

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE NUTRIÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Dissertação

**Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.): extração,
encapsulação, potencial antimicrobiano e antioxidante**

Marjana Radünz

Pelotas, 2017

MARJANA RADÜNZ

**Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.): extração,
encapsulação, 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 a obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora – Prof.^a Dr.^a Elizabete Helbig

Co-orientadores – Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

– Prof.^a Dr.^a Caroline Dellinghausen Borges

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R124o Radünz, Marjana

Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) : extração, encapsulação, potencial antimicrobiano e antioxidante / Marjana Radünz ; Elizabete Helbig, orientadora ; Eliezer Avila Gandra, Caroline Dellinghausen Borges, coorientadores. — Pelotas, 2017.

146 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. *Syzygium aromaticum*. 2. Encapsulação. 3. Antimicrobiano. I. Helbig, Elizabete, orient. II. Gandra, Eliezer Avila, coorient. III. Borges, Caroline Dellinghausen, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Aline Herbstrith Batista CRB: 10/1737

MARJANA RADÜNZ

Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.): extração,
encapsulação, 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 da defesa: 21 de fevereiro de 2017

Banca examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Elizabete Helbig (Orientadora). Doutora em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof^a. Dr^a. Nádia Carbonera. Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela
Universidade de Rio Grande.

.....
Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz. Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedico a minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Aos meus pais Sony e Leonida pelo apoio e incentivo nesta caminhada.

Ao meu irmão André pela ajuda e motivação.

Ao meu namorado Vinícius por aceitar minhas ausências, pela paciência e apoio neste período.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Elizabete Helbig por todas as contribuições, conhecimentos e auxílios.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra e Prof^a. Dr^a. Caroline Dellinghausen Borges pela atenção e aprendizado.

A Maria Luiza e a Paola pelas incontáveis horas de auxílio nas análises.

Ao Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi por disponibilizar o Laboratório de Cromatografia e os reagentes.

Ao Prof. Dr. Rogério Freitag por disponibilizar o uso do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais e a Ivandra pela ajuda durante o processo de extração.

As Prof^{as}. Dr^{as}. Nádia Carbonera e Simone Pieniz por aceitarem participar da banca.

A Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos pela possibilidade de realizar o mestrado.

A CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa

“Que seu remédio seja seu alimento, que seu alimento seja seu remédio”

(Hipócrates)

RESUMO

RADÜNZ, Marjana. Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.): extração, encapsulação, potencial antimicrobiano e antioxidante. 2017. 146 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Os potenciais efeitos cancerígenos da utilização de conservantes químicos sintéticos em alimentos torna necessária a busca por alternativas de substituição oriundas de produtos naturais, como os óleos essenciais obtidos na via secundária de plantas aromáticas e que apresentam potencial antioxidante e antimicrobiano frente a diversos microrganismos. Dentre estes, o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) ganha destaque devido à presença do eugenol em sua composição. Entretanto, os óleos essenciais apresentam forte odor para serem utilizados em alimentos e são sensíveis as condições ambientais. Neste contexto surge a encapsulação, que além de controlar o odor, promove uma maior proteção dos compostos presentes no óleo essencial. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi extrair, encapsular e avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano do óleo essencial de cravo-da-índia. Foi possível comprovar que o eugenol é o componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia, sendo possivelmente o principal responsável, juntamente com os demais terpenos pelo alto percentual de atividade antioxidante encontrado pelo método de captura de radicais livres (DPPH) e pela forte atividade bactericida *in vitro* frente a *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* e, *in situ*, frente a *S. aureus* em produtos cárneos análogos a hambúrgueres, sendo mais efetivo do que o conservante químico. A encapsulação do óleo essencial com alginato de sódio como material de parede isolado ou associado com emulsificantes monoestearato de glicerol e monolaurato de polioxietileno sorbitana possibilitou a obtenção de alta eficiência de encapsulação, a qual foi confirmada por Calorimetria Diferencial de Varredura. As partículas apresentaram baixo percentual de atividade antioxidante pelo método DPPH. Entretanto, apresentaram efeito inibitório superior de crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*, em relação ao óleo puro. Foi

possível observar efeito bactericida das partículas de alginato de sódio e óleo essencial para *S. aureus* e das partículas de alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial para *S. aureus* e *S. Typhimurium*. Quando avaliada a aplicação *in situ* das partículas em produtos análogos a hambúrgueres observou-se que estas permitiram o crescimento bacteriano, assim como o conservante químico nitrito. O óleo essencial de cravo-da-índia puro e encapsulado apresentou forte atividade antimicrobiana com potencial para controle microbiológico em alimentos em substituição a conservantes químicos.

Palavras-chaves: *Syzygium aromaticum*; encapsulação; antimicrobiano

ABSTRACT

RADÜNZ, Marjana. Essential oil of clove (*Syzygium aromaticum*, L.): extraction, encapsulation, antimicrobial potential and antioxidant. 2017. 146 f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

The potential carcinogenic effects of the use of synthetic chemical preservatives in food makes it necessary to search for substitute alternatives made of natural products, such as the essential oils obtained in the secondary pathway of aromatic plants and which have antioxidant and antimicrobial potential against different microorganisms. Among these, clove essential oil (*Syzygium aromaticum*, L.) is highlighted due to the presence of eugenol in its composition. However, essential oils have a strong odor, which makes them inadequate to be used in foods, and they are also sensitive to environmental conditions. In this context, encapsulation occurs, which, besides controlling the odor, promotes a greater protection for the compounds present in the essential oil. Thus, the objective of the present study was to extract, encapsulate and evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of clove essential oil. It was possible to prove that eugenol is the major component of clove essential oil, and it is possibly, along with the other terpenes, the main responsible for the high percentage of antioxidant activity found by the free radical capture method (DPPH) and for the strong bactericidal activity *in vitro* against *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. typhimurium* and, *in situ*, against *S. aureus* in meat products analogous to hamburgers, being more effective than the chemical preservative. The encapsulation of the essential oil with sodium alginate as wall material alone or associated with emulsifiers glycerol monostearate and polyoxyethylene sorbitan monolaurate made it possible to obtain high encapsulation efficiency, which was confirmed by Differential Scanning Calorimetry. The particles presented low percentage of antioxidant activity by the DPPH method. However, they showed superior inhibitory effect of *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. typhimurium*, in relation to the pure oil. It was possible to observe bactericidal effect

of the sodium alginate and essential oil particles for *S. aureus* and of the sodium alginate particles, glycerol monostearate and essential oil for *S. aureus* and *S. Typhimurium*. When evaluated in situ application of the particles in products similar to hamburgers it was observed that they allowed bacterial growth, as well as the chemical preservative nitrite. Pure and encapsulated clove essential oil had strong antimicrobial activity with potential for microbiological control in food as a substitute for chemical preservatives.

Keywords: *Syzygium aromaticum*; encapsulation; antimicrobial

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1** Fotos ilustrativas da árvore (a), folha (b) e cravo-da-índia em flor (c) e seco (d)21

Artigo

- Figura 1** Cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.).....98
- Figura 2** Comportamento térmico da partícula de alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.).....102
- Figura 3** Comportamento térmico da partícula de alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*,L.).....103
- Figura 4** Comportamento térmico da partícula de alginato de sódio, monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.).....104

Apêndices

- Figura 1** Microscopia eletrônica de varredura da partícula de alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) ampliada 50 (a) e 10000 (b) vezes.....145
- Figura 2** Microscopia eletrônica de varredura da partícula de alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) ampliada 50 (a) e 10000 (b) vezes145
- Figura 3** Microscopia eletrônica de varredura da partícula de alginato de sódio,

monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> , L.) ampliada 50 (a) e 10000 (b) vezes.....	146
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulações de produtos cárneos análogos a hambúrgueres.....	96
Tabela 2	Compostos presentes no óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> , L.).....	98
Tabela 3	Halos de inibição obtidos pelo método de disco difusão por aplicação de óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> , L.) frente às bactérias <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	99
Tabela 4	Concentração inibitória mínima do óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> , L.) frente às bactérias <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	99
Tabela 5	Concentração bactericida mínima do óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> , L.) frente as bactérias <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	100
Tabela 6	Eficiência de encapsulação (%) dos compostos fenólicos do óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> , L.) com alginato de sódio e diferentes emulsificantes.....	101
Tabela 7	Percentual de atividade antioxidante das partículas de alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia com diferentes emulsificantes.....	105
Tabela 8	Concentração inibitória mínima das partículas de óleo essencial de	

cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) frente às bactérias *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.....105

Tabela 9 Concentração bactericida mínima das partículas de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) frente às bactérias *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.....106

Tabela 10 Análise antimicrobiana *in situ* realizada em produtos cárneos análogos a hambúrgueres como alimento teste com adição de conservante nitrito e das amostras de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) puro e das partículas de óleo frente a *Staphylococcus aureus* em dois tempos distintos.....107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Celsius
µl	Microlitros
AMO	Partícula de alginato de sódio; monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia
AO	Partícula de alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia
ATO	Partícula de alginato de sódio, monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia
BHA	Brain Heart Infusion Agar
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Manual Clinical and Laboratory Standards Institute
Cm	Centímetros
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2-2-difenil-1-picril-hidrazil
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos

DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EE	Eficiência de encapsulação
bem	Eosina azul de metileno
eV	Elétrons-volts
FPPC	Formulação Padrão do Produto Carneio
G	Gramas
H	Horas
HEA	Agar entérico Hektoen
M	Metros
Mg	Miligramas
Microns	Micrometros
mL	Mililitros
Mm	Milímetro
Nm	Nanômetro
Rpm	Rotação por minuto
TSB	Caldo triptona de soja
Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitana
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	Introdução.....	17
2	Objetivos.....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	Hipóteses.....	20
4	Revisão bibliográfica.....	21
4.1	Cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i>, L.).....	21
4.2	Óleos essenciais.....	22
4.2.1	Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	23
4.2.2	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais.....	24
4.3	Encapsulação.....	25
4.4	Microrganismos de importância em alimentos.....	28

4.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	29
4.4.2 <i>Escherichia coli</i>	30
4.4.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	30
4.4.4 <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	31
5 Projeto de pesquisa.....	33
6 Relatório de campo.....	80
6.1 Amostra.....	80
6.2 Encapsulação.....	80
6.3 Atividade antimicrobiana	80
7 Artigo.....	82
8 Considerações finais.....	129
9 Referências bibliográficas.....	130
10 Apêndice.....	144
10.1 Apêndice A.....	145

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos ocorreu significativo aumento da preocupação da população em manter uma alimentação mais saudável, com a diminuição do consumo de produtos industrializados, principalmente, por estes apresentarem conservantes sintéticos com potencial carcinogênico. Esse dado foi confirmado pela Agência Internacional de Investigação do Câncer, órgão da Organização Mundial de Saúde (OMS) que concluiu que o consumo de carnes processadas por defumação e/ou cura aumentam o risco de aparecimento de cânceres (OMS, 2015).

