas aromáticas, sendo formados por uma mistura de compostos complexos e voláteis e apresentam como principal característica forte odor e podem apresentar propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi extrair os óleos essenciais das folhas e sementes de jambolão, caracterizar e avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante dos óleos essenciais. A extração foi realizada em equipamento Clevenger, utilizando a técnica de hidrodestilação. A caracterização foi feita através de cromatografia gasosa, obtendo como principal constituinte do óleo essencial de semente o  $\beta$ -cariofileno. Tanto o óleo de folhas quanto o das sementes tiveram atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*, não apresentando frente a *Listeria monocytogenes* nas técnicas de difusão, porém na técnica de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima o óleo essencial das sementes de jambolão apresentou efeito frente a todas as bactérias. Quanto à atividade antioxidante, utilizando o ensaio espectrofotométrico 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, o óleo essencial não apresentou potencial antioxidante. Conclui-se que o óleo essencial de folhas e sementes de jambolão apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos. O óleo essencial de sementes apresentou como principal constituinte o  $\beta$ -cariofileno e não exibiu atividade antioxidante. Devido ao potencial antimicrobiano, os óleos essenciais de jambolão poderiam ser utilizados como conservantes naturais, para tanto análises *in situ* deveriam ser realizadas, bem como a análise antioxidante poderia ser realizada utilizando uma concentração maior de óleo essencial e também outro método de análise além do DPPH.

Palavras-chave: óleo essencial, antimicrobiano, antioxidante.

## Abstract

The jambolan (*Syzygium cumini*) belongs to the family Myrtaceae, more popularly known by its applications in the treatment of diseases, than the fruit consumption. It can be used to obtain essential oils, which are secondary metabolites of aromatic plants, being formed by a mistutra complex and volatile compounds and have as main characteristic strong odor and may have antimicrobial properties and antioxidants, so the aim of this study it was to extract the essential oils from the leaves and seeds jambolan, characterize and evaluate the antimicrobial potential of essential oils and antioxidant. The extraction was performed in Clevenger equipment using the hydrodistillation technique. The characterization was done by gas chromatography, obtaining as a main constituent of the essential oil seed  $\beta$ -caryophyllene. Both the leaves of oil and the seeds had antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli*, did not show against *Listeria monocytogenes* in broadcasting techniques, but in Inhibitory Concentration technique Minimum and Minimum Bactericidal Concentration essential oil seeds jambolan presented effect. The antioxidant activity using the spectrophotometric assay 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, the essential oil showed no antioxidant potential. It was concluded that the essential oil of leaves and seeds of jambolão showed antimicrobial activity against bacteria and fungi. The essential oil of seeds presented the main constituent  $\beta$ -caryophyllene and did not exhibit antioxidant activity. Due to the antimicrobial potential, jambolan essential oils could be used as natural preservatives for both in situ analyzes to be performed, as well as the antioxidant analysis could be performed using a higher concentration of essential oil and also another method of analysis besides DPPH .

Keyword: essential oil, antimicrobial, antioxidant.

## 1. Introdução

O jambolão (*Syzygium cumini*) pertence à família *Myrtaceae*, sendo mais conhecido popularmente por suas aplicações no tratamento de doenças, do que pelo consumo do fruto. O fruto possui sabor adstringente, que varia do ácido ao doce, apresentando uma polpa branca ou roxa, bastante suculenta, contendo, normalmente, uma semente. É originário da Índia, Birmânia, Ceilão e Ilhas Andamão, sendo que no sul da Ásia, a árvore é considerada sagrada por Krishna e por isso é comum sua presença nas proximidades de templos hindus (MORTON, 1987).

No Brasil, é conhecido também por jamelão, jambuí, jalão, azeitona-do-nordeste e guapê. Apresenta período de frutificação de janeiro a maio, com uma árvore que pode alcançar 10 metros de altura. O principal mineral encontrado no fruto é o fósforo, enquanto a principal vitamina é a C (BRASIL, 2015). Dentre os diversos aproveitamentos dessa planta está a possibilidade de obtenção de óleos essenciais a partir das folhas e sementes (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

Óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas aromáticas, sendo formados por uma mistura de compostos complexos e voláteis e apresentam como principal característica forte odor. Exercem importante função de proteção das plantas, atuando como agente inseticida, antifúngico, antibacteriano, antiviral e contra herbívoros, diminuindo o apetite dos animais por essas plantas e ainda ajudam a atrair insetos que favorecem a disseminação de sementes e pólen e repelem outros indesejáveis. Devido às propriedades antimicrobianas e antioxidantes podem ser utilizados em alimentos e medicamentos (BAKKALI et al., 2006).

As propriedades antimicrobianas estão relacionadas com a capacidade apresentada por algumas substâncias de eliminar ou impedir o desenvolvimento de microrganismos, podendo estas terem origem sintética ou natural. Apesar da importância dos antimicrobianos sintéticos para o controle da deterioração de alimentos, visto que os microrganismos são os principais agentes nesse processo, seu uso pode estar relacionado com o desenvolvimento de problemas de saúde nos consumidores, devido à sua toxicidade, podendo causar, inclusive, danos ao DNA (HONORATO et al.,

2013). Além disso, seu uso exagerado ou imprudente fez com que muitos microrganismos desenvolvessem resistência aos antimicrobianos sintéticos comumente utilizados, fazendo com que a obtenção dessas substâncias de fontes naturais se tornasse uma opção para o problema (RAMOS et al., 2007).

Os antioxidantes são substâncias que podem retardar ou inibir os processos oxidativos. Existem muitas evidências sobre o papel dos radicais livres e outros agentes oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) nos processos de envelhecimento e desenvolvimento de doenças degenerativas, como câncer e disfunções cerebrais (YANG et al, 2000; VALKO et al, 2007; PERRY; FAN; TAINER, 2007; SARMA; MALLICK; GHOSH, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011). Tendo em vista o potencial dessas substâncias, vem aumentando o interesse por compostos que apresentem ação antioxidante (MORAIS et al, 2006; MORENO et al, 2006; SOUSA et al., 2007; ZENG et al, 2012; ESHWARAPPA et al, 2014).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi extrair os óleos essenciais das folhas e sementes de jambolão, caracterizar e avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante dos óleos essenciais.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Obtenção dos óleos essenciais das folhas e sementes de jambolão**

As amostras de folhas e frutos de jambolão, provenientes da coleção de frutíferas da Embrapa Clima Temperado, localizada na cidade de Pelotas-RS, Brasil (safra 2015), foram coletadas em estágio maduro, sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio (100 ppm), enxaguadas com água e mantidas sob congelamento (-70 °C) até o momento da extração do óleo essencial.

O processo de extração foi realizado de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010) com algumas modificações. A extração do óleo essencial foi iniciada pelo processo de maceração com nitrogênio líquido, utilizando grau e pistilo para as folhas e moinho de bolas (Marconi MA350) para as sementes.

Após, o material foi submetido a um processo de hidrodestilação, utilizando o aparelho Clevenger, durante 3 h. Os óleos essenciais obtidos

foram transferidos para um frasco de vidro âmbar, os quais foram armazenados sob congelamento a temperatura de -18 °C.

## **2.2 Caracterização química do óleo essencial de sementes de jambolão**

A caracterização química do óleo essencial de jambolão foi realizada conforme metodologia proposta por Victoria et al. (2012) com algumas modificações, através de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (Shimadzu GCMS QP 2010). Para isso os óleos essenciais foram dissolvidos em acetato de etila e um volume de 1 µL de óleo foi injetado no cromatógrafo, utilizando coluna capilar, a temperatura programada foi de 60 °C, aumentando 4 °C/min até 220 °C, sendo mantido a 220 °C por 2 min e tendo como carreador o gás hélio (0,80 mL/min). Os compostos presentes nos óleos essenciais foram identificados com base na comparação dos índices de retenção e espectro de massa deste com os padrões presentes na biblioteca NIST EP/EPA/MIH (NIST 05) do aparelho.

## **2.3 Atividade antimicrobiana**

### **2.3.1 Bactérias**

Para avaliar a atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão das espécies de bactérias *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

As culturas bacterianas foram mantidas sob congelamento em um meio contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção de 3:1 (v:v). A reativação dos microrganismos foi realizada através da transferência das culturas para caldo BHI estéril, e incubação durante 24 h a 37 °C. Após incubação, uma alçada de cada cultura foi transferida e estriada em placas contendo Agar Padrão para Contagem (PCA) para *S. Typhimurium*, Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli*, Palcam para *L. monocytogenes* e Baird - Parker para *S. aureus*, após as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. A partir das colônias isoladas nos Agares, extraiu-se uma alçada e

ressuspendeu-se em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada em concentração 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Todas as avaliações foram realizadas em triplicata.

### **2.3.1.1 Disco difusão e difusão em Agar**

A atividade antimicrobiana foi avaliada através do método de disco difusão, de acordo com protocolo proposto pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI 2005), e pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2009), com pequenas modificações.

Na técnica de disco difusão, a solução salina inoculada foi semeada através de espalhamento utilizando *swab* estéril na superfície de placas contendo Agar Muller-Hinton. Depois de seco, adicionou-se discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro contendo 10 µL dos óleos essenciais de folhas e sementes de jambolão sobre o Agar, posteriormente, procedeu-se a incubação por 24 h a 37 °C e após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição, utilizando paquímetro.

Na técnica de difusão em Agar, quatro pequenos poços equidistantes (diâmetro 6 mm) foram feitos no centro das placas contendo Agar Muller-Hinton, então a solução salina inoculada foi semeada através de *swab* estéril e 60 µL do óleo essencial das sementes de jambolão foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas a 37 °C e as leituras realizadas após 24 h de incubação, novamente foram efetuadas as medições dos halos de inibição utilizando paquímetro. Em ambos testes, os resultados foram expressos em mm.

### **2.3.1.2 Concentração Inibitória Mínima**

As técnicas de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram realizadas somente com o óleo essencial de sementes de jambolão devido ao baixo rendimento do óleo essencial da folha e, com isso, não sendo possível ter amostra suficiente para realizar a análise.

A determinação da CIM foi realizada utilizando microplacas de titulação de 96 poços, em cada poço acrescentou-se 100 µL de caldo BHI previamente inoculado (conforme descrito anteriormente no item 2.3.1), após foram adicionados 100 µL de óleo essencial de sementes de jabolão em concentrações variando de 0,1 – 0,001 mg de óleo essencial.mL<sup>-1</sup> de dimetilsulfóxido P.A. (DMSO), obtendo uma concentração final de 0,5 – 500 mg de óleo essencial.mL<sup>-1</sup> de BHI, e procedeu-se a incubação por 24 h a 37 °C. Foi utilizado como branco BHI inoculado sem óleo essencial. Após a incubação, foram adicionados 30 µL de corante Resazurina (0,01%; m/v) para auxiliar na visualização dos poços com crescimento bacteriano. Transcorrido 3 h de incubação, os poços em que não foi alterada a coloração foram considerados com ausência de bactérias viáveis, caso contrário se considerou com presença.

### **2.3.1.3 Concentração Bactericida Mínima**

Na técnica de CBM, foram usados 10 µL do meio de cultura considerados com ausência de bactérias viáveis no teste de CIM, os quais foram semeados em placas de Petri contendo Agar BHI e incubados por 24 h a 37 °C. A CBM foi considerada como a menor concentração do óleo em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

## **2.3.2 Fungos**

### **2.3.2.1 Difusão em Agar**

Para avaliar a atividade antifúngica foram utilizadas os gêneros de fungos *Trichoderma* spp. e *Rizhopus* spp.

A atividade antimicrobiana contra fungos foi avaliada através da técnica de difusão em Agar, para isso primeiramente foi preparado o inóculo fúngico, o qual foi realizado conforme metodologias descritas por Gurgel et al. (2005) e Fontenelle et al. (2007). As culturas dos fungos foram estriadas separadamente na superfície de placas com Agar dextrose batata (BDA) e incubadas a 25 °C por 5 dias.

Após o período de incubação, os cultivos fúngicos foram cobertos com 2 mL de solução salina estéril e com auxílio de alça microbiológica, foram realizadas raspagens da superfície de cada cultura, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões foram transferidas com auxílio de micropipetas para tubos de ensaio estéreis vazios e, em seguida, deixados em repouso a 28 °C por 5 min. O sobrenadante dessas suspensões foi padronizado na concentração 0,5 da escala de McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

Em seguida iniciou-se a análise de difusão em Agar seguindo a metodologia proposta por Fontenelle et al. (2007).

Cada inóculo fúngico padronizado foi estriado com o auxílio de um *swab* estéril na superfície de placas de Petri com Agar BDA estéril. Quatro pequenos poços eqüidistantes (diâmetro 6 mm) foram feitos no centro da placa e 60 µL do óleo essencial das folhas e sementes de jambolão foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas a 25 °C e as leituras feitas após 3, 5 e 8 dias de incubação. Foram efetuadas as medições dos halos de inibição utilizando paquímetro e os resultados foram expressos em mm.

#### **2.4 Atividade antioxidante do óleo essencial de sementes de jambolão**

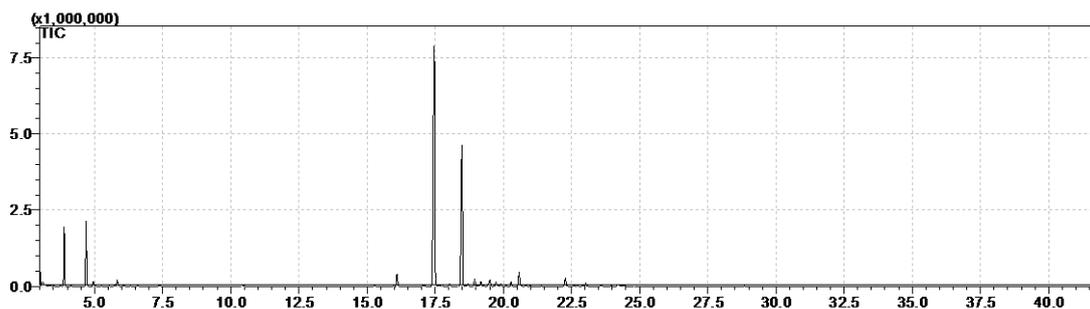
A avaliação do potencial antioxidante do óleo essencial de sementes de jambolão foi realizada de acordo com metodologia proposta por Choi et al. (2002), com algumas modificações, utilizando o ensaio espectrofotométrico DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Para a realização das análises, os óleos essenciais foram diluídos em diferentes concentrações (500 µg.mL<sup>-1</sup>, 100 µg.mL<sup>-1</sup>, 50 µg.mL<sup>-1</sup> e 10 µg.mL<sup>-1</sup>) de DMSO.

As diferentes concentrações dos óleos essenciais (10 µL) foram misturadas com uma solução de DPPH (990 µL), resultando em uma concentração final de DPPH de 85 µM. Essa mistura foi aquecida em banho-maria (30 °C) por 30 min na ausência de luz. A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente (AAKER SP1105) no comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH.

### 3. Resultados e discussões

#### 3.1 Caracterização do óleo essencial de sementes de jambolão

A Figura 1 apresenta o cromatograma do óleo essencial das sementes de jambolão, a identificação dos principais compostos presentes no óleo pode ser observada na Tabela 1.