Diante disso, a indústria tem se voltado para a busca de novas alternativas aos conservantes químicos tradicionalmente utilizados para o controle microbiano, como os sistemas naturais presentes em extratos e óleos vegetais (TASSOU et al., 1995; CARVALHO et al., 2006).

Os óleos essenciais também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, são compostos naturais, voláteis e complexos, oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Por isso, apresentam intenso odor e podem ser obtidos de folhas, flores e frutos, sendo utilizados em medicamentos e/ou alimentos (SILVA-SANTOS, 2006). Esses óleos podem apresentar componentes químicos que podem

inibir ou eliminar a presença de microrganismos (LANG; BUCHBAUER, 2012). Além da atividade antimicrobiana, podem apresentar atividade antioxidante que auxilia na eliminação dos radicais livres no nosso organismo (OLIVEIRA et al., 2009).

Dentre os óleos que apresentam comprovada atividade antimicrobiana e antioxidante, se encontra o óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.). As atividades antimicrobianas e antioxidantes desse óleo se devem a presença de eugenol, que atua como bactericida e como quelante de íon férrico e pela presença de compostos fenólicos que possuem atividade anti-radical livre e quelante de metais (BALASUNDRAM, 2006; CHAIEB et al., 2007). Ele apresenta ação frente a algumas das principais bactérias de importância em alimentos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*.

Entretanto, a eficácia de atuação das substâncias ativas dos óleos essenciais sobre os microrganismos e sobre os radicais livres pode ser influenciada por condições ambientais de temperatura, luz e oxigênio, assim, a encapsulação destes óleos é uma alternativa para proteger tais substâncias destes efeitos, minimizar odores, além de promover uma liberação controlada do composto ativo em locais específicos (NEDOVIC et al., 2011).

Apesar de diversos estudos realizarem extração e encapsulação de óleo essencial de cravo-da-índia, a utilização do alginato de sódio como material de parede para este processo ainda tem sido pouco estudada, principalmente, para fins alimentícios.

Diante do contexto exposto, a encapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia com alginato de sódio é uma alternativa para desenvolvimento de conservantes naturais com potencial antioxidante para a aplicação em alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Extrair e caracterizar o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.), encapsular e avaliar seu potencial antioxidante e antimicrobiano.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial de cravo-da-índia por hidrodestilação.
- Realizar a caracterização química do óleo essencial de cravo-da-índia.
- Determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia.
- Encapsular o óleo essencial de cravo-da-índia utilizando alginato de sódio e emulsificantes.
- Caracterizar as partículas quanto à morfologia, eficiência de encapsulação, comportamento térmico, atividade antimicrobiana e antioxidante.

- Aplicar o óleo e as partículas em um produto cárneo, a fim de avaliar seu potencial antimicrobiano *in situ*.

3 HIPÓTESES

Os óleos essenciais de cravo-da-índia puro possuem atividade antioxidante e antimicrobiana frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*.

A encapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia em alginato de sódio com a presença de emulsificantes potencializa a atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*, L.)

O craveiro da Índia é uma árvore pertencente à família Myrtaceae, nativa das Ilhas Molucas no Arquipélago da Insulíndia na Indonésia, podendo ser encontrada no Brasil, Haiti, Índia, Quênia, Madagascar, Malásia, Maurícia, México, Seychelles, Sri Lanka e Tanzânia em florestas com temperatura média de 25 °C, com solos profundos e ricos em húmus (ORWA et al., 2009).

No Brasil, é cultivado na região Nordeste do país, principalmente, no estado da Bahia, sendo cultivados 8000 hectares que produzem anualmente 2500 toneladas de cravo-da-Índia (CORTÉS-ROJAZ et al., 2014).

Sempre verde, o craveiro (Fig 1a) amadurece entre 8 e 10 anos após o seu plantio, ele apresenta copa alongada podendo alcançar de 8 a 10 m de altura com folhas (Fig 1b) ovais e aromatzadas. Seus frutos são do tipo drupa elipsoide, apresentam coloração avermelhada e seu botão floral seco (Fig 1c/d), chamado cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), quando pronto para a coleta possui cor vermelha e detém odor e sabor marcantes característicos em razão da presença de

ácido eugênico em sua composição, sendo amplamente utilizado na indústria como condimento e aromatizante (CHAIEB et al., 2007; ORWA et al., 2009; AFFONSO et al., 2012).

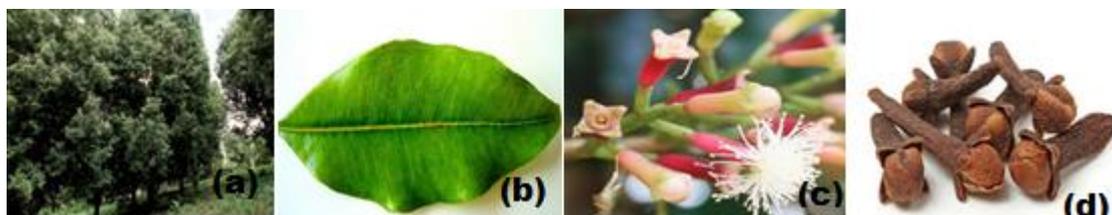


Figura 1. Fotos ilustrativas da árvore (a), folha (b) e cravo-da-índia em flor (c) e seco (d)

Popularmente, o cravo-da-índia é utilizado para tratamentos de dores de dente, asma, mau hálito, cicatrização e distúrbios alérgicos (ALMA et al., 2007). Seu óleo essencial é amplamente utilizado na aromaterapia e é constituído, principalmente, por eugenol, acetato de eugenol, β -cariofileno, trans-cariofileno e α -humuleno (OLIVEIRA et al., 2009; COSTA et al., 2011), sendo a composição química deste afetada pelos fatores genéticos, solo, clima e técnicas de cultivo.

Esses constituintes exercem ações antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas frente à *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica* e *Staphylococcus aureus* (CHAIEB et al., 2007), podendo ser utilizado na indústria como conservante de alimentos (SEBAALY et al., 2015).

Um estudo evidenciou a sua ação como anticarcinogênico, quimiopreventivo, antiagregante plaquetário e antitrombótico (COSTA et al., 2011).

O eugenol, componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia, bem como seus derivados, são utilizados em produtos de perfumaria, incensos, protetores solares, analgésicos, antisséptico, biocidas e como componentes de estabilizantes e antioxidantes para plásticos e borrachas (LEE; SHIBAMOTO, 2001).

4.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, são compostos naturais, voláteis e complexos, oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Apresentam intenso odor e podem ser obtidos de folhas, flores e frutos, sendo utilizados em medicamentos e/ou alimentos (PRINS et al., 2010). A

composição química destes pode ser influenciada pelo clima e solo dos locais de cultivo das plantas (OLIVEIRA et al., 2009).

A extração dos óleos essenciais pode ocorrer de diversas formas, como por prensagem a frio utilizada para a extração de óleos de frutos cítricos; a turbodestilação usada para se extrair o óleo de plantas, cujos tecidos retém a seiva de forma mais intensa; a *enfleurage* utilizada na extração de óleos mais instáveis de pétalas de flores e que podem perder seus compostos aromáticos se extraídos por outros métodos; o uso de gás refrigerante que utiliza uma substância química que tem afinidade com as moléculas constituintes do óleo essencial, agindo como solvente; e o uso de dióxido de carbono supercrítico sob extrema pressão (200 atm) e temperatura mínima de 30 °C para extração do óleo. Entretanto, a principal forma de extração é a hidrodestilação, onde a matéria-prima vegetal é completamente mergulhada em água, sem que a temperatura ultrapasse os 100 °C (BAKKALI et al., 2008).

4.2.1 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Os antioxidantes são substâncias que apresentam a capacidade de retardar o surgimento de alterações oxidativas. A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células, mas também produz radicais livres, que promovem o estresse oxidativo, predispondo o aparecimento de doenças crônicas e degenerativas. Estudos sugerem que a utilização de antioxidantes fenólicos de frutas, hortaliças e cereais atuam sobre os radicais livres diminuindo a incidência do aparecimento dessas doenças (ROESLER et al., 2007).

Os antioxidantes apresentam dois mecanismos de ação: os primários interrompem a cadeia da reação ao doarem elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, transformando-os em produtos termodinamicamente estáveis ou reagem com radicais livres formando um complexo lipídio-antioxidante que pode exercer reação com outro radical livre, enquanto os secundários retardam o início da autooxidação por meio de sequestro de oxigênio, de complexação de metais, de absorção de

radiação ultravioleta, de decomposição de hidroperóxidos ou desativação de oxigênio singlete (ANGELO; JORGE, 2007).

O óleo essencial de cravo-da-índia apresenta forte ação antioxidante devido à presença majoritária de eugenol (C₁₀H₁₂O₂), que atua como quelante de íon férrico, resultando na prevenção de formação dos radicais hidroxila (CHAIEB et al., 2007), os compostos fenólicos também promovem atividade antioxidante ao cravo-da-índia, entretanto ainda não há um esclarecimento em relação ao seu mecanismo *in vivo* (AFFONSO et al., 2012).

4.2.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Os compostos antimicrobianos são substâncias que podem eliminar ou impedir o desenvolvimento dos microrganismos, podendo ser sintéticos ou naturais oriundos de bactérias ou fungos. A maioria das plantas também sintetizam compostos antimicrobianos que os protegem de microrganismos (RAMOS et al., 2007).

Os componentes hidrofóbicos são responsáveis pela ação antimicrobiana dos óleos essenciais, pois ocasionam o rompimento de lipídios da membrana, levando a perda da funcionalidade, entretanto altas doses podem tornar o produto sensorialmente intolerável, sendo necessário realizar estudos para avaliar as concentrações mais baixas de óleos que promovam a inibição da multiplicação destes microrganismos (FORSYTHE, 2010).

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).

A avaliação mais comum do efeito antimicrobiano de óleos essenciais é realizada por meio do método de disco-difusão. Esse método se baseia na difusão da substância a ser analisada em meio sólido contendo o microrganismo. Após a difusão, há o surgimento de um halo de inibição em que não ocorre o desenvolvimento microbiano, sendo considerado 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 distingue o tipo de método de difusão, o mais comum é o disco difusão (SILVEIRA et al., 2009).

A resistência dos microrganismos pode ser medida por meio de metodologias como a concentração inibitória mínima que é definida como a menor quantidade de agente antimicrobiano necessária para inibir o desenvolvimento do microrganismo e a determinação da concentração bactericida mínima que é definida como a menor quantidade de antimicrobiano necessário para eliminar o microrganismo, 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; BARROS, 2006).

Para promover o controle microbiológico em produtos cárneos a indústria utiliza conservantes químicos sintéticos como o nitrito, além disso promove melhoramento no aspecto de sabor e cor, entretanto, por promover a formação de nitrosaminas apresenta potencial carcinogênico (MARTINS, GRANER, 2008; SINDELAR, MILKOWSKI, 2011).

Em razão disto, a utilização dos conservante naturais tem sido estudada. Os óleos essenciais de cravo-da-índia apresentam atividade antimicrobiana comprovada frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (CORTÉS-ROJAS et al., 2014), essa ação se deve a presença do eugenol, constituinte majoritário do cravo-da-índia (SCHERER et al., 2009).

4.3 Encapsulação

A encapsulação é definida como um processo em que ocorre a retenção de uma substância, óleo essencial, por exemplo, dentro de outra, denominada cápsula, a qual pode ser consumida (NEDOVIC et al., 2011).

As cápsulas podem ser divididas em três grupos de acordo com seu tamanho: 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).

A técnica de encapsulação minimiza as interações da substância que forma o núcleo com o ambiente; reduz a velocidade de evaporação ou de transferência dos 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 et al., 2008).

Para a formação das partículas é necessária a presença de um material de parede. Diversas substâncias podem ser utilizadas como material de parede, 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), lipídios (ácido esteárico, cera, óleos e gorduras hidrogenadas, monoglicerídeos e diglicerídeos, parafina, triestearina), proteínas (albumina, caseína, gelatina, glúten), dentre outras (SUAVE et al., 2006).

Dentre esses, destaca-se o alginato de sódio ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$), um copolímero linear constituído de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4, sintetizado por algas marrons encontradas em regiões costeiras do mar. Esse polímero apresenta propriedades de gelificar e espessar soluções, em função disto, é amplamente utilizado na indústria para produção de sorvetes, cervejas, misturas para bolo, sucos, filmes bioativos para aplicação em alimentos, além da aplicação em tintas e papeis. Entretanto, para melhorar a eficiência de encapsulação do alginato de sódio, pode-se utilizar emulsificantes, como o monoestearato de glicerol – Atmul 84 (BHL 3,8) e o monolaurato de polioxietileno sorbitana – Tween 20 (BHL 16,7) (ARAÚJO, 2004).

O monoestearato de glicerol ($\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_4$) consiste em uma mistura de monoacilgliceróis contendo variadas quantidades de diacilgliceróis e triacilgliceróis, obtidos por esterificação da glicerina pelo ácido esteárico ou por glicerólise parcial dos óleos vegetais contendo triacilgliceróis dos ácidos palmítico e esteárico, sendo utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002).

O monolaurato de polioxietileno sorbitana ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$) é um tensoativo hidrofílico composto por ésteres de sorbitana etoxilados. É muito utilizado em

cremes, loções, shampoos infantis, pois estabiliza as formulações por ser detergente não iônico que quebra a tensão superficial facilitando a dispersão dos produtos químicos (HUNZICKER, 2009).

Dentre as metodologias utilizadas para a encapsulação destacam-se os processos de atomização, extrusão, leite fluidizado, coacervação, secagem em tambor, liofilização, gelificação iônica, inclusão molecular e inclusão em lipossomas (AZEREDO, 2005).

A encapsulação com a utilização de alginato, cloreto de sódio e emulsificantes tem sido classificada, de acordo com diferentes autores, por distintos métodos: coacervação simples (MÜLLER, 2011), gelificação iônica (NATRAJAN et al., 2015) e emulsificação quando há a presença de emulsificante (GHAYEMPOUR; MORTAZAVI, 2015).

A coacervação é caracterizada pela 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 simples envolve um único polímero e é caracterizada pela separação da fase líquida através da adição de um eletrólito (sal ou álcool) que compete pela água à solução coloidal (VASILIU et al., 2005).

O processo de encapsulação de compostos por gelificação iônica consiste no gotejamento de uma solução polimérica contendo nutrientes em uma solução iônica, é um processo simples e de baixo custo que permite a formação de cápsulas de diferentes formas e tamanhos (WILLAERT; BARON, 1996). Quando o encapsulante, como por exemplo, o alginato de sódio que possui cadeias lineares hidrossolúveis, entra em contato com os íons metálicos como os do cloreto de cálcio, ocorre uma ligação entre as cadeias lineares formando uma gelatina insolúvel (WILLAERT; BARON, 1996; PASQUALIM et al., 2010).

Já a encapsulação por emulsificação envolve a mistura de componentes oleosos e aquosos na presença de um emulsificante. A adsorção do emulsificante

na interface reduz a tensão superficial, o que leva a formação de uma emulsão com o auxílio de agitação (GHAYEMPOUR; MORTAZAVI, 2015).

Soliman et al. (2013) avaliaram a encapsulação de distintos óleos essenciais utilizando alginato de sódio pelo método de emulsificação. As partículas apresentaram alta eficiência de encapsulação (90-94%) e promoveram a inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides*. No estudo realizado por Ghayempour e Mortazavi (2015), o óleo essencial de hortelã-pimenta foi encapsulado utilizando alginato de sódio pelo método de emulsificação. Os resultados demonstraram que o método de agitação, a concentração do polímero, assim como o emulsificante e a quantidade deste, são fatores que influenciam no tamanho das partículas.

O estudo de Natrajan et al. (2015) que objetivou encapsular óleo essencial de açafrão e óleo essencial de capim-limão com alginato de sódio pelo método de gelificação iônica obteve eficiência de encapsulação de 71% para o óleo de açafrão e de 86,9% para o de capim-limão e sugeriu que o alginato de sódio pode ser um bom encapsulante de compostos bioativos.

A encapsulação de óleo essencial de laranja com alginato de sódio pelo processo de coacervação apresentou eficiência de 99% e manutenção do conteúdo de óleo preservado por até 5 meses, segundo o estudo de Müller (2011).

4.4 Microrganismos de importância em alimentos

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são causadas devido a ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos, sendo estes bactérias, fungos e vírus (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003).

Os sintomas mais comuns são dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre que tem duração influenciada pelo sistema imunológico do indivíduo, o tipo de bactérias e a quantidade de toxina presente no alimento consumido (OLIVEIRA et al., 2010).

Segundo dados do Ministério da Saúde, as bactérias são causadoras de 90% dos surtos de DTA registrados entre 2007 a 2016 no Brasil, sendo as três principais *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2016).

Enquanto a *Listeria monocytogenes* causa sérios danos e apresenta uma taxa de mortalidade entre 20 e 30% (BUCHANAN et al., 2004).

Em razão destas pesquisas para o desenvolvimento de produtos naturais com ação antimicrobiana frente a estas bactérias se tornam necessárias, como os óleos essenciais que podem inibir vários sistemas enzimáticos das bactérias, inclusive os responsáveis pela produção de energia celular e na síntese de compostos estruturais, interferindo na divisão celular da bactéria (FREIRE et al., 2011).

4.4.1 *Staphylococcus aureus*

São bactérias Gram-positivas no formato de cocos medindo entre 0,5-1,5 µm de diâmetro, não são móveis nem formam esporos. Podem estar sozinhas, em pares, em cadeias curtas ou reunidas em formato de cacho de uva devido a divisão celular que é feita em três planos perpendiculares (SANTOS et al., 2007).