**Figura 1.** Cromatograma do óleo essencial de jambolão

**Tabela 1.** Compostos presentes no óleo essencial de sementes de jambolão

Linha	Tempo de retenção (min)	Quantidade relativa em área do espectro (%)	Composto
1	3.88	6.56	$\alpha$ -pineno
2	4.69	7.76	$\beta$ -pineno
3	4.95	0.63	$\beta$ -mirceno
4	5.80	0.70	Limoneno
5	16.06	1.93	$\alpha$ -copaeno
6	17.53	51.82	$\beta$ -cariofileno
3	18.48	27.05	$\alpha$ -cariofileno
4	20.57	2.08	Delta-cadineno
5	22.19	1.47	Oxido de cariofileno

\* Compostos identificados por comparação com bibliotecas NIST EP/EPA/MIH (NIST 05).

Pode-se observar que os compostos majoritários são  $\beta$ -cariofileno, seguido de  $\alpha$ -cariofileno,  $\beta$ -pineno e  $\alpha$ -pineno. Ehrenfried et al. (2011) ao avaliarem a composição química de óleo essencial de sementes de jambolão

também encontraram como componente majoritário o  $\beta$ -cariofileno, porém seguido de óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e epóxido de humuleno.

A composição química de óleos essenciais é função de várias fatores, como sazonalidade, condições climáticas, características do solo, localização geográfica da planta, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

## 3.2 Atividade antimicrobiana

### 3.2.1 Bactérias

#### 3.2.1.1 Disco difusão e Difusão em Agar

Os óleos essenciais de folhas e sementes de jambolão apresentaram potencial antibacteriano nos ensaios de disco difusão e difusão em Agar, como pode ser observado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Halos de inibição formados nos métodos de disco difusão e difusão em Agar, utilizando óleo essencial de folhas e sementes de jambolão

Bactérias	Halos de inibição (mm)*			
	Disco difusão		Difusão em Agar	
	OEF	OES	OEF	OES
<i>S. Typhimurium</i>	2,42	1,75	3,25	ND
<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i>	5,67	4,25	4,25	ND
<i>E.coli</i>	2,67	ND	1,75	ND

\*Média das triplicatas; ND= Não detectado; OEF - Óleo Essencial de Folhas; OES - Óleo Essencial de Sementes.

De uma forma geral, o óleo essencial de jambolão extraído das folhas propiciou a formação de halos de inibição maiores do que o óleo essencial da semente para *S. Typhimurium*, *S. aureus* e *E. coli*, também apresentou halos de inibição nos dois métodos, com a exceção do microrganismo *L. monocytogenes*, já o óleo essencial de sementes somente apresentou efeito no método disco difusão para os microrganismos *S. aureus* e *S. Typhimurium*. Não foi observada atividade do óleo essencial de jambolão frente à *L.*

*monocytogenes*, independente da porção vegetal utilizada para a extração do óleo essencial e do método de avaliação utilizado.

Em relação à técnica de avaliação da atividade antimicrobiana, existem diversos fatores que podem influenciar no método de difusão como a solubilidade da amostra e a interação entre o meio de cultura e a substância antimicrobiana testada, além do disco de papel poder influenciar no contato desta com o microrganismo, por isso é importante testar as duas técnicas (ALVES et al., 2008).

No método de disco difusão observou-se a formação de halos maiores em relação aos microrganismos *S. aureus* e *E. coli*, já para *S. Typhimurium* halos superiores foram observados na técnica de difusão em Agar.

Ao utilizar a classificação proposta por Delfino (2008) para avaliar a atividade antimicrobiana de substâncias, baseado no tamanho do halo de inibição, considera-se como fraca quando atingiram até 4 mm, média de 5 a 9 mm e forte para halos maiores que 10 mm. Dessa forma pode-se considerar uma inibição média dos óleos essenciais de jambolão em relação ao *S. aureus* e fraca para os demais microrganismos.

*S. aureus* é um dos principais causadores de doenças transmitidas por alimentos aos seres humanos. Esse microrganismo tem a capacidade de produzir enterotoxinas e dessa forma pode causar intoxicação alimentar. Alguns seres humanos podem ser portadores assintomáticos de *S. aureus* enterotoxigênico na pele, garganta e nariz, assim, os manipuladores de alimentos podem ser uma fonte de contaminação de alimentos. Somado a isso, tem-se a capacidade de formar biofilmes, o que faz com que esse microrganismo sobreviva em ambientes hostis como as superfícies da indústria de alimentos, aumentando a possibilidade de uma contaminação alimentar (GUTIÉRREZ et al., 2012). Dessa forma, é importante a obtenção de substância com capacidade antimicrobiana frente a esse microrganismo.

Há poucos relatos na literatura referentes à atividade antimicrobiana do óleo essencial de sementes de jambolão, porém óleos essenciais de sementes de outras plantas apresentaram inibições superiores, como é o caso do fenogrego (*Trigonella foenum-graecum*) que propiciou a formação de halo de inibição de 15 mm frente a *E. coli* (MONIRUZZAMAN et al., 2015) e óleo

essencial de semente de mostarda, que apresentou halo de 15 mm frente a *S. aureus* e 10,25 mm frente a *E. coli* (PENG et al., 2014).

Trabalhos que utilizaram óleos essenciais extraídos de folhas também encontraram inibições maiores como Mohamed, Ali e El-Baz (2013) que encontraram halos de 12 mm para *E. coli* e para *S. aureus* utilizando óleo essencial de folhas de jambolão. Shafi et al. (2002) encontraram halos de 14 mm para *S. aureus*, 12 mm para *E. coli* e 20 mm para *S. Typhimurium* utilizando óleo essencial de folhas de *Syzygium cumini* e 12 mm para *S. aureus*, 11 mm para *E. coli* e 12 mm para *S. Typhimurium* utilizando óleo essencial de folhas de *S. travancoricum*.

Referente à diferença de resultados observados, em função da técnica utilizada, os resultados obtidos neste estudo diferem dos encontrados por Silveira et al. (2009), que obtiveram melhores resultados com a técnica de difusão em Agar ao avaliar extrato etanólico das cascas de frutos de *Punica granatum* L. (romã), com formação de halos em todos os microrganismos testados.

Quando os resultados obtidos no presente estudo foram comparados com extratos de folhas de jambolão, percebe-se semelhanças no comportamento observado em relação à técnica de avaliação para *E. coli*. Apesar de utilizar um extrato com caráter hidrofílico diferente do óleo que é lipofílico, Bona et al. (2014) utilizando extrato aquoso de folhas de jambolão observaram a formação de halo de inibição superior (8 mm) utilizando o método de disco difusão do que no método de difusão em Agar (0 mm) frente a *E. coli*, para o *S. aureus* foi o inverso, o maior halo foi observado no método de difusão em Agar (23,3 mm) em relação ao de disco difusão (13 mm).

Satish, Raghavendra e Raveesha (2008) analisaram o extrato aquoso das folhas de jambolão frente a *S. Typhimurium* e observaram a formação de halo de 10,75 mm utilizando o método de difusão em Agar, para *S. aureus* de 13 mm, não apresentando atividade contra *E. coli*. Borges et al. (2016) ao analisar extrato de jambolão também não obtiveram formação de halos de inibição para *L. monocytogenes*.

Pode-se considerar que em relação ao óleo essencial de folhas e sementes de jambolão, o método de disco difusão alcançou os melhores

resultados, quando comparado a difusão em Agar, podendo ser usado esse teste para avaliação antimicrobiana.

### 3.2.1.2 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

As concentrações e resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima de óleo essencial de sementes de jambolão frente as bactérias *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*

Bactérias	Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )				
	Bruto	500	50	5	0,5
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+

- Inibição de crescimento do microrganismo; + Ausência de inibição.

Como pode ser observado na Tabela 3, o óleo essencial de jambolão extraído das sementes inibiu o crescimento dos microrganismos avaliados, na forma bruta (óleo sem diluir), e nas concentrações 500 mg.mL<sup>-1</sup> e 50 mg.mL<sup>-1</sup>.

Apesar da bactéria *L. monocytogenes* não ter apresentado halos de inibição em nenhuma das técnicas de difusão testadas, foi realizado o método CIM, devido ao fato de que um microrganismo pode não apresentar halo de inibição, porém quando usada a técnica de CIM apresentar sensibilidade ao óleo essencial ou extrato testado, devido a fatores já mencionados sobre a técnica de difusão, como dificuldade de contato entre o antimicrobiano e o microrganismo.

A partir das concentrações que apresentaram inibição, foi feita a CBM, onde se obteve os resultados contidos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Concentração bactericida mínima de óleo essencial de sementes de jambolão frente as bactérias *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*

Bactérias	Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )		
	Bruto	500	50
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-

- Inibição de crescimento do microrganismo; + Ausência de inibição.

As concentrações avaliadas apresentaram efeito bactericida frente às bactérias testadas, com exceção do *Staphylococcus aureus*, o qual somente foi inibido pelo óleo bruto.

A diferença de resultados entre as técnicas de difusão e CIM pode acontecer devido a composição química das amostras, onde moléculas de maior polaridade ou com massa molecular maior podem possuir uma solubilidade maior e uma facilidade de dispersão em meio líquido superior (VALGAS et al., 2007). O fato de não apresentar halo de inibição não significa que o óleo ou extrato não tenha atividade antimicrobiana, isso pode estar relacionado com uma difusão incompleta, principalmente, para constituintes com menor polaridade que têm uma difusão mais lenta (MORENO et al., 2006).

Quanto a atuação do óleo essencial, de acordo com Bakkali et al. (2006), estes podem causar danos à membrana celular das bactérias através da permeabilização destas, isso acontece devido a perda de íons e diminuição do potencial da membrana das bactérias, colapso da bomba de prótons e esgotamento do *pool* de ATP, além disso, podem coagular o citoplasma. Esses danos podem levar a morte celular.

Não foram encontrados relatos na literatura utilizando óleo essencial de jambolão, assim os resultados foram comparados com extratos de jambolão e distintos óleos essenciais.

Bona et al (2014) encontraram CIM inferior aos resultados obtidos neste estudo para *S. aureus* (12,5 mg.mL<sup>-1</sup>), *S. Typhimurium* (0,78 mg.mL<sup>-1</sup>) e *E. coli* (0,78 mg.mL<sup>-1</sup>), utilizando extrato etanólico de folhas de jambolão, já quando avaliado extrato aquoso as concentrações foram de 25 mg.mL<sup>-1</sup>, 1,56 mg.mL<sup>-1</sup>

e  $3,13 \text{ mg.mL}^{-1}$  para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli*, respectivamente, foram obtidas.

Esses autores também avaliaram a CMB, sendo necessário  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $6,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$  de extrato etanólico de jambolão para inibir *S. aureus*, *S. Typhimurium* e *E. coli*, respectivamente, valores menores do que o óleo essencial, já o extrato aquoso não apresentou efeito contra *S. aureus* enquanto o óleo essencial somente apresentou efeito quando não foi diluído, para *S. Typhimurium* e *E. coli* a concentração bactericida do extrato aquoso foi menor que o óleo essencial com valor de 3,13 para ambas as bactérias.

Valores inferiores para ambas avaliações também foram obtidas com outros óleos essenciais. O óleo essencial de *Satureja horvatii* apresentou CIM de  $0,57 \text{ mg.mL}^{-1}$  e CBM de  $1,15 \text{ mg.mL}^{-1}$  frente a *Listeria monocytogenes* (BUKVIČKI et al., 2014), o óleo essencial de sementes de mostarda apresentou concentração inibitório mínima de  $0,128 \text{ mg.mL}^{-1}$  para *Staphylococcus aureus* e  $0,512 \text{ mg.mL}^{-1}$  para *Escherichia coli* (PENG et al., 2014) e o óleo essencial de sementes de *Carum copticum* apresentou CIM de  $0,078 \text{ mg.mL}^{-1}$  para *Salmonella* Typhi,  $0,065 \text{ mg.mL}^{-1}$  para *E.coli* e  $0,014 \text{ mg.mL}^{-1}$  para *Staphylococcus aureus* (KAVOOSI et al., 2013).

A diferença de resultados entre as técnicas de difusão e a técnica de CIM também ocorreu em trabalho realizado por Vieira, Pereira e Chavasco (2011), que ao usarem a técnica de difusão em Agar observaram inibição das bactérias testadas somente nas concentrações mais altas ( $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), sendo que *Pseudomonas aeruginosa* foi a que apresentou menor halo de inibição e somente nas concentrações de  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Quando realizaram a análise de CIM houve inibição dessa bactéria com uma concentração de  $0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ , bem menor do que a registrada na difusão em Agar.

Araújo (2011) observou que extratos metanólicos de *Duguetia echinophora*, *Duguetia riparia* e *Croton trinitatis* e extrato hexânico de *Cassytha americana* não foram capazes de inibir o desenvolvimento de bactérias na difusão em Agar, porém apresentaram na técnica de CIM.

Essa sensibilidade que os microrganismos demonstraram em relação ao óleo essencial de jambolão mostra que este apresenta potencial para ser

utilizado como antimicrobiano natural, o que aumenta a gama de utilização da planta.

### 3.2.2 Fungos

#### 3.2.2.1 Difusão em Agar

Os resultados da atividade antifúngica dos óleos essenciais de jambolão, pode ser observado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Halos de inibição formados na técnica de difusão em Agar, usando os óleos essenciais de folhas e sementes de jambolão

Fungos	Halos de inibição (mm)*	
	OEF	OES
<i>Trichoderma</i> spp.	4,50	2,25
<i>Rizhopus</i> spp.	3,35	ND

\*Média das leituras; ND= Não detectado; OEF - Óleo Essencial de Folhas; OES - Óleo Essencial de Sementes.

De uma forma geral, os halos obtidos caracterizam os óleos essenciais de jambolão como de inibição fraca a média. O óleo essencial de sementes de jambolão não foi capaz de inibir o crescimento do fungo *Rizhopus* spp. pela técnica utilizada.

Os óleos essenciais podem provocar a despolarização das membranas mitocondriais dos fungos, diminuindo o potencial de membrana e afetando o ciclo dos canais iônicos de  $Ca^{++}$  e outros iônicos, podendo reduzir o gradiente de pH que afeta a bomba de prótons e o *pool* de ATP. Ainda alteram a fluidez das membranas, que se tornam permeáveis, resultando em derrame de radicais, citocromo C, íons de cálcio e proteínas, como no caso do estresse oxidativo e insuficiência bioenergética. A permeabilização de membranas mitocondriais exteriores e interiores leva a morte celular por apoptose e necrose (BAKKALI et al., 2006).

Souza et al. (2010) analisaram a atividade antifúngica de extrato de alho sobre esses dois fungos, para os quais o extrato de alho inibiu o desenvolvimento de ambos. Em relação ao jambolão, outros trabalhos mostram que este possui efeito antifúngico, como Cartaxo-Furtado et al. (2015) que

observaram que o extrato etanólico da casca da árvore de jambolão foi um forte inibidor do crescimento de *Candida albicans* e Khan, Jabeen e Iqbal (2016) utilizaram extrato metanólico de casca da árvore e folhas de jambolão contra o fungo *Rhizoctonia solani*, obtendo como resultado a inibição do desenvolvimento do fungo.

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, *Citrus limon*, *Eucalyptus globulus*, *Lippia alba* e *Lippia microphylla* apresentaram halos de inibição frente a *Rhizopus* spp. de 13 mm, 12 mm, 13 mm, 12 mm e 12 mm, respectivamente. Esses halos foram maiores que os encontrados para o óleo essencial de jambolão, porém *Eugenia uniflora* e *Peumus boldus* não apresentaram halos de inibição frente a este fungo (SOUZA et al., 2005).

O óleo essencial de *Nepeta rtanjensis* apresentou atividade antifúngica frente a *Trichoderma* spp. utilizando outro método de avaliação (GRBIĆ et al., 2011), bem como o de *Matricaria recutita* também usando outro método (JAMALIAN et al., 2012).

### 3.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada somente com o óleo essencial de sementes de jambolão devido ao baixo rendimento do óleo essencial da folha e, com isso, não sendo possível ter amostra suficiente para realizar a análise.

O óleo essencial de sementes de jambolão não apresentou atividade antioxidante nas concentrações testadas no ensaio DPPH, porém isso não significa que este óleo não apresente essa característica, pois se avaliado usando outro método ou outras concentrações pode ser que apresente tal atividade.

Eshwarappa et al. (2014) analisaram a atividade antioxidante de extrato aquoso e metanólico de galhas foliares de jambolão, encontrando uma porcentagem de inibição de 43,23% e 58,07%, respectivamente na concentração de 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que Mussi et al. (2015) encontraram uma porcentagem de inibição de 90% em uma concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato metanólico de jambolão. Soares (2013) ao avaliar extratos aquosos e hidroalcoólicos de folha de jambolão em concentrações de 5 a 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  obteve porcentagem de inibição na faixa de 20 a 60%.

Mohamed, Ali e El-Baz (2013) observaram inibição de 55,87% de DPPH usando o óleo essencial de folhas de jambolão na concentração de 50 ug.mL<sup>-1</sup>, isso ocorre devido a composição química do óleo essencial variar de acordo com a parte da planta utilizada. Cabe ressaltar que o óleo essencial de sementes de jambolão não apresentou atividade antioxidante no método DPPH, mas pode apresentar se utilizado outro método e concentrações.

#### 4 Conclusão

O óleo essencial de folhas e sementes de jambolão apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos. O óleo essencial de sementes apresentou como principal constituinte o  $\beta$ -cariofileno e não exibiu atividade antioxidante. Devido ao potencial antimicrobiano, os óleos essenciais de jambolão poderiam ser utilizados como conservantes naturais, para tanto análises *in situ* deveriam ser realizadas, bem como a análise antioxidante poderia ser realizada utilizando uma concentração maior de óleo essencial e também outro método de análise além do DPPH.

#### Referências

ALVES, E. G. et al. Estudo Comparativo de Técnicas de *Screening* para Avaliação da Atividade Antibacteriana de Extratos Brutos de Espécies Vegetais e de Substâncias Puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ARAÚJO, I. S. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Aromáticas que Ocorrem no Estado do Pará**. 2011. 103 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A Review of its Phytochemical Constituents and Traditional Uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 240-246, 2012.

BAKKALI, F., et al. Biological Effects of Essential oils – Review. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 446-475, 2006.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de Métodos para Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (Cim) de Extratos Vegetais Aquosos e Etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

BORGES, K. C. et al. Fresh and Spray Dried Pitanga (*Eugenia uniflora*) and Jambolan (*Syzygium cumini*) Pulp are Natural Sources of Bioactive Compounds with Functional Attributes. **Journal of Probiotics & Health**, v. 4, n. 2, 2016.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 5 ed. Brasília, 2010. 523 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Alimentos Regionais Brasileiros**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 486 p.

BUKVIČKI, D. et al. Satureja horvatii essential oil: In vitro antimicrobial and antiradical properties and in situ control of *Listeria monocytogenes* in pork meat. **Meat Science**, v. 96, p. 1355–1360, 2014.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-27, 2009.

CARTAXO-FURTADO, N.A.D.E.O. et al. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, p.1091-1096, 2015.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant Activity And Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medicinal Plants And Flavonoids By Assay-Guided Comparison. **Plant Science**, v.163, p. 1161 – 1168, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana**. 6 ed. CLSI documento M07-A06. v. 23, n. 2, 2005.

DELFINO, T. P. C. **Sinergismo entre Substâncias Antimicrobianas e *Lactobacillus acidophilus* na Inibição de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella gallinarum***. 2008. 80 f. Tese (Doutorado em Microbiologia

Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho", 2008.

EHRENFRIED, C. A. et al. Composição química e atividade hipoglicemiante do óleo essencial das sementes de *Syzygium cumini* (Myrtaceae). **Sociedade Brasileira de Química**, São Paulo, v. 44, n. 48, p. 1, 2011.

ESHWARAPPA, R. S.B. et al. Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts. **BiolImpacts**, v. 4, n. 2, p. 101-107, 2014.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Antifungal activity of essential oils Croton species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n. 5, p. 1383-1390, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores De Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Quimica Nova**, vol. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRBIĆ, M. L. et al. Inhibitory effect of essential oil from *Nepeta rtanjensis* on fungal spore germination. **Central European Journal of Biology**, v. 6, n. 4, p. 583–586, 2011.

GURGEL, L.A. et al. In vitro antifungal activity of dragon"s blood from Croton urucurana against dermatophytes. **Journal Ethnopharmacol**, v. 97, p. 409-412, 2005.

GUTIÉRREZ, D. et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and Analysis of Associated Bacterial Communities on Food Industry Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8547–8554, 2012.

HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 8, n. 5, p. 01-11, 2013.

JAMALIAN, A. et al. Chemical composition and antifungal activity of Matricaria recutita flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, n. 4, p.308-15, 2012.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, p. 65–87, 2011.

KAVOOSI, G. et al. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Carum copticum* Seed and *Ferula assafoetida* Latex. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 2, 2013.

KHAN, A.; JABEEN, K.; IQBAL, S. Antifungal activity of *Syzygium cumini* L. against *Rhizoctonia solani*. **Pure and Applied Biology**, v. 5, n. 2, p. 193-199, 2016.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

MONIRUZZAMAN, S. et al. Gas chromatography Mass Spectrometry Analysis and *In Vitro* Antibacterial Activity Of Essential Oil From *Trigonella Foenum-Graecum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 12, p. 1033–1036, 2015.

MORAIS, S. M. et al. Atividade Antioxidante de Óleos Essenciais de Espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Quimica Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORENO, S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 223–231, 2006.

MORTON, J. F. Jambolan. In: MORTON, Julia F. **Fruits of warm climates**. Miami: Universidade de Michigan, 1987. p. 375–378.

MUSSI, L. P. et al. Spouted Bed Drying Of Jambolão (*Syzygium cumini*) Residue: Drying Kinetics And Effect On The Antioxidant Activity, Anthocyanins and Nutrients Contents. **LWT - Food Science and Technology**, v.61, p. 80-88, 2015.

PENG, C., et al. Chemical Composition, Antimicrobial Property and Microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) Seed Essential Oil by Complex Coacervation. **Food Chemistry**, n. 165, p. 560–568, 2014.

PERRY, J. J. P.; FAN, L.; TAINER, J. A. Developing Master Keys to Brain Pathology, Cancer and Aging from the Structural Biology of Proteins Controlling

Reactive Oxygen Species and Dna Repair. **Neuroscience**, v. 145, p.1280-1299, 2007.

RAMOS, et al. **Antimicrobianos em Ginecologia e Obstetrícia**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 373 p.

SARMA, A. D.; MALLICK, A. R.; GHOSH, A. K. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v.1, n. 3, p. 185-192, 2010.

SATISH, S.; RAGHAVENDRA, M. P.; RAVEESHA, K. A. Evaluation of the Antibacterial Potential of Some Plants Against Human Pathogenic Bacteria. **Advances in Biological Research**, v. 2, n. 3-4, p. 44-48, 2008.

SHAFI, P. M. et al. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, p. 414-416, 2002.

SILVEIRA, L. M. S., et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de Agar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, n.90, p. 124-128, 2009.

SOARES, J. J. **Avaliação da Atividade Antioxidante *In vitro* e *In vivo* de Extratos Preparados a Partir das Folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2013.

SOUSA, C. M. M., et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, E. L. et al. Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 245-250, 2005.

SOUZA, P. F. et al. Atividade Antifúngica de Diferentes Concentrações de Extrato de Alho em Sementes de Ingá (*Inga edulis*). **Revista Verde**, Mossoró, v.5, n.5, p. 08 – 13, 2010.

VALGAS, C. et al. Screening Methods To Determine Antibacterial Activity Of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, n. 50, p. 2668–2674, 2012.

VIEIRA, R. C.; PEREIRA, I. O.; CHAVASCO, J. K. Avaliação “*In Vitro*” da Atividade Antimicrobiana da Benzidamina. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 9, n. 2, p. 171-181, 2011.

YANG, J. et al. Antioxidant properties of fermented soybean broth. **Food Chemistry**, v. 71, p. 249-254, 2000.

ZENG, W. C. et al. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oil from Pine Needle (*Cedrus deodara*). **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, 2012.

## 6 Artigo 2

### Óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* como agente antimicrobiano e antioxidante

Ucker, C. D. L.; Rodrigues, N. C.; Carvalho, R. B.; Borges, C. D.; Victoria, F. N.;  
Zambiasi, R. C.; Castro, L. A. S.; Gandra, E. A.

#### Resumo

As espécies do gênero *Melaleuca*, pertencentes à família Myrtaceae, constituem-se em sua maioria de plantas arbóreas que se distribuem nas regiões subtropicais e tropicais, das quais podem se extrair óleos essenciais, porém o forte odor característico e a insolubilidade destes são fatores limitantes para sua aplicação, sendo uma alternativa para reduzir o forte odor dos óleos essenciais o processo de desodorização por *winterização*. Assim o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* e microencapsular em quitosana e ácido tânico pela técnica de coacervação simples a fim de avaliá-lo quanto a sua atividade antioxidante (*in vitro*) e antimicrobiana (*in vitro* e *in situ*). O óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* apresentou baixo teor de compostos fenólicos e ausência de terpenos. Entretanto, apresentou atividade antibacteriana e ausência de atividade antifúngica. Obteve-se alta eficiência de encapsulação do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* pela técnica de coacervação simples utilizando quitosana e ácido tânico, os resultados foram confirmados pela técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura. As micropartículas apresentaram formato irregular e tamanho distinto. As micropartículas apresentaram potente inibição frente aos microrganismos avaliados, devido à propriedade antimicrobiana da quitosana, porém sem atividade antioxidante. Não foi observada influência quanto a presença do ácido tânico nas micropartículas. O óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* apresentou potencial de aplicação em hambúrguer em função de apresentar atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli*.

Palavras-chave: óleo desodorizado, antimicrobiano, antioxidante, encapsulação.

## Abstract

The species of the *Melaleuca* genus, belonging to the Myrtaceae constitute mostly woody plants that are distributed in the subtropical and tropical regions, which can be extracted essential oils, but strong characteristic odor and the insolubility of these are limiting factors for your application. An alternative to reduce the strong odor of essential oils is the deodorization process for winterization, so the aim of this study was to characterize the *Melaleuca alternifolia* oil deodorized and to microencapsulate in chitosan and tannic acid by simple coacervation technique to evaluation it for antioxidant activity (*in vitro*) and antimicrobial (*in vitro* and *in situ*). The *Melaleuca alternifolia* oil deodorized showed low content of phenolic compounds and absence of terpenes. However, the oil showed antibacterial activity and no antifungal activity. It was obtained high encapsulation efficiency of *Melaleuca alternifolia* oil deodorized by simple coacervation technique using chitosan and tannic acid, the results were confirmed by Calorimetry Differential Scanning technique. The microparticles presented irregular size and distinctive shape. The microparticles showed potent inhibition compared to the microorganisms evaluated due to the antimicrobial property of chitosan, but no antioxidant activity. No significant differences were observed for the presence of tannic acid in the microparticles. The deodorized oil of *Melaleuca alternifolia* showed potential of application in hamburger due to the presence of antimicrobial activity against *Escherichia coli*.

Keyword: deodorized oil, antimicrobial, antioxidant, encapsulation.

## 1. Introdução

As espécies do gênero *Melaleuca*, pertencentes à família Myrtaceae, constituem-se em sua maioria de plantas arbóreas que se distribuem nas regiões subtropicais e tropicais. Tradicionalmente, são utilizadas por suas propriedades aromáticas e medicinais, em formulações cosméticas e farmacêuticas. Os óleos essenciais, extraídos de suas partes vegetativas, são ricos em mono e sesquiterpenos, responsáveis por sua atividade antimicrobiana e antioxidante (BROPHY; DORAN, 2004; RUDBÄCK et al., 2012). Também podem ser obtidos extratos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes (AL-ABD et al, 2015; SURH; YUN, 2012).

A presença desses compostos confere potencial para a utilização desse óleo como um conservante a ser utilizado em alimentos. Entretanto, o forte odor característico e a insolubilidade são fatores limitantes para sua aplicação. Uma alternativa para reduzir o forte odor dos óleos essenciais é o processo de desodorização por *winterização*. Nesse processo o óleo é resfriado a 6 °C, durante um período de 24 h, após é deixado em repouso de 6 a 8 h, ocorrendo a formação de cristais que são separados do óleo por filtração (LÓPEZ-MARTÍNEZ, CAMPRA-MADRID, GUIL-GUERRERO, 2004). Entretanto, a desodorização pode ocasionar redução dos compostos bioativos e com isto a redução das atividades antimicrobiana e antioxidante, assim, a tecnologia de encapsulação do óleo pode ser uma alternativa para minimizar esses problemas, visto que este processo pode potencializar as propriedades bioativas (SAGAVE et al., 2015).

Diversas metodologias podem ser utilizadas como método de encapsulação, dentre elas a coacervação simples. Essa técnica envolve um único polímero e ocorre pela remoção do solvente que envolve as moléculas do coloide, por meio do uso de outro composto que compete com o polímero pela água, como sais ou álcoois. Com a saída do solvente, as moléculas do polieletrólito se aproximam e formam aglomerados (VASILIU; POPA; RINAUDO, 2005).

A quitosana tem sido um dos principais materiais de parede utilizados na encapsulação de óleos (HSIEH; CHANG; GAO, 2006; RIBEIRO et al., 2013; ZHAVEH et al., 2015; KHALILI et al., 2015). É obtida, geralmente, a partir da

desacetilação da quitina em meio alcalino e sua estrutura é formada por unidades de  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-D-glucose e  $\beta$ -(1-4)-2-amino-D-glucose (ELSABEE; ABDU, 2013).

Apesar das características da quitosana possibilitarem seu uso como material encapsulante, quando utilizada isoladamente pode não apresentar as propriedades desejadas, limitando a sua utilização. A adição de um agente reticulante permite modificar as características do material de parede, como a solubilidade, digestibilidade, propriedades térmicas e mecânicas. O ácido tânico pode ser utilizado para este fim, pois interage com biopolímeros como a quitosana por interações não covalentes, como interações iônicas, hidrofóbicas e de hidrogênio, proporcionando uma estrutura mais rígida (SIONKOWSKA et al., 2015).