Estão presentes, naturalmente, na pele e no trato respiratório superior das pessoas, consistindo em um microrganismo oportunista. Apresenta facilidade no desenvolvimento em alimentos e capacidade de produzir toxinas termorresistentes (enterotoxinas), levando a intoxicação alimentar, que causa náuseas, diarreia e vômitos dentro de uma a seis horas (MADIGAN et al., 2010). Pode causar também 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).

A contagem de *S. aureus* permitida em produtos cárneos pela legislação é de até 10^{-3} UFC/g (BRASIL, 2001). Segundo dados do Ministério da Saúde 7,6% dos casos de doenças transmitidas por alimentos notificados entre 2000 e 2015 foram causados por *S. aureus*, perdendo apenas para *Salmonella spp.*, sendo que a ingestão de produtos cárneos contaminados corresponde a 7,7% dos casos onde foi possível se identificar (Brasil, 2015)

Vários estudos observam a ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia (PEREIRA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2013; BERALDO et al., 2013), canela e manjerona frente a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (FREIRE et al., 2011).

4.4.2 *Escherichia coli*

São bactérias Gram-negativas encontradas na microbiota entérica de animais (CAMPOS et al., 2006).

Escherichia coli entero-hemorrágica tem a capacidade de produzir uma toxina quando se aloja no intestino chamada de verotoxina, que causa desde uma diarreia sanguinolenta até uma insuficiência renal. *Escherichia coli* entero-toxigênica causa uma infecção entérica que leva a diarreia aquosa, principalmente, em pessoas que estão viajando, já que os habitantes locais tendem a estar imunes à bactéria. A *Escherichia coli* entero-patogênica não é invasiva nem produz toxinas e está envolvida com casos de diarreia infantil e em bebês. *Escherichia coli* entero-invasiva causa doença invasiva do cólon, sendo responsável por diarreia aquosa, que por vezes pode ser sanguinolenta (MADIGAN et al., 2010). A *Escherichia coli* entero-agregativa (EAEC) causa diarreia aguda e persistente que ocorre, principalmente, em crianças de países em desenvolvimento (REGUA-MANGIA et al., 2009).

Escherichia coli de aderência difusa 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 (SERVIN, 2005).

Estudos apontam que os óleos essenciais de cravo-da-índia, canela, anis e manjerona apresentam atividade antimicrobiana moderada a forte frente à *Escherichia coli* (PEREIRA et al., 2008; SCHERER et al., 2009; SILVA et al., 2009; FREIRE et al., 2011).

4.4.3 *Listeria monocytogenes*

São bactérias Gram-positivas que apresentam formato de bastonetes curtos e cocobacilos de 0,5 µm de largura e 1-1,5 µm de comprimento com tendência de formação de cadeias com três a cinco células. São aeróbias facultativas, não formam esporos e não apresentam capacidade de produzir gás, mas produzem catalase e ácido a partir da glicose (MADIGAN et al., 2010).

Listeria monocytogenes pode causar infecção no ser humano e em animais (LIU, 2006). Apresentam alta resistência frente a alterações de concentração de sal, pH e temperatura, podendo ser encontradas em diferentes ambientes como em

alimentos, água, efluentes e solo. Pode se multiplicar em ambientes hostis sob temperaturas de refrigeração (2 °C – 4 °C) (PERES, 2010), causando a listeriose que pode levar a aborto, septicemia e meningite em grupos mais susceptíveis (FAI et al., 2011).

Segundo a literatura diversos óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana frente a *Listeria monocytogens*, entre eles os óleos essenciais de *Cinnamomum cássia*, *Cinnamomum verum* e cravo-da-índia (OUSSALAH et al., 2007; SCHERER et al., 2009).

4.4.4 *Salmonella* Typhimurium

São bactérias gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae, se apresentam na forma de bastonetes, movidas por flagelos peritríquios e não fermentam lactose (SHINOHARA et al., 2008).

É responsável por intoxicações alimentares graves como a salmonelose que causa diversos surtos, apresenta alta morbidade e dificuldade de medidas de controle, os principais sintomas são infecções gastrointestinais, diarreia, vômitos, febre baixa e dores abdominais causada pelo consumo de carne bovina, ovina, suína, de aves e ovos contaminados (SHINOHARA et al., 2008).

A *Salmonella typhi* causa febre tifoide e é transmitida por meio do consumo de água e alimentos contaminados com fezes humanas, causa septicemia, diarreia, vômitos e febre alta (CONNOR; SCHWARTZ, 2005).

A *Salmonella paratyphi* causa febre entérica sendo causada pelo consumo de leite, mariscos, ovos e vegetais crus contaminados, provocando gastroenterite, febre, vômitos e septicemia (CONNOR; SCHWARTZ, 2005).

A *Salmonella* Typhimurium causa surtos mais comumente em crianças e apresenta grande resistência aos principais antibióticos utilizados no seu tratamento (SHINOHARA et al., 2008).

Estudos apontam que os óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano, alecrim e canela atuam na redução do crescimento bacteriano da *Salmonella* (SILVESTRI et al., 2010; BONA et al., 2012).

5 PROJETO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Óleo de semente da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.): extração, microencapsulação, potencial antimicrobiano e antioxidante

Marjana Radünz

Pelotas, junho de 2016.

MARJANA RADÜNZ

**Óleo de semente da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.): extração,
microencapsulação, potencial antimicrobiano e antioxidante**

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

Orientadora – Prof.^a Dr.^a Elizabete Helbig

Co-orientadores – Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

– Prof.^a Dr.^a Caroline Dellinghausen Borges

Marjana Radünz

Pelotas, junho de 2016.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi

Prof.^a Carla Rosane Barboza Mendonça (suplente)

Resumo

A preocupação com a alimentação saudável da população e a comprovação dos efeitos cancerígenos dos nitritos e nitratos utilizados como conservantes de alimentos cárneos embutidos faz com que seja estimulado o desenvolvimento de produtos naturais para a substituição destes. Em função disto surgem estudos utilizando óleos essenciais oriundos de frutas e folhas para esta finalidade. As sementes de fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) apresentam em sua estruturação compostos chamados acetogeninas que possuem efeito antimicrobiano e antioxidante. O processo de microencapsulação do óleo essencial pode potencializar seu efeito. Levando em consideração estes fatores o objetivo do presente estudo é realizar a extração do óleo de semente de fruta do conde, microencapsular e avaliar seu potencial antimicrobiano e antioxidante frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e contra os fungos *Trichoderma ssp* e *Rhizopus ssp*.

Palavras chave: acetogeninas – bactérias – patogênicas - fungos

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características da polpa da fruta do conde (<i>Annona squamosa</i> , L.) madura	11
Tabela 2. Delineamento experimental para avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de semente da fruta do conde (<i>Annona squamosa</i> , L.) e das micropartículas	23
Tabela 3. Delineamento experimental para análise do potencial antioxidante de óleo de semente da fruta do conde (<i>Annona squamosa</i> , L.) e das micropartículas	24
Tabela 4. Delineamento experimental para análise de viabilidade da microencapsulação de óleo de semente da fruta do conde (<i>Annona squamosa</i> , L.).	24
Tabela 5. Cronograma de atividades	32
Tabela 6. Orçamento do projeto	33

Sumário

1 Introdução	8
2 Revisão bibliográfica	10
2.1 Fruta do conde (<i>Annona squamosa</i> , L.)	10
2.2 Óleo essencial	12
2.2.1 Atividade antioxidante dos óleos essenciais	12
2.2.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	13
2.3 Microencapsulação	16
2.4 Microrganismos de importância em alimentos	18
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.4.2 <i>Escherichia coli</i>	19
2.4.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	20
2.4.4 <i>Trichoderma spp</i>	20
2.4.5 <i>Rhizopus spp</i>	20
3 Objetivos	21
3.1 Objetivo geral.....	21

3.2 Objetivos específicos	21
4 Hipótese	22
5 Materiais e métodos	23
5.1 Delineamento experimental	23
5.2 Aquisição da amostra	25
5.3 Extração do óleo.....	25
5.4 Caracterização da composição química do óleo.....	25
5.4.1 Perfil cromatográfico de terpenos	25
5.4.2 Índice de refração	25
5.4.3 Determinação de compostos fenólicos totais	26
5.4.4 Determinação do teor flavonóides totais	26
5.4.5 Determinação do teor de terpenos totais	26
5.5 Microencapsulação do óleo	27
5.6 Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais e das micropartículas.....	27
5.6.1 Reativação dos microrganismos.....	28
5.6.2 Teste de disco difusão	28
5.6.3 Mínima concentração bactericida.....	29
5.6.4 Mínima concentração inibitória	30
5.6.5 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)	30
5.6.5.1 Isolamento do DNA	30
5.6.5.2 Eletroforese em gel de agarose.....	31
5.7 Avaliação do efeito antioxidante de óleos essenciais	31
5.7.1 Atividade antioxidante pelo método de DPPH	31
5.7.2 Atividade antioxidante pelo método de ABTS	32
5.8 Análise estatística	32
6 Resultados e impactos esperados	33
7 Cronograma de atividades	34
8 Orçamento	35

9 Referências bibliográficas37

1 Introdução

Ao longo dos últimos anos cresceu significativamente a preocupação da população em manter uma alimentação mais saudável, com a diminuição do consumo de produtos industrializados, principalmente, por estes apresentarem conservantes sintéticos alimentares com potencial carcinogênico. Este dado foi confirmado pela Agência Internacional de Investigação do Câncer, órgão da Organização Mundial de Saúde que concluiu que o consumo de carnes processadas por defumação e/ou cura aumentam o risco de aparecimento de cânceres (OMS, 2015).

Diante disso, a indústria tem se voltado para a busca de novas alternativas aos conservantes químicos tradicionalmente utilizados, como os compostos antimicrobianos naturais presentes em extratos e óleos vegetais (TASSOU et al., 1995; CARVALHO et al., 2006). Essas substâncias podem inibir ou eliminar a presença de microrganismos e têm sido amplamente estudadas, principalmente os óleos essenciais de matérias-primas vegetais, como por exemplo de frutas, que apresentam alguma atividade antimicrobiana e/ou antioxidante.

Os óleos essenciais também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, são compostos naturais, voláteis e complexos, oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Por isso apresentam intenso odor e podem ser obtidos de folhas, flores e frutos, sendo utilizados em medicamentos e/ou alimentos (SILVA-SANTOS, 2006).

Além da atividade antimicrobiana podem apresentar um potencial antioxidante que auxilia na eliminação dos radicais livres no nosso organismo (OETTERER et. al, 2006). A eficácia de atuação das substâncias ativas sobre os microrganismos e sobre os radicais livres pode ser influenciada por condições ambientais de temperatura, luz e oxigênio, para isto, a microencapsulação deste óleo é uma alternativa que protege os compostos destes efeitos, além de promover uma liberação controlada do composto ativo em locais específicos (NEDOVIC, et. al, 2011).

A fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) pertence à família das Annonaceae e é classificada como sincarpo, com polpa clara e doce que envolve individualmente suas numerosas sementes. As sementes não são aproveitadas individualmente, na

maioria dos casos são consumidas junto com a fruta ou descartadas. Segundo ALALI et al. (1999), as sementes apresentam em sua composição substâncias chamadas acetogeninas, que apresentam diversas atividades biológicas, entre elas funções de antioxidante e antimicrobiana.

Entretanto, a maior parte dos estudos sobre a fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) está vinculada ao cultivo, preparo do solo, adubação, plantio, pragas e doenças sendo escassos os que abrangem a utilização do óleo essencial (FAVARO, 2014).

Este estudo é proposto com intuito de extrair e caracterizar o óleo de sementes da fruta do conde, microencapsular e avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano deste por diferentes métodos.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Fruta do conde (*Annona squamosa*, L.)

As anonáceas pertencem à classe Magnoliopsida e a subclasse Magnolidae. Apresentam cerca de 120 gêneros e mais de 2300 espécies, sendo o gênero *Annona*, o de maior importância econômica (MAAS et al., 2001).

A fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) também conhecida como pinha, ata ou araticum é uma anonácea originária da Ilha de Trindade e das Antilhas. Chegou ao Brasil em 1926 na Bahia, posteriormente sendo cultivada em outros estados (CORDEIRO et al., 2000).

A árvore possui porte pequeno de 4 a 6 m de altura, muito ramificada, com folhas lanceoladas de 6 a 7 cm de comprimento, decíduas e de coloração verde brilhante na parte superior e verde azulada na parte inferior. As sépalas se apresentam em três e são triangulares medindo 2 a 3 cm de comprimento, as três pétalas externas são lanceoladas e grossas com 1,5 cm de comprimento, de coloração amarelo verdosas por fora e amareladas com uma mancha roxa na base isoladas ou na forma de cachos contendo de 2 a 4 flores. O seu fruto é um sincarpo arredondado de 5 a 10 cm de diâmetro, com peso entre 150 a 650 g, formado por carpelos proeminentes e cobertos por saliências achatadas em forma de tubérculos, com coloração verde, polpa de cor branca translúcida ou creme, doce, rica em sais minerais e vitaminas, com cerca de 60 sementes de cor preta em cada fruto (DONADIO et al., 1998; IAC, 1998; EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 1998).

Quanto ao clima, a árvore se adapta a condições do litoral e do semiárido, por não tolerar temperaturas muitas baixas, sendo a faixa de temperatura mínima de 10 a 20 °C e como temperaturas máximas 22 a 28 °C. Adapta-se melhor ao inverno seco com chuvas bem distribuídas, com solo profundo suprido de matéria orgânica (IAC, 1998; EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 1998).

Atualmente, os maiores produtores desta fruta no Brasil se situam na região nordeste, sendo os maiores Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, e alguns estados do sudeste como Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (MEDINA et al., 2015).

Segundo Alves, Figueiras e Moura (2000), o fruto possui, em média, 39,16% de casca, 11,03% de sementes, 48,13% de polpa e amadurecem entre 100 a 120 dias após o florescimento, com mudança na coloração da casca que passa de verde-amarelada para creme-rosada no período de dezembro a julho, tendo seu maior pico em fevereiro e março (IAC,1998).

A produção da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) na região nordeste pode ocorrer durante todo o ano, desde que apresente condições de irrigação, uso intensivo de adubos e defensivos agrícolas, além de grande mão de obra (CARLSON et al., 2007). A definição do momento da colheita é de extrema importância, pois é na fase final de seu desenvolvimento que a fruta forma polpa de enchimento mais saborosa. Essa maturação se inicia com o afastamento dos carpelos e promove mudanças na cor, sabor, aroma e textura. A colheita desse fruto climatérico deve ser realizada manualmente para evitar que o fruto seja danificado, o que o tornaria inadequado para a comercialização *in natura* (VIANA, 2005).

A composição físico-química da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) foi determinada por Alves et al. (2000) e se encontra descrita na tabela 1. O conteúdo de sólidos solúveis totais desta é muito superior a outras frutas, apresentando também uma baixa acidez total titulável 0,34% (ácido cítrico), caracterizando uma predominância do sabor doce (GOMES, 1987).

Tabela 1. Características da polpa da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) madura

Características	Médias
Sólidos solúveis totais (°Brix)	27,00
Acidez total titulável (%)	0,34
Sólidos solúveis/acidez	80,14
pH	5,23
Açúcares solúveis totais (%)	19,23
Açúcares redutores (%)	15,96
Amido (%)	0,87
Pectina total (%)	0,66
Pectina solúvel (%)	0,31
Vitamina C (mg/100g)	28,35

Fonte: Alves et al., 2000.

De acordo com Leal et al. (1990), o segundo componente de maior presença na constituição da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.), perdendo apenas para a água são os carboidratos, que constituem entre 18,2 e 26,2%, destes 83% dos açúcares solúveis totais são constituídos por açúcares redutores. Apresentam ainda teores altos de amido (0,87%) e de pectina (0,66%) ao final do processo de maturação, dificultando o processamento do suco.

WU et al. (1996), isolaram 14 compostos da semente de fruta do conde (*Annona squamosa*, L.), sendo um destes, o ácido 16 β -17-dihidroxi-ent-kaurano-19-oico, que mostrou atividade significativa contra a replicação do vírus do HIV em células de linfócitos.

2.2 Óleos essenciais

A extração de óleos essenciais pode ocorrer de diversas formas: a prensagem a frio que é mais comum e pode ser utilizada para a extração de óleos de frutos cítricos; a turbodestilação mais usada para se extrair o óleo de plantas cujos tecidos retém a seiva de forma mais intensa; a enfleurage utilizada na extração de óleos mais instáveis de pétalas de flores e que podem perder seus compostos aromáticos se extraídos por outros métodos; o uso de gás refrigerante que utiliza uma substância química que tem afinidade com as moléculas constituintes do óleo essencial, agindo como solvente; e o uso de dióxido de carbono supercrítico sob extrema pressão (200 atm) e temperatura mínima de 30 °C para extração do óleo. Entretanto, a principal forma de extração é a hidrodestilação onde a matéria-prima vegetal é completamente mergulhada em água, sem que a temperatura ultrapasse os 100°C (BAKKALI et al., 2006).

2.2.1 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Os antioxidantes são substâncias que apresentam a capacidade de retardar o surgimento de alterações oxidativas nos alimentos. Essa oxidação produz radicais livres que quando produzidos em excesso são prejudiciais a nossa saúde (BIANCHI;ANTUNES, 1999).

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células, mas também produz radicais

livres levando ao stress oxidativo que predispõem o aparecimento de doenças crônicas e degenerativas como o câncer e o envelhecimento. Estudos sugerem que a utilização de antioxidantes fenólicos de frutas, vegetais e cereais atuam sobre os radicais livres diminuindo a incidência do aparecimento dessas doenças (ROESLER et al., 2007).

Os antioxidantes apresentam dois mecanismos de ação:

- Primários: interrompem a cadeia da reação ao doarem elétrons ou hidrogênio aos radicais livres transformando-os em produtos termodinamicamente estáveis ou reagem com radicais livres formando um complexo lipídio-antioxidante que pode exercer reação com outro radical livre.

- Secundários: retardam o início da autoxidação através de sequestro de oxigênio, de complexação de metais, de absorção de radiação ultravioleta, de decomposição de hidroperóxidos ou desativação de oxigênio singlete (ANGELO; JORGE, 2007).

No estudo realizado por Brito et. al (2008), foi possível a identificação no extrato etanólico das folhas da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) a presença de alcaloides, flavanoides, flavononas, triterpenoides, esteroides, flavonas, flavonois, xantonas, saponinas, taninos e resinas. Os flavonoides e alguns fenóis seriam os responsáveis pela atividade antioxidante da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.).

2.2.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Os compostos antimicrobianos são substâncias que podem eliminar ou impedir o desenvolvimento dos microrganismos, podendo ser sintéticos ou naturais oriundos de bactérias ou fungos. A maioria das plantas também possui compostos que são antimicrobianos e as protegem de microrganismos (RAMOS et al., 2007).