Assim objetivou-se com o estudo caracterizar o óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* e microencapsular em quitosana e ácido tânico pela técnica de coacervação simples a fim de avaliá-lo quanto a sua atividade antioxidante (*in vitro*) e antimicrobiana (*in vitro* e *in situ*).

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Material**

Na encapsulação foram utilizados o óleo desodorizado de *M. alternifolia* obtido por prensagem a frio (Distriol<sup>®</sup>), quitosana com 86,7% de desacetilação (Polymar<sup>®</sup>), e ácido tânico (Synth<sup>®</sup>). Reagentes PA foram empregados nas determinações analíticas.

### **2.2 Caracterização do óleo desodorizado de *M. alternifolia***

#### **2.2.1 Fenóis totais**

O teor total de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959). Para isto 3 g do óleo foi adicionado de 4 mL de água destilada e 250  $\mu$ L de solução de Folin-Ciocalteu 0,25 M, sendo posteriormente agitado, e deixado reagir por 3 min. Após, 500  $\mu$ L de carbonato

de sódio 1 M foi adicionado, deixado reagir por 2 h, sendo, posteriormente, realizado leitura em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) a 725 nm. Para a quantificação dos compostos fenólicos utilizou-se uma curva padrão preparada com ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg de ácido gálico (EAG).  $100\text{g}^{-1}$  de amostra.

### 2.2.2 Terpenos

A caracterização do óleo desodorizado de *M. alternifolia* foi realizada conforme metodologia proposta por Victoria et al. (2012) com algumas modificações, através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), em aparelho da marca Shimadzu GCMS QP 2010. Para isso dissolveu-se o óleo em acetato de etila e 1  $\mu\text{L}$  da diluição foi injetada no cromatógrafo. Utilizou-se uma coluna capilar e a temperatura programada foi de 60 °C aumentando 4 °C/min até atingir 220 °C, tendo como carreador o gás hélio (0,80 mL/min). Os compostos presentes no óleo foram identificados com base na comparação dos índices de retenção e espectro de massa deste com os padrões presentes na biblioteca NIST EP/EPA/MIH (NIST 05) do aparelho.

### 2.2.3 Atividade antimicrobiana

#### 2.2.3.1 Microrganismos

Para avaliar a atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão das espécies de bactérias *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832), e os gêneros de fungos *Trichoderma* spp. e *Rizhopus* spp.

#### 2.2.3.2 Bactérias

As bactérias eram mantidas sob congelamento em Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação dos microrganismos, as culturas congeladas mantidas em

glicerol foram transferidas, com o auxílio da alça de platina, para o caldo BHI, e então incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Em seguida, uma alçada do isolado foi transferida e estriada em placas contendo meios seletivos sendo Agar Padrão para Contagem (PCA) para *S. Typhimurium*, Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli*, Agar Palcam para *L. monocytogenes* e Agar Baird-Paker (BPA) para *S. aureus*, e incubadas por 24 h a 37 °C, para o isolamento das colônias. Das colônias que se desenvolveram nos meios, extraiu-se uma alçada e realizou-se a ressuspensão em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada em concentração 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **2.2.3.2.1 Disco difusão e difusão em Agar**

A atividade antibacteriana foi avaliada através do método de disco difusão e difusão em agar, de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (CLSI 2005).

Na técnica do disco difusão, a solução salina inoculada foi semeada através de espalhamento utilizando *swab* estéril na superfície de placas contendo Agar Muller-Hinton. Após absorção, adicionaram-se discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm contendo volumes equivalentes a 10 µL de óleo sobre o Agar, posteriormente, procedeu-se a incubação por 24 h a 37 °C e após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição utilizando paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros (mm).

Na técnica de difusão em Agar, quatro pequenos poços equidistantes (diâmetro 6 mm) foram feitos no centro das placas contendo Agar Muller-Hinton, após solução salina inoculada foi semeada através de *swab* estéril e 60 µL do óleo foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas a 37 °C e as leituras realizadas após 24 h de incubação. Após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição, utilizando paquímetro e sendo os resultados expressos em milímetros (mm).

### **2.2.3.2.2 Concentração Inibitória Mínima**

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações.

Na técnica de CIM foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, nestas acrescentou-se em cada poço 100  $\mu\text{L}$  de caldo BHI previamente inoculado, após foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de óleo em concentrações de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$ , 15  $\text{mg.mL}^{-1}$ , 150  $\text{mg.mL}^{-1}$  e 1500  $\text{mg.mL}^{-1}$  de óleo por mL de dimetilsulfóxido P.A., obtendo como concentração final de 0,75  $\text{mg.mL}^{-1}$ , 7,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ , 75  $\text{mg.mL}^{-1}$  e 750  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Em seguida procedeu-se a incubação por 24 h a 37 °C, e após, foi realizada leitura em espectrofotômetro (Biochrom EZ Read 400) a 650 nm. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura. Foi utilizado como branco BHI adicionado do óleo e das concentrações sem ser inoculado.

### **2.2.3.2.3 Concentração Bactericida Mínima**

Na técnica de CBM foram usados 10  $\mu\text{L}$  dos meios de cultura considerados com ausência de bactérias viáveis no teste de CIM, os quais foram semeados em placas de Petri contendo Agar BHI e incubados por 24 h a 37 °C. A CBM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

### **2.2.3.3 Fungos**

#### **2.2.3.3.1 Difusão em Agar**

A atividade antifúngica foi avaliada através da técnica de difusão em Agar, para isso, primeiramente, foi preparado o inóculo fúngico, realizado conforme metodologias descritas por Gurgel et al. (2005) e Fontenelle et al. (2007). As culturas dos fungos, separadamente, foram estriadas na superfície de placas de Petri contendo Agar Batata Dextrose (BDA) e incubadas a 25 °C por 5 dias.

Após a incubação, os cultivos fúngicos foram cobertos com 2 mL de solução salina estéril e com auxílio de alça microbiológica, foram realizadas raspagens da superfície de cada cultura, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões foram transferidas para tubos de ensaio estéreis vazios e deixados em repouso a 28 °C por 5 min. O sobrenadante dessas suspensões foi padronizado em 0,5 na escala de McFarland (que equivale  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

Cada inóculo fúngico padronizado foi estriado com o auxílio de um swab estéril na superfície de placas de Petri contendo Agar Batata Dextrose (BDA). Quatro pequenos poços equidistantes (diâmetro 6 mm) foram feitos no centro da placa e 60 µL do óleo foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas a 28 °C e as leituras feitas após 3, 5 e 8 dias de incubação.

Após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição utilizando paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros.

#### **2.2.4 Atividade antioxidante**

A análise da atividade antioxidante do óleo desodorizado de melaleuca foi realizada de acordo com metodologia proposta por Choi et al. (2002) com algumas modificações, utilizando o ensaio espectrofotométrico DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Para a realização da análise, o óleo foi diluído em diferentes concentrações (2000 µg.mL<sup>-1</sup>, 1500 µg.mL<sup>-1</sup>, 1000 µg.mL<sup>-1</sup> e 500 µg.mL<sup>-1</sup>) em DMSO.

As diferentes concentrações do óleo (10 µL) foram misturadas com uma solução de DPPH (990 µL), resultando em uma concentração final de DPPH de 85 µM. Esta mistura foi aquecida em banho-maria (30 °C) por 30 min na ausência de luz. A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente (AAKER SP1105) no comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH.

#### **2.3 Microencapsulação do óleo desodorizado de *M. alternifolia***

A microencapsulação foi realizada através do método de coacervação

simples. Para isto, uma solução de quitosana 5 % (p/v) foi preparada em 100 mL de solução de ácido acético 5% (v/v), após a dissolução, 1 mL do óleo desodorizado de *M. alternifolia* e quando previsto, 0,1 g do reticulante ácido tânico foram adicionados e homogeneizados. Em seguida, essa solução foi gotejada, em uma solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>, sob agitação de 15.500 rpm em Ultra Turrax (IKA T18 Basic), após as partículas formadas foram mantidas em NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup> por 30 min sob agitação para completa precipitação, posteriormente foram lavadas com água destilada até atingir pH 7,0 e secas a 30 °C sob vácuo (Vacuoterm 6030A) (SOUZA et al., 2005).

Outra metodologia foi avaliada, nesta após a precipitação e secagem das micropartículas de quitosana com óleo, houve a impregnação do reticulante ácido tânico, para isto as micropartículas permaneceram imersas em solução aquosa de ácido tânico (0,1 g de ácido tânico em 100 mL de água) por 24 hs, com subsequente lavagem e secagem, conforme descrito anteriormente.

Essas variações resultaram em três distintas micropartículas denominadas: 1) Quitosana e óleo desodorizado de *M. alternifolia* (QM); 2) Quitosana/ácido tânico e óleo desodorizado de *M. alternifolia* (QTM) e 3) Quitosana e óleo desodorizado de *M. alternifolia* impregnado com ácido tânico (QMIT). Para cada micropartícula havia um controle, que consistia no material de parede sem a presença do óleo.

As micropartículas foram armazenadas em temperatura de -10 °C.

### **2.3.1 Eficiência de encapsulação**

A eficiência da encapsulação (EE) dos compostos fenólicos foi realizada segundo o método descrito por Rutz et al (2013). Para realizar a quantificação dos compostos presentes na superfície, pesou-se 0,1 g das micropartículas, adicionou-se 5 mL de metanol, agitou-se em agitador vórtex por 10 s e centrifugou-se a 3420 x g por 10 min, sendo posteriormente recolhida a fração de metanol. Para a quantificação do total de compostos presentes dentro e fora das micropartículas, pesou-se 0,1 g das micropartículas, adicionou-se 5 mL de ácido clorídrico 0,1 M, para propiciar o rompimento das partículas. Ambas as frações recolhidas foram avaliadas quanto ao seu teor total de compostos

fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959), conforme descrito no item 2.2.1. A eficiência de encapsulação foi dada em porcentagem de compostos fenólicos, conforme equação 1.

$$EE(\%) = \frac{\text{Compostos fenólicos totais} - \text{Compostos fenólicos da superfície}}{\text{Compostos fenólicos totais}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

### 2.3.2 Comportamento térmico

A análise do comportamento térmico do óleo desodorizado de *M. alternifolia*, dos encapsulantes quitosana, quitosana e ácido tânico e das micropartículas foi realizada por Calorimetria Diferencial de Varredura em equipamento TA Instruments modelo DSC Q20. Para cada amostra, 5 mg foram aquecidos em recipientes de alumínio a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup> entre -25 °C e 300 °C, com um fluxo de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup> (RUTZ, et al. 2013).

### 2.3.3 Morfologia

A análise morfológica das micropartículas foi realizada com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss modelo DMS-940). As amostras foram fixadas em um suporte metálico com auxílio de uma fita dupla-face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro. A visualização foi realizada em aumentos de 500 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 kV.

### 2.3.4 Atividade antimicrobiana das micropartículas

A análise foi realizada conforme descrito no item 2.2.3, entretanto utilizou-se concentrações de 0,001 - 0,1 mg de micropartículas por mL de dimetilsulfóxido (DMSO).

### 2.3.5 Atividade antioxidante das micropartículas

A análise foi realizada conforme descrito no item 2.2.4, entretanto as concentrações utilizadas variaram de 500 - 2000 µg de micropartículas/mL de DMSO.

### 2.4 Atividade antimicrobiana *in situ*

A atividade antimicrobiana *in situ* foi realizada utilizando hambúrgueres como alimento teste. Esses foram preparados seguindo as recomendações de Terra (2005) com modificações. Utilizou-se a seguinte formulação: 40,5% de carne bovina, 13,5% de gordura suína, 20,3% de gelo, 20,3% de água gelada, 4,1% de proteína de soja texturizada e 1,4% de sal. Foram preparadas 3 formulações representando 3 tratamentos, todas as formulações receberam os ingredientes do hambúrguer já citados. A primeira formulação foi elaborada somente com os ingredientes já citados, a segunda teve a adição de 11,8% de óleo desodorizado de *M. alternifolia* e a terceira 0,002% de micropartículas de quitosana e óleo desodorizado de *M. alternifolia*. No final do preparo dos hambúrgueres foi adicionado 1 mL de inóculo de *E. coli* O157:H7 crescido em meio caldo Triptona de Soja (TSB) durante 24 h, contendo aproximadamente  $1,0 \times 10^3$  NMP. mL<sup>-1</sup>.

Primeiramente, a carne e a gordura suína separadamente foram cortados manualmente com o auxílio de uma faca, para em seguida serem moídos, através de um moedor de carne (Nobre BMC-05) com disco de 6 mm. A mistura obtida foi homogeneizada com a proteína de soja, que foi previamente hidratada e moída, juntamente, com o gelo, o inóculo e o óleo ou as micropartículas, conforme tratamento. Para modelar os hambúrgueres foi utilizado placas de Petri estéreis, após estes foram resfriados a 4 °C por até 15 dias. Foram retiradas amostras em quatro tempos distintos e avaliadas quanto a concentração de *E. coli*.

### 2.4.1 Enumeração de *E. coli*

Foi avaliada a concentração de *E. coli* O157:H7 nas amostras de hambúrgueres através da técnica do número mais provável (NMP) seguida da confirmação bioquímica através dos testes IMViC (indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato). Os procedimentos de amostragem, assim como as determinações microbiológicas, foram realizadas de acordo com as recomendações de Downes e Ito (2001) e Silva et al. (1997).

A enumeração de *E. coli* foi realizada em três tempos: no tempo 0 (retirada de amostra no dia da elaboração do hambúrguer), tempo 1 (após dois dias) e tempo 2 (após 7 dias).

As amostras de hambúrgueres foram homogeneizadas e diluídas até 1:1000 ( $10^{-3}$ ) com água peptonada estéril (1%) e através da transferência de 1 mL de cada diluição em triplicata foram inoculadas em série de nove tubos com Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST) com tubo de Duhran invertido, que foram incubados por 48 h a 37 °C. A partir de tubos de LST que apresentaram turvação e formação de gás após incubação transferiu-se uma alçada para tubos com Caldo *Escherichia coli* (EC), com tubo de Duhran invertido, estes foram incubados a 45,5 °C por 24 h.

A partir dos tubos que formaram gás no caldo EC transferiu-se uma alçada para Agar EMB e este foi incubado por 24 h a 37 °C. As colônias com morfologia típica de *E. coli* no Agar EMB foram transferidas para o Agar PCA e incubadas por 24 h a 37 °C. A partir desse ponto, a confirmação foi realizada através das reações bioquímicas IMViC (indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato). Os tubos de EC onde foi possível isolar colônias de *E. coli* foram contabilizados e avaliados pela Tabela NMP e o resultado foi expresso em NMP.g<sup>-1</sup>.

### 2.6 Análise estatística

Os resultados referentes a microencapsulação e atividade antioxidante foram submetidos à análise de variância e pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

A análise estatística dos resultados da atividade antimicrobiana *in situ* foi realizada através de uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Fishers da diferença mínima significativa - teste LSD ( $p < 0,05$ ).