Os componentes hidrofóbicos são responsáveis pela ação antimicrobiana dos óleos essenciais, pois causam o rompimento de lipídios da membrana levando a perda da funcionalidade, mas para isto são necessárias altas doses, o que torna o produto sensorialmente intolerável, sendo então uma alternativa mais viável utilizar concentrações que inibem a multiplicação destes microrganismos (FORSYTHE, 2010).

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).

Considera-se como compostos com atividade antimicrobiana na fruta do conde as acetogeninas e os terpenos. As acetogeninas são metabólitos secundários presentes exclusivamente nas frutas da família Annonaceae e são obtidos através da via do ácido acético derivados de ácidos graxos de cadeia longa com média de 35 a 39 carbonos. Apresentam uma cadeia alifática longa com hidroxila, acetila, carbonila e um anel γ -lactona terminal, podendo conter ainda de 1 a 3 anéis tetraidrofurânico ou anel tetraidropirânico. Existem sete classificações de acetogeninas: annona, asimina, disepalum, goniothalamus, rollinia, uvária e xylopia. Desses a annona é a que se encontra presente na fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) (ALALI et al., 1999).

As acetogeninas presentes na fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) são a anonina ou anonacina, asimicina, bulatacina, bulatacinona e escuamocina (CORDEIRO et al., 2000).

Observa-se na composição química da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) a presença de seis tipos de compostos como as acetogeninas que apresentam atividade citotóxica, antitumoral, pesticida, vermícida, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antimalárica (PIMENTA; BOAVENTURA, 2007; BRITO et al., 2008).

No estudo de Nonfon (1990) foram isoladas quatro anoninas (acetogeninas) da semente da fruta: anonina IV, anonina VIII, anonina XIV e anonina XVI, através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono e espectrometria de massas. Araya (2002) encontrou também a presença da esquamocina-O (1) e da esquamocina-O (2), utilizando métodos semelhantes.

Terpenos são hidrocarbonetos múltiplos do isopreno, sua biossíntese ocorre a partir da combinação de duas moléculas de ácido acético para formar ácido mevalônico. Na polpa e nas sementes da fruta do conde foram identificados compostos monoterpenos como α -pineno, sabineno, limoneno e (E) - β -ocimeno e também compostos sesquiterpenos, como o espatulenol, germacreno e o

biciclogermacreno (ANDRADE et al., 2001). As sementes apresentam elevada concentração de óleos voláteis (ANSARI et al., 1985), onde foram identificados e isolados 6 componentes desses óleos com comprovada atividade antimicrobiana (RAHMAN et al., 2005; CHAVAN et al., 2006). O estudo de Sunanda e Anand (2003) sugere também que o extrato aquoso das folhas pode melhorar os sintomas de hipertireoidismo.

A avaliação mais comum do efeito antimicrobiano de óleos essenciais é realizada através do método de disco-difusão. Este método se baseia na difusão da substância a ser analisada em meio sólido contendo o microrganismo. Após a difusão há o surgimento de um halo de inibição em que não ocorre o desenvolvimento microbiano, sendo considerado 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 distingue o tipo de método de difusão, o mais comum é o disco difusão (SILVEIRA et al., 2009).

A resistência dos microrganismos pode ser medida através de metodologias fenotípicas como a mínima concentração inibitória que é definida como a menor quantidade de agente antimicrobiano necessário para inibir o desenvolvimento do microrganismo e a determinação da mínima concentração bactericida que é definida como a menor quantidade de antimicrobiano necessário para eliminar o microrganismo, 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; BARROS, 2006).

Há uma tendência crescente para que seja avaliado o dano dos agentes antimicrobianos no DNA de microrganismos. Dentre estes métodos está o DNA polimórfico amplificado ao acaso (*Random amplified polymorphic DNA - RAPD*) que consiste na amplificação ao acaso de DNA genômico através da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) utilizando *primers* de sequência arbitrária com 10 nucleotídeos (LACERDA et al., 2002).

O *primer* se liga as sequências complementares em fitas opostas do DNA alvo e ocorre a amplificação *in vitro* do segmento de DNA entre dois *primers* adjacentes com o auxílio da enzima Taq polimerase. Os sítios de ligação dos *primers* devem estar separados por no máximo 3 a 4 mil pares de bases, uma vez

que a Taq polimerase não é capaz de percorrer segmentos maiores nas condições normalmente usadas durante a amplificação. Um “perfil genético RAPD” será formado pelo conjunto dos produtos de amplificação de diversos *primers* diferentes. A separação dos produtos amplificados pode ser feita através de eletroforese em gel de agarose (em concentrações que variam de 0,8 a 2%), corado com brometo de etídio ou em gel de poliacrilamida (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; FRITSCH; RIESEBERG, 1996).

Caso haja alterações no perfil genético antes e após o contato do microrganismo com o óleo essencial pode-se inferir que há dano genético causado pelo agente antimicrobiano (HAMEDO, 2009).

2.3 Microencapsulação

A encapsulação é definida como um processo em que ocorre a retenção de uma substância, óleo essencial, por exemplo, dentro de outra, denominada cápsula, a qual pode ser consumida (NEDOVIC et al., 2011).

As cápsulas podem ser divididas em três grupos de acordo com seu tamanho: 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 microesferas. A diferença básica entre as microesferas 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 técnica de microencapsulação minimiza as interações da substância que forma o núcleo com o ambiente; reduz a velocidade de evaporação ou de transferência dos 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 et al., 2008).

Diversas substâncias podem ser utilizadas como material de parede, 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), lipídios (ácido esteárico, cera, óleos e gorduras hidrogenadas, monoglicerídeos e diglicerídeos, parafina, triestearina), proteínas (albumina, caseína, gelatina, glúten), etc (SUAVE et al., 2006).

Dentre essas, a quitosana tem sido amplamente utilizada para encapsular óleos essenciais (GONSALVES et. al, 2009), entretanto, não há trabalhos na literatura com a encapsulação de óleo essencial da fruta do conde.

A quitosana é um copolímero catiônico formado por unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glicosamina e 2-desoxi-D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4, obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina. É um promissor material polimérico de grande interesse científico devido as suas propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade (MENDES et al., 2011).

As características desse biopolímero podem ser alteradas através da modificação da sua estrutura química por reticulação, a fim de conferir-lhe propriedades funcionais adicionais ou simplesmente melhorar atributos já característicos (GONSALVES et al., 2011).

A quitosana pode ser reticulada pela utilização da vanilina, através da reação de Schiff, entre o grupo aldeído da vanilina e o grupo amino da quitosana (WANG et al., 2011).

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é um composto aromático importante flavorizante para alimentos, bebidas e utilizado na indústria farmacêutica, por apresentar efeito antimutagênico, antioxidante, conservante e antimicrobiano. Pode ser produzida biotecnologicamente com baixos custos, a partir do uso de fontes renováveis como extratos enzimáticos ou enzimas purificadas, microrganismos e cultura de células de planta. Os principais precursores para a produção biotecnológica de vanilina são eugenol, isoeugenol, ácido ferúlico e outros menos utilizados (DAUGSCH; PASTORE, 2005).

Dentre as metodologias utilizadas para a encapsulação destacam-se os processos de atomização, extrusão, leiteo fluidizado, coacervação, secagem em tambor, liofilização, inclusão molecular e inclusão em lipossomas (AZEREDO, 2005).

O método de coacervação é o mais utilizado, seu nome derivado do latim e significa união/agregação de partículas. É caracterizado pela 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 simples ou complexa: a primeira envolve um único polímero e é caracterizada pela separação da fase líquida através da adição de um eletrólito (sal ou álcool) que compete pela água à solução coloidal; a segunda resulta da neutralização mútua de dois coloides carregados com cargas opostas em solução aquosa (VASILIU et al., 2005).

2.4 Microrganismos de importância em alimentos

O perigo biológico representa maior risco a inocuidade dos alimentos. Nessa categoria incluem-se as bactérias, fungos e vírus. Dentre os vários tipos de microrganismos, as bactérias patogênicas são as responsáveis pelo maior número de casos de intoxicação alimentar. Já os fungos tornam-se um problema de segurança alimentar quando produzem micotoxinas que são prejudiciais à saúde do homem (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003).

Os óleos essenciais danificam vários sistemas enzimáticos das bactérias, inclusive os responsáveis pela produção de energia celular e na síntese de compostos estruturais, interferindo na divisão celular da bactéria (FREIRE et al., 2011).

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

São bactérias Gram positivas no formato de cocos medindo entre 0,5-1,5 μm de diâmetro, não são móveis nem formam esporos. Podem estar sozinhas, em pares, em cadeias curtas ou reunidas em formato de cacho de uva devido a divisão celular que é feita em três planos perpendiculares (SANTOS et al., 2007).

Estão presentes, naturalmente, na pele e no trato respiratório superior das pessoas, consistindo em um microrganismo oportunista. Apresenta facilidade no desenvolvimento em alimentos e capacidade de produzir toxinas termorresistentes

(enterotoxinas), levando a intoxicação alimentar, que causa náuseas, diarreia e vômitos dentro de uma a seis horas (MADIGAN et al., 2010). Pode causar também 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).

Vários estudos observam a ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre *Staphylococcus aureus*, como o óleo essencial de canela nas concentrações de 5, 10,20, 30, 40 e 50% e o óleo de manjerona que promoveram inibição do crescimento desta bactéria (FREIRE et al., 2011).

2.4.2 *Escherichia coli*

São bactérias Gram negativas encontradas na microbiota entérica de animais (CAMPOS et al., 2006).