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Fenois totais

O óleo desodorizado de *M. alternifolia* apresentou baixo teor de fenois totais ( $35,08 \pm 0,75$  mg GAE.100g<sup>-1</sup>), quando comparado com o óleo essencial de *M. alternifolia* (1,85 mg GAE.g<sup>-1</sup> que equivale a 185 mg GAE.100g<sup>-1</sup>) (MAZZARRINO et al, 2015). A composição fenólica também foi baixa quando comparada com extratos de folhas de *Melaleuca cajuputi* (55 mg GAE.mg<sup>-1</sup> que equivale a 5.500.000 mg GAE. 100g<sup>-1</sup>) (AL-ABD et al., 2015), de *Melaleuca diosmifolia* (42,7 mg GAE. g<sup>-1</sup> que equivale a 427 mg GAE.100g<sup>-1</sup>) e *Melaleuca armillaris* (39 mg GAE. g<sup>-1</sup> que equivale a 390 mg GAE.100g<sup>-1</sup>) (KUPPUSAMY et al, 2016). Essa redução no teor de compostos fenólicos totais pode ter ocorrido devido ao processo de obtenção do óleo (prensagem) ou ao processo de desodorização em que o óleo comercial foi submetido.

Por outro lado, a concentração observada no óleo desodorizado foi semelhante à encontrada no extrato de *Melaleuca leucadendron* (508,43 µg GAE.g<sup>-1</sup> que equivale a 50,8 mg GAE. 100g<sup>-1</sup>) (SURH; YUN, 2012) e alto quando comparado com o óleo essencial *Tetrastigma*, em que não houve a detecção de compostos fenólicos (HOSSAIN et al., 2011).

#### 3.2 Terpenos

Não foi detectada a presença de terpenos pela técnica utilizada. Esses compostos apresentam baixo peso molecular e, portanto, são voláteis (VIZZOTTO; KROLOW e WEBER, 2010), com isto, possivelmente tenham sido perdidos no processo de desodorização ou alternativamente, podem não ter sido extraídos na prensagem utilizada na extração do óleo.

O principal constituinte do óleo essencial de *M. alternifolia* é o terpinen-4-ol, como demonstrado por distintos trabalhos (JESUS; ELLENSOHN; BARIN,

2007; KIM et al, 2009; HAMMER, CARSON; RILEY, 2012; STOICA et al, 2015; MAZZARRINO et al, 2015). Para que esse óleo possa ser comercializado com a designação óleo essencial de *Melaleuca*, deve apresentar no mínimo 30% desse composto (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 2004), por isto que o óleo utilizado não se caracteriza como essencial.

Além do terpinen-4-ol, o óleo essencial de *M. alternifolia* também apresenta os compostos de 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineno e *p*-cimeno como majoritários (KIM et al., 2009).

### 3.3 Atividade antimicrobiana

#### 3.3.1 Bactérias

##### 3.3.1.1 Disco difusão, difusão em Agar, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

O óleo desodorizado de *M. alternifolia* apresentou atividade antimicrobiana contra *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, sendo os resultados dependentes da técnica utilizada, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana de óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* frente a *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

Microrganismos	DD*	DA*	CIM**	CBM**
<i>S. Typhimurium</i>	5,67	2,67	75	75
<i>E. coli</i> O157:H7	4,68	5,67	75	75
<i>L. monocytogenes</i>	0,50	ND	75	75
<i>S. aureus</i>	14,00	ND	75	75

DD – disco difusão; DA - difusão em Agar; CIM - concentração inibitória mínima; CBM - concentração bactericida mínima; ND - Não detectado; \*Halos de inibição em mm; \*\*Concentração em mg.mL<sup>-1</sup>;

Sugere-se que a ação antimicrobiana do óleo desodorizado de *M. alternifolia* possa ser decorrente da presença dos compostos fenólicos. Neste sentido Al-Abd et al (2015) verificaram correlação entre a atividade

antimicrobiana de extratos de *Melaleuca cajuputi* frente a *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, com compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato.

Pelas técnicas de disco difusão, CIM e CBM, não foi possível estabelecer uma relação entre a ação antimicrobiana do óleo e as características da parede celular do microrganismo. Já pela técnica de difusão em Agar, o efeito antimicrobiano do óleo desodorizado foi superior nos microrganismos Gram negativos. Helander et al. (1998) demonstraram que compostos fenólicos são capazes de desintegrar a membrana externa das bactérias Gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade citoplasmática ao ATP, o que ocasiona a morte celular.

Delfino et al. (2008) consideram que halos de até 4 mm são de fraca inibição ao microrganismo, halos de 5 a 9 mm de média inibição e maiores que 10 mm de forte inibição. Dessa forma, pode-se considerar que o óleo desodorizado de *M. alternifolia* apresentou forte inibição contra *S. aureus*, média inibição contra *S. Typhimurium* e *E. coli* O157:H7, e fraca inibição frente a *L. monocytogenes*.

Seguindo este mesmo critério, forte inibição foi observado por outros autores para o óleo essencial de *M. alternifolia* contra *E. coli* e *S. Typhimurium*, com halos de 14,4 e 14,5 mm, respectivamente (WILKINSON; CAVANAGH, 2005); óleo de *Melaleuca* comercial frente a *S. aureus* e *E. coli*, com halo de 10 a 60 mm (PACKER; LUZ, 2007) e óleo essencial de *M. alternifolia*, frente a *L. monocytogenes*, com halo de inibição  $\geq 12$  mm (MAZZARRINO et al., 2015).

No estudo realizado por Hammer e Heel (2012), a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia* frente a *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, foi justificada em função do óleo diminuir a polaridade e aumentar a permeabilidade da membrana, de maneira tempo e concentração dependente.

Pode-se observar na Tabela 1, que a concentração de óleo de 75 mg.mL<sup>-1</sup> ocasionou a inibição e a morte dos microrganismos estudados. De acordo com Aligiannis et al. (2001), CIM de até 500 µg de extrato ou óleo essencial por mililitro de diluente são inibidores potentes, entre 600 e 1500 µg.mL<sup>-1</sup> são inibidores moderados e acima de 1600 µg.mL<sup>-1</sup> são inibidores fracos. Dessa forma, seguindo os critérios de Aligiannis et al. (2001), pode-se

considerar que o óleo desodorizado de *M. alternifolia* seja um inibidor fraco frente as bactérias testadas.

Utilizando esta classificação, Al-Abd et al. (2015) demonstraram que extratos de folhas de *Melaleuca cajuputi* apresentaram inibição fraca (CIM de 12,5 mg.mL<sup>-1</sup>) frente a *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e CBM de 25 mg.mL<sup>-1</sup> para ambos.

De acordo com Cox et al. (2000), a exposição dos microrganismos ao óleo essencial de *M. alternifolia* inibi a respiração e aumenta a permeabilidade do citoplasma bacteriano, como indicado pela captação do iodeto de propídio. Para a *E. coli* e o *S. aureus* o óleo também causou perda de íons potássio.

Os resultados obtidos no presente estudo revelam o efeito inibitório do óleo desodorizado de melaleuca frente a *S. Typhimurium* e *E. coli O157:H7*, o qual é de grande relevância considerando o caráter patogênico destes microrganismos, sendo dois dos mais envolvidos em casos de doenças de origem alimentar em nível mundial.

### 3.3.2 Fungos

#### 3.3.2.1. Difusão em Agar

O óleo desodorizado de *M. alternifolia* não apresentou atividade antifúngica sobre espécies de fungos *Trichoderma* spp. e *Rizhopus* spp. Possivelmente, os compostos químicos presentes, não foram capazes de ocasionar a inibição ou destruição dos fungos avaliados ou alternativamente o óleo pode não ter penetrado na membrana plasmática dos fungos.

Na literatura foram encontrados poucos trabalhos sobre a atividade antifúngica do óleo ou extrato de melaleuca contra fungos filamentosos e não foram verificados trabalhos especificamente para os gêneros *Trichoderma* spp. e *Rizhopus* spp. Farag et al. (2004) obtiveram halos de inibição de 11,7, 14,7 e 18,3 mm frente a *Aspergillus niger* utilizando óleos essenciais de *Melaleuca ericifolia*, *Melaleuca leucadendron* e *Melaleuca armillaris*, respectivamente.

Por outro lado há muitos relatos disponíveis na literatura sobre a atividade frente a leveduras. Packer e Luz (2007) demonstraram que o óleo de *Melaleuca* apresentou atividade fungistática, sendo observado halo de inibição

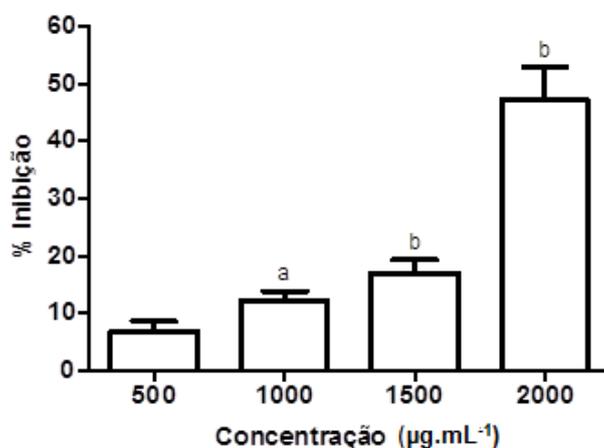
em relação à *Candida albicans* entre 10 e 60 mm. No estudo de Rosato et al. (2008) foi realizada a análise de disco difusão utilizando óleo essencial de *M. alternifolia* frente a diferentes gêneros de *Candida*, obtendo-se halos de inibição variando de 5,3 mm a 17 mm.

De acordo com Cox et al. (2000), o efeito antifúngico do óleo essencial de *M. alternifolia* sobre *Candida albicans* ocorre devido a este danificar a membrana plasmática da levedura e conseguir permeabilizar lipossomas multilamelares.

Provavelmente, a estrutura unicelular das leveduras permite uma ação mais efetiva dos óleos, enquanto que a estrutura dos fungos filamentosos formada na sua maioria por hifas e micélios, além de esporos, pode dificultar a ação antimicrobiana, podendo ser uma possível explicação para os resultados encontrados no presente estudo.

### 3.4 Atividade antioxidante

O óleo desodorizado de *M. alternifolia* apresentou atividade antioxidante como sequestrante de radicais DPPH a partir da concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), como pode ser observado na Figura 1. A inibição máxima ( $I_{\text{máx}}$ ), concentração de óleo que apresentou a maior inibição de radicais livres, foi de  $47,20 \pm 5,85\%$ .



**Figura 1.** Efeito do óleo desodorizado de *M. alternifolia* no ensaio DPPH. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro médio padrão. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , <sup>b</sup>  $p < 0,001$ , quando comparados ao controle.

A literatura contempla uma série de trabalhos que utilizaram extratos e óleo essencial de melaleuca, encontrando valores superiores ao do presente estudo, como Al-Abd et al. (2015) que utilizando extratos metanólicos de *Melaleuca cajuputi* de flores e folhas obtiveram porcentagem de inibição máxima de 81% e 75%, respectivamente na concentração 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

Extratos aquosos de *Melaleuca diosmifolia* e *Melaleuca armillaris* apresentaram porcentagem de inibição de 90% e 81,1%, respectivamente (KUPPUSAMY et al., 2016).

Rini, Ohtani e Ichiura (2012) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial obtido de folhas de *Melaleuca leucadendron*, alcançando 50% de inibição e obtendo média de IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% dos radicais presentes) de 8,05 mg.mL<sup>-1</sup>. De acordo com os autores a capacidade antioxidante do óleo pode ser atribuída à concentração do composto fenólico eugenol. Chabir et al. (2011) obtiveram valor de IC<sub>50</sub> ao avaliar o óleo essencial de *Melaleuca armillaris* de 2183,6 mg.L<sup>-1</sup>, sendo a atividade antioxidante atribuída pelos autores ao sinergismo de diferentes compostos, dentre eles, os monoterpenos, pois estes apresentam grupos de metileno fortemente ativados.

Baixos valores também foram encontrados na literatura. Surh e Yun (2012) ao avaliar a atividade antioxidante de extratos de *Melaleuca leucadendron* obtiveram valores de IC<sub>50</sub> 4,8 µg.mL<sup>-1</sup> e Wongsa, Chaiwarit e Zamaludiena (2012) que ao avaliarem extratos de *Allium sativum* e *Allium cepa* não obtiveram inibição do DPPH, ou seja, não apresentaram atividade antioxidante.

### **3.5 Microencapsulação do óleo desodorizado de *M. alternifolia***

#### **3.5.1 Eficiência de encapsulação**

Os resultados de eficiência de encapsulação do óleo desodorizado de *M. alternifolia* com quitosana e ácido tânico estão mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Eficiência de encapsulação (%) dos compostos fenólicos do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* com quitosana e ácido tânico pelo método de coacervação simples

Micropartículas	Eficiência de encapsulação (%)
QM	89,24±1,73 <sup>B</sup>
QTM	100,00±0,00 <sup>A</sup>
QMIA	98,64±0,91 <sup>A</sup>

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (P<0,05). Micropartículas: (QM) Quitosana e óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*; (QTM) Quitosana, ácido tânico e óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*; (QMIA) Quitosana e óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* impregnado com ácido tânico.

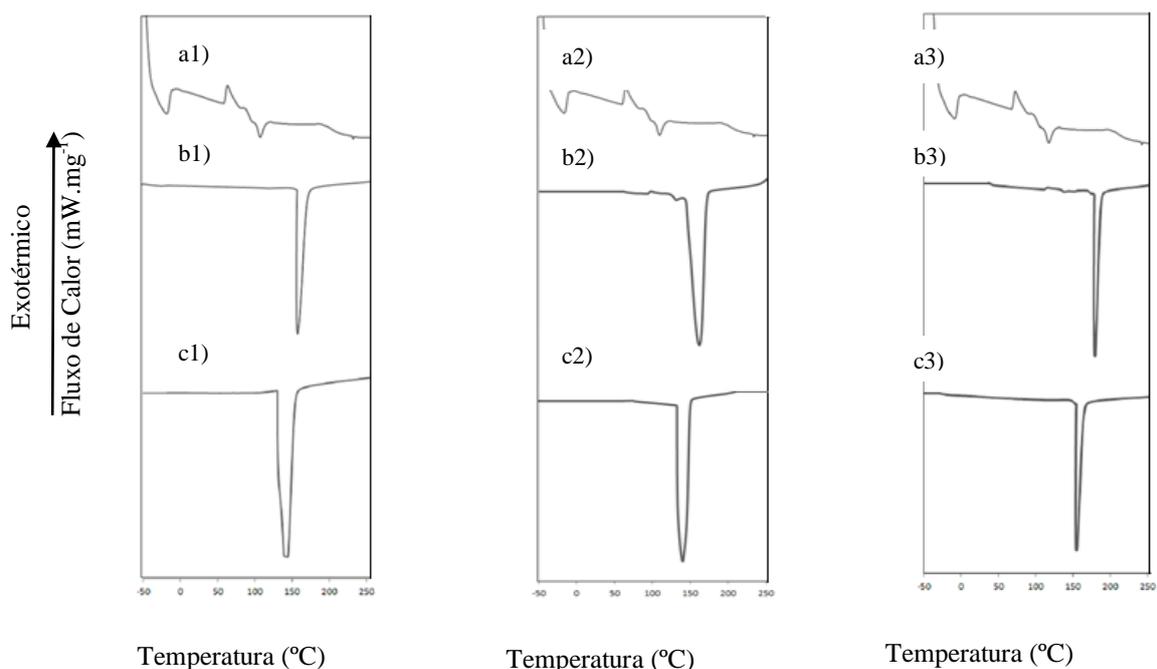
Verificam-se altos valores de eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos do óleo desodorizado de *M. alternifolia* nas matrizes avaliadas. Cabe ressaltar, que os valores próximos a 100% encontrados quando o ácido tânico foi utilizado podem ter sido influenciados por este composto, já que se trata de um composto fenólico.

A quitosana tem sido amplamente utilizada na encapsulação de óleos, sendo os valores dependentes da composição do óleo, da técnica utilizada na encapsulação e da presença ou não de reticulantes (KHALILI et al., 2015; ZHAVEH et al., 2015; FEYZIOGLU; TORNUK, 2016).

Os valores obtidos neste estudo são superiores aos encontrados por Pecarski et al. (2014) que avaliaram a eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos presentes no óleo essencial de tomilho com a utilização de quitosana pelo método de emulsão *cross-linking* e obtiveram variação de 77,89 a 85,56%, conforme tratamento.

### 3.5.2 Comportamento térmico

Pode-se observar no termograma de DSC do óleo desodorizado de *M. alternifolia* (Figura 2 - a1, a2, a3), eventos endotérmicos nas temperaturas de -5,34 °C e 114,85 °C e um pico exotérmico em 72,38 °C. O primeiro evento endotérmico pode estar relacionado à fusão do óleo e o segundo, a evaporação de água e substâncias voláteis. Já o evento exotérmico pode estar relacionado à degradação térmica do óleo (VIEIRA JÚNIOR et al., 2005).



**Figura 2.** Termogramas de DSC. a1, a2 e a3) óleo desodorizado de *M. alternifolia*; b1) quitosana; b2) quitosana e ácido tânico; b3) quitosana e ácido tânico por impregnação; c1) micropartículas de quitosana e óleo desodorizado de *M. alternifolia*; c2) micropartículas de quitosana, ácido tânico e óleo desodorizado de *M. alternifolia*; c3) micropartículas de quitosana e óleo desodorizado de *M. alternifolia* impregnado com ácido tânico.

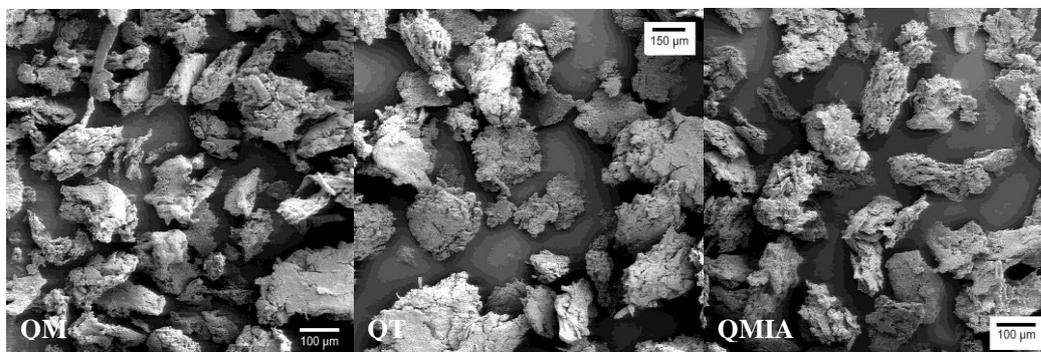
Picos endotérmicos foram visualizados nos termogramas dos materiais de parede, para a quitosana em 161,46 °C, quitosana e ácido tânico em 159,33 °C e quitosana impregnado com ácido tânico em 162,63 °C (Figura 2 - b1, b2, b3). Esses eventos são decorrentes da desidratação do material de parede (SANTOS et al., 2003; FEYZIOGLU; TORNUK, 2016).

Nos termogramas das micropartículas não se visualizou os eventos característicos do óleo desodorizado de *M. alternifolia*, apenas o deslocamento do evento endotérmico do material de parede, para temperaturas de 149,78 °C, 147,72 °C e 158,46 °C para micropartículas do óleo desodorizado de *M. alternifolia* com quitosana, quitosana e ácido tânico e quitosana impregnado com ácido tânico, respectivamente (Figura 2 - c1, c2, c3).

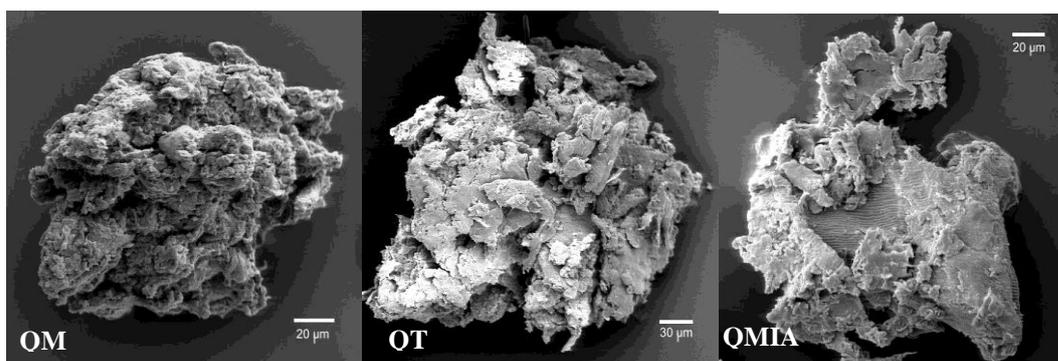
A ausência dos picos característicos do material encapsulado e ainda a ausência ou deslocamento do evento referente ao material de parede são indicativos de encapsulação e boa interação entre a substância ativa e o polímero encapsulante (FEYZIOGLU; TORNUK, 2016; RUTZ et al., 2016). O ácido tânico não influenciou nos resultados.

### 3.5.3 Morfologia

Independente do tratamento, as micropartículas apresentaram formato e superfície irregular com distintos tamanhos (Figuras 3 e 4).



**Figura 3.** Micrografia de MEV das micropartículas: (QM) Quitosana e óleo desodorizado de *M. alternifolia*; (QTM) Quitosana, ácido tânico e óleo desodorizado de *M. alternifolia*; (QMIA) Quitosana e óleo desodorizado de *M. alternifolia* impregnado com ácido tânico.



**Figura 4.** Micrografia de MEV das micropartículas: (QM) Quitosana e óleo desodorizado de *M. alternifolia*; (QTM) Quitosana, ácido tânico e óleo desodorizado de *M. alternifolia*; (QMIA) Quitosana e óleo desodorizado de *M. alternifolia* impregnado com ácido tânico.

O formato obtido pelas micropartículas é dependente do método de encapsulação, da técnica utilizada, dos compostos utilizados, assim como do método de secagem. Resultados semelhante foram obtidos por Guimarães et al. (2015) ao encapsular carvacrol oriundo do óleo essencial de orégano em  $\beta$ -ciclodextrina pela técnica de complexação de inclusão e Quispe-Condori, Saldaña e Temelli (2011) ao encapsular óleo de linhaça com zeína por liofilização e atomização. Por outro lado, Mishra et al. (2016) obtiveram partículas esféricas ao encapsular óleo de menta com quitosana pelo método de coacervação simples, utilizando concentrações distintas do material de parede e óleo as utilizadas neste estudo.

### 3.5.4 Atividade antimicrobiana das micropartículas

A CIM e a CBM foi  $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sendo a mesma para todos os tipos de micropartículas e microrganismos e expressivamente superior ao óleo desodorizado de *M. alternifolia*.

Realmente esperava-se com a encapsulação potencializar o efeito antimicrobiano do óleo. Pois a técnica de encapsulação pode propiciar a alteração da solubilidade do óleo, o que melhora a estabilidade e biodisponibilidade dos compostos, além de facilitar a penetração nas células dos microrganismos (ARANA-SÁNCHEZ et al., 2010).

Entretanto, os resultados do presente estudo mostram que o efeito antimicrobiano foi proveniente da presença da quitosana, já que não houve diferença no efeito entre as micropartículas com a presença do óleo e sem. Assim, a quitosana por ter apresentado uma potente inibição, pode ter mascarado o efeito do óleo. A propriedade antimicrobiana da quitosana foi observado por outros autores, como Coma, Deschamps e Martial-Gros (2003) frente a *S. aureus* e *L. monocytogenes*, Ignatova et al. (2009) frente a *S. aureus* e *E. coli* e Mellegård et al. (2011) frente a *E. coli*, *S. Typhimurium* e *Bacillus cereus*. Essa propriedade é justificada devido a interações iônicas entre grupos amino protonados da quitosana e seus derivados quaternizados e a superfície carregada negativamente das bactérias, o que ocasiona a perda da permeabilidade da membrana, vazamento e morte da célula microbiana (IGNATOVA et al., 2009).

Neste sentido, Duman e Kaya (2016) observaram que as micropartículas de óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. e quitosana apresentaram menor atividade antimicrobiana em relação àquelas constituídas por somente quitosana frente a diversas bactérias.

E por outro lado, Lins et al. (2016) demonstraram que sistemas coloidais utilizados para encapsular o óleo de essencial de *M. alternifolia* não foram eficazes em inibir o crescimento de *E. coli*, mesmo em concentrações superiores ao encontrado para CIM para o óleo, de acordo com os autores devido a presença de carga aniônica no sistema coloidal. Bacilos Gram-negativos e Gram-positivos apresentam cápsula com carga negativa, assim a

presença de carga negativa nos sistemas coloidais pode ter ocasionado repulsão iônica entre as cargas iguais na superfície das estruturas e das bactérias.

No presente estudo cabe destacar o efeito inibitório verificado para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *E. coli O157:H7* considerando o caráter patogênico destes microrganismos, sabendo-se que grande parte dos surtos de origem alimentar são causados por esses microrganismos e que *L. monocytogenes* é causadora de grave doença de origem alimentar. Entretanto, mais estudos são necessários devido ao efeito inibitório atribuído mais a quitosana do que ao óleo.

### **3.5.5 Atividade antioxidante das micropartículas**

No presente estudo as micropartículas não apresentaram efeito antioxidante no ensaio DPPH. Percentual de inibição foi observado por outros autores utilizando encapsulação de óleo essencial em quitosana, como Feyzioglu e Tornuk (2016) que obtiveram uma porcentagem de inibição do DPPH que variou de 43,66% a 56,99% utilizando óleo essencial de *Satureja hortensis L.* encapsulado com quitosana e Duman e Kaya (2016) utilizando micropartículas de quitosana contendo óleo essencial de coentro apresentaram 49,8% de inibição ao DPPH.

### **3.6 Atividade antimicrobiana *in situ***

A Tabela 3 apresenta os resultados das concentrações de *E. coli* em três formulações de hambúrgueres armazenados em temperatura de refrigeração. Na análise dos dados pode-se observar que houve redução da concentração de *E. coli* durante o armazenamento dos hambúrgueres, independente do tratamento. Diferenças significativas na contagem de *E. coli* foram observadas entre o tratamento controle e aquele adicionado de óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* em 2 e 7 dias. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em que o óleo e as micropartículas foram adicionados. Porém *in vitro*, as micropartículas desempenharam uma inibição mais acentuada.

**Tabela 3.** Médias das concentrações de *E. coli* em três formulações hambúrgueres armazenados em temperatura de 5 °C por até 7 dias.

Formulações	Tempo de armazenamento		
	T0 (0 dias)	T1 (2 dias)	T2 (7 dias)
F1 – Branco	35 NMP.g <sup>-1a</sup>	36 NMP.g <sup>-1a</sup>	28 NMP.g <sup>-1a</sup>
F2 – Óleo	28 NMP.g <sup>-1a</sup>	<3,0 NMP.g <sup>-1b</sup>	<3,0 NMP.g <sup>-1b</sup>
F3 – Cápsula	27 NMP.g <sup>-1a</sup>	21 NMP.g <sup>-1ab</sup>	23 NMP.g <sup>-1ab</sup>

F1 – formulação do hambúrguer que não recebeu inóculo, óleo ou micropartícula; F2 – formulação do hambúrguer que recebeu 11,8% de óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* por grama de hambúrguer; F3 - formulação do hambúrguer que recebeu 0,002% de micropartículas de óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* por grama de hambúrguer. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Pode-se observar que o branco se manteve dentro da legislação para hambúrgueres (RDC nº12), a qual preconiza o valor de  $5 \times 10^3$  NMP/g para coliformes termotolerantes, grupo no qual a *E. coli* está inclusa.

Apesar do óleo de *Melaleuca alternifolia* ter passado pelo processo de desodorização, o óleo ainda possui atividade antimicrobiana, entretanto, concentrações superiores são necessárias, quando comparado com outros óleos essenciais.

El Abed et al. (2014) observaram redução na concentração de *Listeria monocytogenes* quando utilizado 1% de óleo essencial de tomilho (*Thymus capitata*), em carne bovina armazenada por 10 dias a 7 °C. Hayouni et al. (2008) ao adicionar óleo essencial de salvia (*Salvia officinalis* L.) (1,5%) e aroeira-salsa (*Schinus molle* L.) (2%), observaram redução na concentração de *Salmonella* em carne bovina moída armazenada a 4 - 7 °C por 15 dias. Djenane et al. (2011) quando aplicaram óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (0,18 e 0,40%), murta-comum (*Myrtus communis*) (0,24 e 0,44%) e segulheira (*Satureja hortensis*) (0,10 e 0,20%), observaram inibição de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em carne bovina armazenada a 5 °C por 7 dias.

Em relação a utilização de micropartículas, Tao et al. (2014) também observaram redução na contagem de *E. coli* na presença de

microencapsulados de óleo de tomilho em  $\beta$ -ciclodextrina em lombo de porco cru até 5 dias de estocagem a 4 °C.

Apesar de não ter sido observado diferença estatística ( $p>0,005$ ) entre os valores de contagem de *E. coli* nos hambúrgueres com óleo e micropartículas, valores inferiores foram obtidos com o óleo, sendo assim, mais vantajosa a utilização direta do óleo, do que promover sua encapsulação.

A interação entre os componentes do hambúrguer e o óleo e as micropartículas pode influenciar no desempenho da atividade antimicrobiana. O óleo possui maior facilidade de interação com a carne devido a sua polaridade ser semelhante e dessa forma conseguir difundir-se com maior facilidade no produto (MORADI et al., 2011), já com as micropartículas essa interação pode ter sido reduzida. Cabe destacar também que foi utilizada uma menor concentração de micropartículas e que com o aumento desta poderia ser intensificado o resultado.

Pode-se destacar a atuação do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* frente a *E. coli*, visto que esta é uma bactéria Gram negativa muitas vezes utilizada como modelo de Gram negativo para estudos do efeito de substâncias antibacterianas (CAMPOS et al., 2006), dessa forma o óleo pode ser eficiente também frente outras bactérias Gram negativas. Além disso, essa bactéria pode acarretar doenças transmitidas por alimentos, levando a diarreia, vômito e outras complicações, sendo importante o seu controle para evitar contaminações (DJENANE et al., 2011).