A *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC) tem a capacidade de produzir uma toxina quando se aloja no intestino chamada de verotoxina, que causa desde uma diarreia sanguinolenta até uma insuficiência renal. A *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é uma infecção entérica que leva a diarreia aquosa, principalmente, em pessoas que estão viajando, já que os habitantes locais já estão imunes à bactéria. A *Escherichia coli* entero-patogênica (EPEC) não é invasiva nem produz toxinas e está envolvida com casos de diarreia infantil e em bebês. A *Escherichia coli* entero-invasiva (EIEC) causa doença invasiva do cólon, sendo responsável por diarreia aquosa, que por vezes pode ser sanguinolenta (MADIGAN et al., 2010). A *Escherichia coli* entero-agregativa (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).

O óleo essencial de anis estrelado na concentração de 5%, apresenta efeito inibitório do crescimento de *Escherichia coli*, assim como o óleo de canela e o óleo de manjerona (FREIRE, et al.,2011).

2.4.3 *Listeria monocytogenes*

São bactérias Gram positivas que apresentam formato de bastonetes curtos e cocobacilos de 0,5 µm de largura e 1-1,5 µm de comprimento com tendência de formação de cadeias com três a cinco células. São aeróbias facultativas, não formam esporos e não apresentam capacidade de produzir gás, mas produzem catalase e ácido a partir da glicose (MADIGAN et al., 2010).

Entre as duas classes patogênicas, se destaca a *Listeria monocytogenes* que pode causar infecção no ser humano e em animais (LIU, 2006). Apresentam alta resistência frente alterações de concentração de sal, pH e temperatura, podendo ser encontradas em diferentes ambientes como em alimentos, água, efluentes e solo. Pode se multiplicar em ambientes hostis sob temperaturas de refrigeração (2°C – 4°C) (PERES, 2010,) causando a listeriose que pode levar a aborto, septicemia e meningite em grupos mais susceptíveis (FAI et al., 2011).

Um estudo com os óleos essenciais de *Cinnamomum cássia* e *Cinnamomum verum* apresentam efeito inibitório do crescimento de *Listeria monocytogenes* (OUSSALAH et al., 2007).

2.4.4 *Trichoderma spp*

O fungo *Trichoderma spp* é um mofo verde bastante comum no solo, apresenta ramificações chamadas hifas e micélio, e uma estrutura de propagação pelo ar denominada esporo ou conídio. Participa na decomposição e mineralização dos resíduos vegetais contribuindo para a disponibilização de nutrientes para as plantas. É também um dos principais adversários de outros fungos que causam doenças nas plantas (NACHTIGAL, 2012).

2.4.5 *Rhizopus spp*

O fungo *Rhizopus spp* é um fungo muito comum, presente em materiais em decomposição. Nas plantas ocasiona podridão na pós-colheita de hortaliças, frutíferas, gramíneas e algumas espécies arbóreas. Em humanos pode causar mucormicose ou zigomicose, uma infecção oportunista grave que tem como

sintomas o comprometimento rinocerebral, comprometimento cutâneo, pulmonar e gastrointestinal (MARQUES et al., 2010).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Extrair e caracterizar o óleo de sementes da fruta do conde, microencapsular e avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano por diferentes métodos.

3.2 Objetivos específicos

Extrair o óleo da semente de fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) por hidrodestilação e por prensagem a frio;

Determinar o rendimento comparativo entre os métodos de extração do óleo extraído de sementes da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.)

Realizar caracterização química do óleo da semente de fruta do conde (*Annona squamosa*, L.);

Determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial da fruta do conde por diferentes métodos;

Microencapsular o óleo de semente de fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) utilizando quitosana como material de parede e vanilina como reticulante, pelo método de coacervação simples;

Caracterizar as microcápsulas quanto à morfologia, tamanho, eficiência de encapsulação, comportamento térmico, atividade antimicrobiana e antioxidante por diferentes métodos.

4 Hipótese

O óleo *in natura* e microencapsulado de sementes da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) apresenta efeito antioxidante e antimicrobiano frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e os fungos dos gêneros *Trichoderma* spp e *Rhizopus* spp.

5 Materiais e métodos

5.1 Delineamento experimental

Considerando o delineamento proposto a primeira avaliação será quanto ao rendimento do óleo essencial da fruta do conde obtido através da hidrodestilação e o rendimento obtido a partir da prensagem, realizados em triplicata.

No segundo ensaio experimental as variáveis independentes utilizadas serão amostras do óleo essencial de semente da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) e micropartículas e os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Trichoderma spp* e *Rhizopus spp*. As variáveis dependentes serão os efeitos antimicrobianos avaliados através das técnicas disco difusão, mínima concentração inibitória e mínima concentração bactericida e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso. A relação entre essas variáveis pode ser verificada na Tabela 2.

Tabela 2. Delineamento experimental para avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de semente da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) e das micropartículas

Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes
Amostra	
Óleo essencial da hidrodestilação	
Óleo essencial da prensagem	
Micropartícula 1 (quitosana)	
Micropartícula 2 (quitosana + vanilina)	
Microrganismos	Avaliações
<i>Staphylococcus aureus</i>	Disco difusão
<i>Escherichia coli</i>	MCB
<i>Listeria monocytogenes</i>	MCI
<i>Trichoderma spp</i>	RAPD
<i>Rhizopus spp</i>	

O delineamento proposto será composto por duas variáveis independentes em dois e cinco níveis respectivamente avaliadas através de uma variável dependente em três níveis em triplicata totalizando 63 determinações (7x3x3).

O potencial antioxidante dos óleos será avaliado, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Delineamento experimental para análise do potencial antioxidante de óleo de semente da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) e das micropartículas

Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes
Amostra	Avaliação DPPH
Óleo essencial da hidrodestilação	
Óleo essencial da prensagem	
Micropartícula 1 (quitosana)	
Micropartícula 2 (quitosana + vanilina)	

Neste delineamento serão utilizadas uma variável independente em dois níveis avaliadas através de uma variável dependente em triplicata totalizando 6 determinações (2x1x3).

A microencapsulação será avaliada de acordo com o delineamento presente na Tabela 4.

Tabela 4. Delineamento experimental para análise de viabilidade da microencapsulação de óleo de semente da fruta do conde (*Annona squamosa*, L.).

Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes
Óleo essencial da hidrodestilação(controle)	Comportamento térmico Avaliações
Óleo essencial da prensagem (controle)	
Micropartícula 1 (quitosana)	Comportamento térmico Eficiência de encapsulação Morfologia Avaliações
Micropartícula 2 (quitosana + vanilina)	

Este último delineamento proposto será composto por três variáveis independentes avaliadas através de uma variável dependente em oito níveis em triplicata totalizando 72 determinações (3x8x3).

5.2 Aquisição da amostra

As frutas do conde serão adquiridas na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) oriundas da cidade de Presidente Dutra na Bahia. Primeiramente os frutos serão descascados e congelados em ultrafreezer.

Posteriormente, será feita a separação manual da polpa e da semente e congeladas novamente em ultrafreezer até a sua utilização.

5.3 Extração do óleo

Para realizar a extração do óleo, primeiramente, será feito a maceração das sementes, utilizando nitrogênio líquido e, após, estas serão moídas em moinho de bolas. Na hidrodestilação será utilizado o aparelho Clevenger, para isso será adicionado 400 g da amostra em um balão volumétrico de 1000 mL e acrescentado o dobro de água destilada, ou seja, 800 mL, a extração ocorrerá por 3 h. O óleo obtido ficará retido no aparelho, este será transferido para um frasco de vidro âmbar e armazenado sob congelamento (-18°C). Será testada também a extração por prensagem a frio, onde as sementes serão submetidas a prensagem com o auxílio de uma prensa manual de pressão até a completa retirada do óleo.

5.4 Caracterização da composição química do óleo

Para a caracterização do óleo de semente de fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) será realizada análise de perfil cromatográfico de terpenos, índice de refração, fenóis totais, flavonoides totais e terpenos totais.

5.4.1 Perfil cromatográfico de terpenos

O perfil cromatográfico dos terpenos será realizado por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (VALLILO, et al., 2006).

5.4.2 Índice de refração

Para determinar o índice de refração do óleo será utilizado o método AOCS Cc 7-25 (AOCS, 1993) e um refratômetro a temperatura de 25 °C ± 2 °C.

5.4.3 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais será realizada segundo o procedimento descrito por Swain e Hillis (1959) com algumas adaptações. Na extração dos compostos fenólicos, 5g de amostra serão adicionadas de 20mL de álcool metílico, sendo estes submetidos a agitação por 1h e centrifugação a 3420g por 10 minutos. Para a realização da reação, em um tubo de Falcon serão adicionados 4 mL de água destilada, 150 µL de álcool metílico, 100 µL do extrato e 250 µL de Folin-Ciocalteau 0,25M que serão agitados e deixados para reagir por 3 minutos. Após este período serão adicionados 500 µL de carbonato de sódio 1M e deixados para reagir por 2h, posteriormente a leitura será realizada em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) a 725nm. Para a quantificação dos compostos fenólicos se utilizará uma curva de padrão preparada com ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg de ácido gálico (EAG). 100g⁻¹ de amostra.

5.4.4 Determinação do teor flavonoides totais

A determinação do teor de flavonoides totais será realizada de acordo com a metodologia descrita por Dewanto et al. (2002), com pequenas adaptações. O método se baseia na medida da absorvância a 510 nm do complexo formado entre o flavonoide e o alumínio do reagente de cor formando compostos de coloração amarelada. Os resultados serão expressos como equivalentes de catequina (ECAT) por grama de amostra. As análises foram efetuadas em espectrofotômetro.