Assim, em função da restrição da utilização de conservantes sintéticos como os sais de nitrato em produtos cárneos, devido á possibilidade de gerar efeitos tóxicos e carcinogênicos para a saúde humana (JAYASENA; JO, 2013), o uso de produtos naturais, que não confirmam alteração do sabor e odor, como a utilização do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* é uma excelente alternativa para promover a conservação de hambúrgueres.

#### **4 Conclusão**

O óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* apresentou baixo teor de compostos fenólicos e ausência de terpenos. Entretanto, apresentou atividade antibacteriana frente aos microrganismos testados, e ausência de atividade

antifúngica. Obteve-se alta eficiência de encapsulação do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* pela técnica de coacervação simples utilizando quitosana e ácido tânico, os resultados foram confirmados pela técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura. As micropartículas apresentaram formato irregular e tamanho distinto. As micropartículas apresentaram potente inibição frente aos microrganismos avaliados, devido a propriedade antimicrobiana da quitosana e baixa atividade antioxidante. Não foi observada influência quanto a presença do ácido tânico nas micropartículas. O óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* apresenta potencial de aplicação em hambúrguer em função de apresentar atividade antimicrobiana frente a *E. coli*.

## Referências

AL-ABD, N.M. et al. Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of *Melaleuca cajuputi* extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n. 385, 2015.

ALIGIANNIS, N, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

ARANA-SÁNCHEZ, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 585–590, 2010.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 02/01/2001. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BROPHY, J. J.; DORAN, J.C. Geographic Variation in Oil Characteristics in *Melaleuca ericifolia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 1, 2004.

- CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-27, 2009.
- CAMPOS, M. R. H. et al. Caracterização Fenotípica pelo Antibiograma de Cepas de *Escherichia coli* Isoladas de Manipuladores, de Leite Cru e de Queijo “Minas Frescal” em um Laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1221-1227, 2006.
- CHABIR, N. et al. Chemical Study and Antimalarial, Antioxidant, and Anticancer Activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm Essential Oil. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 11, p. 1383–1388, 2011.
- CHEN, M. et al. Facile fabrication of tea tree oil-loaded antibacterial microcapsules by complex coacervation of sodium alginate/quaternary ammonium salt of chitosan. **RSC Advances**, v. 6, p. 13032–13039, 2016.
- CHOI, C. W. et al. Antioxidant Activity And Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medicinal Plants And Flavonoids By Assay-Guided Comparison. **Plant Science**, v.163, p. 1161 – 1168, 2002.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana**. 6 ed. CLSI documento M07-A06. 23, 2, 2005.
- COMA, V.; DESCHAMPS, A.; MARTIAL-GROS, A. Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer—Antimicrobial Activity Assessment on Dairy-Related Contaminants. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 9, p. 2788-2792, 2003.
- COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170–175, 2000.
- DELFINO, T. P. C. **Sinergismo entre Substâncias Antimicrobianas e *Lactobacillus acidophilus* na Inibição de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella gallinarum***. 2008. 80 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”, 2008.

DJENANE, D. et al. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. **Food Science and Technology International**, v.17, n. 6, p. 505–515, 2011.

DOWNES, F. P., ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676p.

DUMAN, F.; KAYA, M. Crayfish chitosan for microencapsulation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.92, p. 125–133, 2016.

EI ABED , N. et al. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thymus capitata* Essential Oil with Its Preservative Effect against *Listeria monocytogenes* Inoculated in Minced Beef Meat. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-11, 2014.

ELSABEE, M. Z.; ABDOL, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, v. 33 p. 1819–1841, 2013.

Extract of *Melaleuca leucadendron* L. **Prev Nutr Food Sci.**, v. 17, p 22–28, 2012.

FARAG, R.S. et al. Chemical and Biological Evaluation of the Essential Oils of Different *Melaleuca* Species. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 30–35, 2004.

FEYZIOGLU, G. C.; TORNUK, F. Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. **Food Science and Technology**, v. 70, p. 104-110, 2016.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Antifungal activity of essential oils Croton species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n. 5, p. 1383-1390, 2007.

GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with b-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015.

GURGEL, L.A. et al. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal Ethnopharmacol**, v. 97, p. 409-412, 2005.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 909–915, 2012.

HAMMER, K. A.; HEEL, K. A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 239-245, 2012.

HAYOUNI, E. A. et al. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p. 242–251, 2008.

HELANDER L. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-positive bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.46, p. 3590-3595, 1998.

HOSSAIN, M. A. et al. In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n. 9, p.717-21, 2011.

HSIEH, W.; CHANG, C.; GAO, Y. Controlled release properties of Chitosan encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 209–214, 2006.

IGNATOVA, M. et al. Electrospun Non-Woven Nanofibrous Hybrid Mats Based on Chitosan and PLA for Wound - Dressing Applications. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, p. 102–111, 2009.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 2004. Disponível em <[http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=37033](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=37033)> Acesso em: 19 dezem. 2016

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agentes in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, p. 96-108, 2013.

JESUS; E. R.; ELLENSOHN, R. M.; BARIN, C. S. Óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia*: otimização do método analítico. **Unopar Científica Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 6, p. 67-72, 2007.

KHALILI, S. T. et al. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 502–508, 2015.

KIM, S. et al. Phase behavior, microstructure transition, and antiradical activity of sucrose laurate/propylene glycol/the essential oil of *Melaleuca alternifolia*/water microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 348, p. 289–297, 2009.

KUPPUSAMY, S. et al. Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. **Industrial Crops and Products**, v.83, p. 630–634, 2016.

LINS, R. F. et al. On the formation, physicochemical properties and antibacterial activity of colloidal systems containing tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 497, p. 271–279, 2016.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C.; CAMPRA-MADRID, P.; GUIL-GUERRERO, J. L.  $\gamma$ -Linolenic Acid Enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* Seed Oils and Fatty Acids by Low Temperature Crystallization. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 294–298, 2004.

MAZZARRINO, G. et al. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control**, v. 50, p. 794-803, 2015.

MELLEGÅRD, H. et al. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 48–54, 2011.

MIGLIATO, K. F. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farm. Bonaerense**, n.25, p. 310-314, 2006.

MISHRA, N. et al. Encapsulation of Mentha Oil in Chitosan Polymer Matrix Alleviates Skin Irritation. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 2, p. 482-492, 2016.

MORADI, M. et al. Effectiveness of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract impregnated chitosan film on ready-to-eat mortadella-type sausages during refrigerated storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2850–2857, 2011.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para Avaliação e Pesquisa da Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17, p. 102-107, 2007.

PECARSKI, D. et al. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan microparticles with thyme essential oil. **Hemijaska industrija**, v. 68, n. 6, p. 721–729, 2014.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDANA, F. T.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, p. 1880-1887, 2011.

RIBEIRO, W. L . et al. Activity of chitosan-encapsulated Eucalyptus staigeriana essential oil on *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v.135, n.1, p. 24-9, 2013.

RINI, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn. leaf oils. **Journal of Wood Science**, v. 58, p. 429–436, 2012.

ROSATO, A. et al. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 15, p. 635–638, 2008.

RUDBÄCK, J. et al.  $\alpha$ -Terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n.3, p. 713-21, 2012.

RUTZ, J. K. et al. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, taragums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrate Polymers**, v. 98 p. 1256– 1265, 2013.

RUTZ, J. K. et al. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324–333 2016.

SAGAVE, L. et al. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.1, p.221-226, 2015.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 296p.

SIONKOWSKA, A. et al. The influence of UV-irradiation on chitosan modified by the tannic acid addition, **Journal of Photochemistry and Photobiology.**, v. 148 p. 333-339, 2015.

SOUZA, T. C. R. et al. Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 5, 2005

STOICA, P. et al. Fabrication, characterization and bioevaluation of novel antimicrobial composites based on polycaprolactone, chitosan and essential oils. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 20, n. 3, 2015.

SURH, J., YUN, J. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Butanol Extract of *Melaleuca leucadendron* L. **Preventive Nutrition and Food Science**, v.17, p 22-28, 2012.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p. 63-68, 1959.

TAO, F. et al. Synthesis and characterization of b-cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 247-255, 2014.

TERRA, N. N. **Apontamentos em Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Editora da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2005. 216 p.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 5, p. 923-932, 2005.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, n. 50, p. 2668–2674, 2012.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium Heptaphyllum*: Isolamento, Caracterização Estrutural e Avaliação Das Propriedades Térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Documento 316**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010, 16 p.

ZHAVEH, S. et al. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Industrial Crops and Products**, v.69, p. 251–256, 2015.

WONGSA, P.; CHAIWARIT, J.; ZAMALUDIENA, A. *In vitro* screening of phenolic compounds, potential inhibition against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of culinary herbs in Thailand. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 964–971, 2012.

WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial Activity of Essential Oils from Australian Native Plants. **Phytother. Res.** v. 19, p. 643–646, 2005.

## 7 Considerações Finais

O óleo essencial de folhas e sementes de jambolão apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos. O óleo essencial de sementes apresentou como principal constituinte o  $\beta$ -cariofileno e não exibiu atividade antioxidante. Devido ao potencial antimicrobiano, os óleos essenciais de jambolão poderiam ser utilizados como conservantes naturais, para tanto análises *in situ* deveriam ser realizadas, bem como a análise antioxidante poderia ser realizada utilizando uma concentração maior de óleo essencial e também outro método de análise além do DPPH.

O óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* apresentou baixo teor de compostos fenólicos e ausência de terpenos. Exibiu uma atividade antimicrobiana somente em relação a bactérias, apresentando um bom desempenho *in situ*, possibilitando sua aplicação em hambúrgueres em função de apresentar atividade antimicrobiana frente a *E. coli*.

Obteve-se alta eficiência de encapsulação do óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia* pela técnica de coacervação simples utilizando quitosana e ácido tânico, os resultados foram confirmados pela técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura. As micropartículas apresentaram formato irregular e tamanho distinto. As micropartículas apresentaram potente inibição frente aos microrganismos avaliados, devido a propriedade antimicrobiana da quitosana e baixa atividade antioxidante. Não foi observada influência quanto a presença do ácido tânico nas micropartículas. Poderiam ser realizadas mais análises *in situ* em hambúrguer utilizando uma concentração maior de micropartícula, o que poderia potencializar seu efeito.

## Referencias

AL-ABD, N.M. et al. Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of Melaleuca cajuputi extract. **BMC Complement Altern Med.**, v.15, n. 385, 2015.

ALIGIANNIS, N, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, C. Q., et al. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *In vitro* em Substratos Orgânicas. **Quím. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, E. G. et al. Estudo Comparativo de Técnicas de *Screening* para Avaliação da Atividade Antibacteriana de Extratos Brutos de Espécies Vegetais e de Substâncias Puras. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARAÚJO, I. S. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Aromáticas que Ocorrem no Estado do Pará**. 2011. 103 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

ARANA-SÁNCHEZ, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 585–590, 2010.

AUMEERUDDY-ELALFIA, Z.; GURIB-FAKIMB, A.; MAHOMOODALLYA, F. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. **Industrial Crops and Products**, n. 71, p. 197–204, 2015.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A Review of its Phytochemical Constituents and Traditional Uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 240-246, 2012.

BACHIR, R. G.; BENALI, M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 9, p. 739–742, 2012.

BAKKALI, F., et al. Biological Effects of Essential oils – Review. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 446-475, 2006.

BARBOSA, M. M. C. **Identificação Sorológica e Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos em Amostras de Escherichia coli Isoladas de Peixes e Água de Pesque-pagues**. 2010. 50 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARROS, E.; MACHADO, A.; SPRINZ, E. **Antimicrobianos - Consulta Rápida**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 556 p.

BASTI, A. A.; MISAGHI, A.; KHASCHABIB, D. Growth Response and Modelling of the Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil, pH and Temperature on *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 973–981, 2007.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de Métodos para Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (Cim) de Extratos Vegetais Aquosos e Etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

BORGES, K. C. et al. Fresh and Spray Dried Pitanga (*Eugenia uniflora*) and Jambolan (*Syzygium cumini*) Pulp are Natural Sources of Bioactive Compounds with Functional Attributes. **Journal of Probiotics & Health**, v. 4, n. 2, 2016.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 5 ed. Brasília, 2010. 523 p.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras

do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, Brasília, D F, 09 abr. 1965.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 02/01/2001. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Alimentos Regionais Brasileiros**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 486 p.

BROPHY, J. J.; DORAN, J.C. Geographic Variation in Oil Characteristics in *Melaleuca ericifolia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 1, 2004.

BUKVIČKI, D. et al. Satureja horvatii essential oil: In vitro antimicrobial and antiradical properties and in situ control of *Listeria monocytogenes* in pork meat. **Meat Science**, v. 96, p. 1355–1360, 2014.

CABRAL, I. S. R., et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-27, 2009.

CAMPOS, M. R. H. et al. Caracterização Fenotípica pelo Antibiograma de Cepas de *Escherichia coli* Isoladas de Manipuladores, de Leite Cru e de Queijo “Minas Frescal” em um Laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1221-1227, 2006.

CARTAXO-FURTADO, N.A.D.E.O. et al. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, p.1091-1096, 2015.

CARVALHO, C. R. D. **Relação entre Parâmetros Ecofisiológicos e a Produção de Óleo Essencial em Espécies Arbóreas**. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2013.

CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M.; GRECO, D. P. Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemisiadracunculus Linn. (Asteraceae)*, variedade inodora – estragão - frente à *Salmonella sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.26, p. 75 - 79, 2006.

CASTRO, M. L., et al. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Quim. Nova**, v. 30, N. 7, p. 1512-1516, 2007.

CHABIR, N. et al. Chemical Study and Antimalarial, Antioxidant, and Anticancer Activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm Essential Oil. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 11, p. 1383–1388, 2011.

CHEN, M. et al. Facile fabrication of tea tree oil-loaded antibacterial microcapsules by complex coacervation of sodium alginate/quaternary ammonium salt of chitosan. **RSC Advances**, v. 6, p. 13032–13039, 2016.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant Activity And Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medicinal Plants And Flavonoids By Assay-Guided Comparison. **Plant Science**, v.163, p. 1161 – 1168, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana**. 6 ed. CLSI documento M07-A06. 23, 2, 2005.

COMA, V.; DESCHAMPS, A.; MARTIAL-GROS, A. Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer—Antimicrobial Activity Assessment on Dairy-Related Contaminants. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 9, p. 2788-2792, 2003.

COMIN, V. M. et al. Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Microbial Pathogenesis**, v. 93, p. 120-125, 2016.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170–175, 2000.

DELFINO, T. P. C. **Sinergismo entre Substâncias Antimicrobianas e *Lactobacillus acidophilus* na Inibição de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella gallinarum***. 2008. 80 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”, 2008.

DJENANE, D. et al. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. **Food Science and Technology International**, v.17, n. 6, p. 505–515, 2011.

DOWNES, F. P., ITO, H. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676p.

DUMAN, F.; KAYA, M. Crayfish chitosan for microencapsulation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.92, p. 125–133, 2016.

EHRENFRIED, C. A. et al. Composição química e atividade hipoglicemiante do óleo essencial das sementes de *Syzygium cumini* (Myrtaceae). **Sociedade Brasileira de Química**, São Paulo, v. 44, n. 48, p. 1, 2011.

EI ABED, N. et al. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thymus capitata* Essential Oil with Its Preservative Effect against *Listeria monocytogenes* Inoculated in Minced Beef Meat. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-11, 2014.

ELSABEE, M. Z.; ABDU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, v. 33 p. 1819–1841, 2013.

ESHWARAPPA, R. S.B. et al. Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts. **BiolImpacts**, v. 4, n. 2, p. 101-107, 2014.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

FAI, A. E. C., et al. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v.16, n.2, 2011.

FARAG, R.S. et al. Chemical and Biological Evaluation of the Essential Oils of Different *Melaleuca* Species. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 30–35, 2004.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FERRONATTO, R. et al. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais Produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharisuncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17, p. 224-230, 2007.

FEYZIOGLU, G. C.; TORNUK, F. Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidante delivery applications. **Food Science and Technology**, v. 70, p. 104-110, 2016.

FONTENELLE, R. O. S., et al. Antifungal activity of essential oils Croton species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n. 5, p. 1383-1390, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 606 p.

FRANCO, J., et al. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptuscinerea* F. Mull. exBenth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 15, p. 191-194, 2005.

FREIRE, F. C. O. et al. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007, 48 p.

FREY, M. D.; CORNEJO, L. Z.; DIAZ, P. M. Mucormicosis Cutânea En Un Paciente Inmunocomprometido. **Revista Chilena De Infectologia**, v. 29, n.1, p. 101-107, 2012.

FRIEDLY, E. C., et al. In Vitro Antilisterial Effects of Citrus Oil Fractions in Combination With Organic Acids. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, 2009.

GAVANJI, S., et al. Antimicrobial and Cytotoxic Evaluation of Some Herbal Essential Oils in Comparison With Common Antibiotics in Bioassay Condition. **Integrative Medicine Research**, n.3, p. 142–152, 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores De Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Quim. Nova**, vol. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONSALVES, J. K. M. C., et al. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, 2009.

GRBIĆ, M. L. et al. Inhibitory effect of essential oil from *Nepeta rtanjensis* on fungal spore germination. **Central European Journal of Biology**, v. 6, n. 4, p. 583–586, 2011.

GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with b-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015.

GURGEL, L.A. et al. In vitro antifungal activity of dragon"s blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal Ethnopharmacol**, v. 97, p. 409-412, 2005.

GUTIÉRREZ, D. et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and Analysis of Associated Bacterial Communities on Food Industry Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8547–8554, 2012.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 909–915, 2012.

HAMMER, K. A.; HEEL, K. A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 239-245, 2012.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HAYOUNI, E. A. et al. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects

against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p. 242–251, 2008.

HELANDER L. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-positive bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.46, p. 3590-3595, 1998.

HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 8, n. 5, p. 01-11, 2013.

HOSSAIN, M. A. et al. In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n. 9, p.717-21, 2011.

HSIEH, W.; CHANG, C.; GAO, Y. Controlled release properties of Chitosan encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 209–214, 2006.

IGNATOVA, M. et al. Electrospun Non-Woven Nanofibrous Hybrid Mats Based on Chitosan and PLA for Wound - Dressing Applications. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, p. 102–111, 2009.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 2004. Disponível em <[http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=37033](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=37033)> Acesso em: 19 dezem. 2016

JAMALIAN, A. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, n. 4, p.308-15, 2012.

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agentes in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, p. 96-108, 2013.

JESUS; E. R.; ELLENSOHN, R. M.; BARIN, C. S. Óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia*: otimização do método analítico. **UNOPAR CIENTÍFICA: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 6, p. 67-72, 2007.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, p. 65–87, 2011.

KAVOOSI, G. et al. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Carum copticum* Seed and *Ferula assafoetida* Latex. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 2, 2013.

KHALILI, S. T. et al. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 502–508, 2015.

KHAN, A.; JABEEN, K.; IQBAL, S. Antifungal activity of *Syzygium cumini* L. against *Rhizoctonia solani*. **Pure Appl. Biol.**, v. 5, n. 2, p. 193-199, 2016.

KIM, S. et al. Phase behavior, microstructure transition, and antiradical activity of sucrose laurate/propylene glycol/the essential oil of *Melaleuca alternifolia*/water microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 348, p. 289–297, 2009.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1997, 686 p.

KUPPUSAMY, S. et al. Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. **Industrial Crops and Products**, v.83, p. 630–634, 2016.

LINS, R. F. et al. On the formation, physicochemical properties and antibacterial activity of colloidal systems containing tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 497, p. 271–279, 2016.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, n. 55, p. 645–659, 2006.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C.; CAMPRA-MADRID, P.; GUIL-GUERRERO, J. L.  $\gamma$ -Linolenic Acid Enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* Seed Oils and Fatty Acids by Low Temperature Crystallization. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 294–298, 2004.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Composição Centesimal, Potencial Antioxidante e Perfil dos Ácidos Graxos de Sementes de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 2, p. 219-223, 2009.

MACHADO, A.; BARROS, E. **Antimicrobianos em Pediatria - Consulta Rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2006, 296 p.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* No Brasil: O Fungo e o Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, 2012.

MADIGAN, M. T., et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1126 p.

MARTUCCI, J. F. et al. Oregano and Lavender Essential Oils as Antioxidant and Antimicrobial Additives of Biogenic Gelatin Films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 205–213, 2015.

MAZZARRINO, G. et al. Salmonella enterica and Listeria monocytogenes inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control**, v. 50, p. 794-803, 2015.

MELLEGÅRD, H. et al. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 48–54, 2011.

MIGLIATO, K. F. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farm. Bonaerense**, n.25, p. 310-314, 2006.

MISHRA, N. et al. Encapsulation of Mentha Oil in Chitosan Polymer Matrix Alleviates Skin Irritation. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 2, p. 482-492, 2016.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

MONIRUZZAMAN, S. et al. Gas chromatography Mass Spectrometry Analysis and *In Vitro* Antibacterial Activity Of Essential Oil From *Trigonella Foenum-Graecum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 12, p. 1033–1036, 2015.

MORADI, M. et al. Effectiveness of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract impregnated chitosan film on ready-to-eat mortadella-type sausages during refrigerated storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2850–2857, 2011.

MORAIS, S. M. et al. Atividade Antioxidante de Óleos Essenciais de Espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORENO, S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 223–231, 2006.

MORTON, J. F. Jambolan. In: MORTON, Julia F. **Fruits of warm climates**. Miami: Universidade de Michigan, 1987. p. 375–378.

MUSSI, L. P. et al. Spouted Bed Drying Of Jambolão (*Syzygium cumini*) Residue: Drying Kinetics And Effect On The Antioxidant Activity, Anthocyanins and Nutrients Contents. **LWT - Food Science and Technology**, v.61, p. 80-88, 2015.

NEDOVIC, V. et al. An Overview Of Encapsulation Technologies For Food Applications. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1806-1815, 2011.

OETTERER, M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2006, 613 p.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para Avaliação e Pesquisa da Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17, p. 102-107, 2007.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of Natural Antimicrobials to Increase Antibiotic Susceptibility of Drug Resistant Bactéria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 164–168, 2010.

PECARSKI, D. et al. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan microparticles with thyme essential oil. **Hemijaska industrija**, v. 68, n. 6, p. 721–729, 2014.

- PENG, C., et al. Chemical Composition, Antimicrobial Property and Microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) Seed Essential Oil by Complex Coacervation. **Food Chemistry**, n. 165, p. 560–568, 2014.
- PEREIRA, M. C. et al. Inibição Do Desenvolvimento Fúngico Através da Utilização de Óleos Essenciais De Condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.
- PEREIRA, R. J. et al. Aspectos de Qualidade e Composição Centesimal dos Frutos de *Syzygium Cumini* (L.) Skeels e *Syzygium Paniculatum* Gaertn. **Cereus**, v. 7, n. 1, p. 60-74, 2015.
- PERES, N. D. et al. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.4, 2010.
- PÉREZ-LIMIÑANA, M. A. et al. Effect of the shell-forming polymer ratio on the encapsulation of tea tree oil by complex coacervation as a natural biocide. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 2, p. 176-183, 2014.
- PERRY, J. J. P.; FAN, L.; TAINER, J. A. Developing Master Keys to Brain Pathology, Cancer and Aging from the Structural Biology of Proteins Controlling Reactive Oxygen Species and Dna Repair. **Neuroscience**, v. 145, p.1280-1299, 2007.
- PONTES, W. J. T., et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopiasericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychusurticae* Koch). **Quím. Nova**, v.30, n.4, São Paulo, 2007.
- QUISPE-CONDORI, S.; SALDANA, F. T.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, p. 1880-1887, 2011.
- RAMOS, et al. **Antimicrobianos em Ginecologia e Obstetrícia**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 373 p.
- RASHID, S. et al. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 693–700, 2013.

REBELLO, F. F. P. Microencapsulação De Ingredientes Alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, p. 134-144, 2009.

REGUA-MANGIA, A. H. et al. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): Filotipagem e Resistência a Antimicrobianos em um Enteropatógeno Emergente. **Revista Patologia Tropical**, v. 38, n.1, 2009.

RIBEIRO, M. G. et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.5, 2006.

RIBEIRO, W. L. et al. Activity of chitosan-encapsulated Eucalyptus staigeriana essential oil on Haemonchus contortus. **Experimental Parasitology**, v.135, n.1, p.24-9, 2013.

RINI, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of Melaleuca leucadendron Linn. leaf oils. **Journal of Wood Science**, v. 58, p. 429–436, 2012.

ROSATO, A. et al. The inhibition of Candida species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 15, p. 635–638, 2008.

RUDBÄCK, J. et al.  $\alpha$ -Terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n.3, p.713-21, 2012.

RUFINO, M. S. M., et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza: EMBRAPA Comunicado Técnico 127, 2007, 4 p.

RUTZ, J. K. et al. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrate Polymers**, v. 98 p. 1256– 1265, 2013.

RUTZ, J. K. et al. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324–333 2016.

SAGAVE, L. et al. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.1, p.221-226, 2015.

SAITO, L. R. et al. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 3, 2009.

SAMARANAYAKE, L. **Fundamentos de Microbiologia e Imunologia na Odontologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012, 360 p.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SANTURIO, J. M., et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.803-808, 2007.

SARMA, A. D.; MALLICK, A. R.; GHOSH, A. K. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v.1, n. 3, p. 185-192, 2010.

SATISH, S.; RAGHAVENDRA, M. P.; RAVEESHA, K. A. Evaluation of the Antibacterial Potential of Some Plants Against Human Pathogenic Bacteria. **Advances in Biological Research**, v. 2, n. 3-4, p. 44-48, 2008.

SHAFI, P. M. et al. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, p. 414-416, 2002.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidante assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009.

SHARMA, S. B. et al. Ameliorative Effect of Active Principle Isolated from Seeds of *Eugenia jambolana* on Carbohydrate Metabolism in Experimental Diabetes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2011.

- SHINOHARA, S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1669-1674, 2008.
- SILVA, M. T. N. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 3, 2009.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 296p.
- SILVA-SANTOS, A., et al. Análise Técnica, Econômica e de Tendências da Indústria Brasileira de Óleos Essenciais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais Papel Virtual**, v. 8, n. 14, 2006.
- SILVEIRA, L. M. S., et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de Agar difusão. **Rev. Bras. Farma**, n.90, p. 124-128, 2009.
- SINGH, N.; GRUPTA, M. Effects os Ethanolic Extract of *Syzygium cumini* (Linn) Seed Powder on Pancreatic Islets of Alloxan Diabetic Rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, p. 861-867, 2007.
- SIONKOWSKA, A. et al. The influence of UV-irradiation on chitosan modified by the tannic acid addition, **Journal of Photochemistry and Photobiology.**, v. 148 p. 333-339, 2015.
- SOARES, J. J. **Avaliação da Atividade Antioxidante In vitro e In vivo de Extratos Preparados a Partir das Folhas de Syzygium cumini (L.) Skeels**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2013.
- SOUSA, C. M. M., et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, E. L. et al. Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 245-250, 2005.

SOUZA, P. F. et al. Atividade Antifúngica de Diferentes Concentrações de Extrato de Alho em Sementes de Ingá (*Inga edulis*). **Revista Verde**, Mossoró, v.5, n.5, p. 08 – 13, 2010.

SOUZA, T. C. R. et al. Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 5, 2005

STOICA, P. et al. Fabrication, characterization and bioevaluation of novel antimicrobial composites based on polycaprolactone, chitosan and essential oils. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 20, n. 3, 2015.

STRAUSS, G.; GIBSON S. M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 1, p. 81-89, 2004.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

SURH, J., YUN, J. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Butanol Extract of *Melaleuca leucadendron* L. **Preventive Nutrition and Food Science**, v.17, p 22-28, 2012.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p. 63-68, 1959.

TAO, F. et al. Synthesis and characterization of b-cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 247-255, 2014.

TASSOU, C. C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish filets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere on air. **Journal of Food Protection**, n. 59, p. 31-34, 1995.

TERRA, N. N. Apontamentos em Tecnologia de Carnes. São Leopoldo: Editora da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2005. 216 p.

UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4 ed. Campinas: UNICAMP, 2011, 161 p.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

VALGAS, C. et al. Screening Methods To Determine Antibacterial Activity Of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007

VANDEGAER, J. E. **Microencapsulation: Processes and Applications**. New York: Springer, 1974. 180 p.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 5, p. 923-932, 2005.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, n. 50, p. 2668–2674, 2012.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium Heptaphyllum*: Isolamento, Caracterização Estrutural e Avaliação Das Propriedades Térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

VIEIRA, R. C.; PEREIRA, I. O.; CHAVASCO, J. K. Avaliação “*In Vitro*” da Atividade Antimicrobiana da Benzidamina. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 9, n. 2, p. 171-181, 2011.

VIEIRA, T.R. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

VIZZOTTO, M., et al. Polpas de Frutas: Fontes de Compostos Antioxidantes. In: 4º Simpósio de Segurança Alimentar, 2012, Gramado. Anais eletrônico... Gramado: FAURGS-RS, 2012. Disponível em:<  
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/70976/1/0000000890-Polpas-Gramado-Marcia-e-Jair.pdf>> Acesso em: 08 nov. 2015.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Documento 316**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010, 16 p.

VIZZOTTO, M., PEREIRA, M. C. **Caracterização das Propriedades Funcionais do Jambolão**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 79. Pelotas: EMBRAPA, 2008. 27 p.

YANG, J. et al. Antioxidant properties of fermented soybean broth. **Food Chemistry**, v. 71, p. 249-254, 2000.

ZENG, W. C. et al. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oil from Pine Needle (*Cedrus deodara*). **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, 2012.

ZHAVEH, S. et al. Encapsulation of Cuminum cyminum essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Industrial Crops and Products**, v.69, p. 251–256, 2015.

WELLER, D. et al. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 286–292, 2015.

WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial Activity of Essential Oils from Australian Native Plants. **Phytother. Res.** v. 19, p. 643–646, 2005.

WONGSA, P.; CHAIWARIT, J.; ZAMALUDIENA, A. *In vitro* screening of phenolic compounds, potential inhibition against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of culinary herbs in Thailand. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 964–971, 2012.

YUN, J., et al. Natural surface coating to inactivate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and maintain quality of cherry tomatoes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, n. 16, p. 59–67, 2015.