5.4.5 Determinação do teor de terpenos totais

A determinação do teor de terpenos totais será realizada com base na metodologia proposta por Doneva-Sapceska et al. (2006). A técnica baseia-se na adição em um tubo de vidro de 5 mL de 1200 µL de solução padrão de linalol para a curva de calibração/ água para o branco/ diluições da amostras e 600 µL de solução 2% vanilina:ácido sulfúrico (H₂SO₄). Essa solução será misturada em um vortex e submetidas a banho de gelo para minimizar o sobreaquecimento da solução. Posteriormente a solução será submetida a dois banhos em água, um a 60 °C por 20 min e o segundo a 25 °C por 5 min. As absorvâncias das amostras serão lidas ao comprimento de onda de 608 nm em espectrômetro. A curva de calibração será realizada com soluções de linalol:água (1,25-20 mg linalol/ L água).

5.5 Microencapsulação do óleo

Para a microencapsulação será escolhido o óleo de um dos métodos de extração.

A microencapsulação do óleo extraído 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 0,1 g do reticulante vanilina serão adicionados e homogeneizados, dependendo do tratamento. Em seguida esta solução será gotejada, em uma solução de NaOH 2,0 mol.L⁻¹, após as partículas formadas serão mantidas em NaOH 2,0 mol.L⁻¹ por 30 minutos sob agitação para completa precipitação, posteriormente serão lavadas com água destilada até atingir pH 7,0 e secas a vácuo (SOUZA et. AL, 2005).

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 micropartículas e os compostos encapsulados, como descrito por Rutz et al. (2013).
- Morfologia das partículas: a morfologia e o tamanho das microcápsulas serão avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Comportamento térmico: será determinado por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

5.6 Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais e das micropartículas

A avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial e das micropartículas será realizada através de três metodologias fenotípicas e de uma metodologia molecular. Serão testados os efeitos antimicrobianos do óleo essencial de fruta do conde sobre *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes* e para dois gêneros fúngicos (*Trichoderma* spp e *Rhizopus* spp)

5.6.1 Reativação dos microrganismos

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, com exceção de *Listeria monocytogenes* onde será utilizado o caldo TSB com extrato de levedura, e então serão incubados em estufa durante 24 h a 37 °C. Em seguida, uma alçada do isolado será transferida e estriada em placas contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubadas por 24 h a 37 °C, para que ocorra o isolamento das colônias. A partir das colônias que se desenvolverem no Ágar será extraída 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⁻¹).

O preparo do inóculo fúngico para os testes de difusão em ágar será realizado conforme metodologias descritas por Gurgel et al. (2005) e Fontenelle et al. (2007)

Primeiramente, as culturas dos fungos deverão ser estriadas com auxílio de uma alça na superfície de placas de Petri contendo 22 mL de ágar dextrose batata (BDA) e incubadas a 25 °C por 5 dias.

Após esse período de incubação, os cultivos fúngicos deverão ser cobertos com 2 mL de salina estéril e com auxílio de alça microbiológica, deverão ser realizadas raspagens da superfície de cada cultura, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões deverão ser transferidas com auxílio de pipetas ou micropipetas para tubos de ensaio estéreis vazios e, em seguida, deixados em repouso a 28 °C por 5 minutos. O sobrenadante destas suspensões deverá ser lido em espectrofotômetro a 530 nm e a sua transmitância ajustada para 95% (diluindo com água salina estéril), a fim de se obter um inóculo padronizado, aproximadamente, entre 10^6 UFC.mL⁻¹ e 10^5 UFC.mL⁻¹.

5.6.2 Teste de disco difusão

O teste de disco-difusão será realizado de acordo com protocolo proposto pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI 2005). A solução salina que foi inoculada será em seguida semeada através de espalhamento utilizando swab estéril na superfície de placas contendo Ágar Muller-Hinton. Depois de seco, serão adicionados discos de papel filtro com 10 µL de óleo essencial e das micropartículas sobre o Ágar, posteriormente as placas serão incubadas por 24 h a 35 °C e ocorrerá a medição dos halos de inibição.

No caso específico dos fungos será utilizado o método de difusão em ágar seguindo a metodologia proposta por Fontenelle et al. (2007).

Em paralelo o óleo essencial e as micropartículas deverão ser submetidos a teste para certificação da qualidade através da adição de 10 µL do óleo ou micropartículas em 2 mL de caldo BHI e incubado por 24 h a 28 e 37 °C para observação de crescimento microbiano, o qual não deverá ser observado em nenhuma das amostras.

Cada inóculo padronizado fúngico presente nos tubos de ensaio será estriado com o auxílio de um swab estéril na superfície placas de Petri contendo 22 mL de ágar dextrose batata (BDA) estéril. Quatro pequenos poços equidistantes (diâmetro 6 mm) serão feitos no centro da placa, com o auxílio de uma agulha e 60 µL do óleo ou micropartículas serão adicionados aos poços nas concentrações obtidas. As placas serão incubadas a 28 °C e as leituras serão realizadas após 3, 5 e 8 dias de incubação. O diâmetro da zona de inibição do crescimento ao redor do poço deverá ser medido em milímetros com uso de paquímetro, halômetro ou escalímetro e registrado nas quatro direções radiais diferentes. Como controle será utilizado água salina estéril.

Será considerada satisfatória (atividade antifúngica) a presença de halo de inibição maior ou igual a 10 mm.

5.6.3 Mínima concentração inibitória

A determinação da mínima concentração inibitória (MCI) será realizada de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. 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⁻¹. Será utilizada água destilada como controle e a incubação será por 24 h a 37 °C. Em seguida da incubação, serão adicionados 30 µL de corante Resazurina (0,01%; m/v) para que se possa visualizar os poços em que houve desenvolvimento 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.

5.6.4 Mínima concentração bactericida

A determinação da mínima concentração bactericida (MCB) será realizada de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. Serão usados 10 µL do meio de cultura considerados com ausência de bactérias viáveis no teste de MCI, os quais serão semeados em placas de Petri contendo Ágar BHI e incubados por 24 horas a 37 °C. A MBC será considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

5.6.5 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)

O RAPD será realizado de acordo com a metodologia proposta por Williams et al. (1990), e consiste na amplificação de DNA genômico através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* de sequência arbitrária com 10 nucleotídeos (ERCAN, 2015).

5.6.5.1 Isolamento do DNA

A extração do DNA será realizada com auxílio de um kit de isolamento de DNA EZNA, e a concentração de DNA será estimada usando espectrofotômetro UVIS-Drop.

A análise de RAPD-PCR será realizada em misturas reacionais de 15 µL, contendo 1,5 µL de tampão PCR (tampão 10X com (NH₄)₂ SO₄), 1,2 µL de MgCl₂ (2,5 mM, Fermentas), 0,5 µL de dNTP (solução de reserva 10 mM), 0,6 µL de BSA (10 mg / mL), 1,0 µL de *primers* (10 µM.) 5 U/ µL DE Taq polimerase e 0,25 mL de água desionizada esterilizada até ao volume final. Serão adicionados a cada tubo de PCR 2 µL de DNA extraído (ERCAN ,2015).

Para a amplificação, as misturas reacionais serão desnaturadas a 94 °C durante 2,5 minutos seguido por 36 ciclos consistindo de desnaturação durante 45 segundos a 94 °C, hibridação do iniciador durante 45 segundos a 35 °C com extensão durante 2 minutos a 72 °C e extensão final a 72 °C durante 10 minutos (ERCAN, 2015).

5.6.5.2 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação serão sujeitos a eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão Tris-ácido acético-EDTA por a 80 V durante 1 hora e 30 minutos, o gel será corado com brometo de etídio, e os perfis RAPD serão visualizados sob UV num transiluminador UV e fotografados (ERCAN, 2015).

Juntamente com os produtos amplificados por PCR, um segmento de DNA de 100 pb será utilizado como marcador padrão (ERCAN, 2015).

5.7 Avaliação do efeito antioxidante de óleos essenciais

A avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial ocorrerá por meio de dois métodos: DPPH e ABTS.

5.7.1 Avaliação do efeito antioxidante pelo método DPPH

A determinação da atividade antioxidante será determinada via radical livre DPPH segundo Brand-Willians et. al (1995) com algumas modificações. As amostras de óleo essencial ou das micropartículas serão homogeneizadas em água e submetidas a centrifugação a para separação do sobrenadante. Uma alíquota (0,1 mL) de diferentes concentrações do sobrenadante (concentrações muffin em água) e do precipitado (concentrações de 5,0 g do precipitado em metanol e 5,0 g do precipitado em acetona) de cada amostra de óleo essencial será misturada com 2,46 mL da solução metanólica de DPPH (0,025 g/L) e incubadas por 30 minutos no escuro. A leitura da absorbância será realizada a 515 nm.

A partir da curva de calibração do DPPH e dos valores da absorbância de cada concentração, serão determinados os percentuais de DPPH remanescente. A porcentagem de DPPH remanescente versus a concentração da amostra será plotada para obter a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (EC50). A atividade antioxidante será determinada no sobrenadante do óleo essencial ou micropartículas centrifugados e nos sobrenadantes dos precipitados metanólico, obtido da adição de metanol e cetônico, obtido da adição de acetona com o intuito de extrair o máximo dos constituintes bioativos, em análise, presentes no óleo essencial.

5.7.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS

A determinação da atividade antioxidante será determinada pelo método ABTS descrito por Chen et al. (2011). A solução de ABTS+ será preparada pela reação de ABTS 7 mM (5 mL) e 2,45 mM (88 μ L) de persulfato de potássio, e após será incubada à temperatura ambiente no escuro, durante 16 h.

Posteriormente serpa diluída com etanol a 80% para se obter uma absorbância de $0,700 \pm 0,005$ a 734 nm. A solução ABTS+ (2,7 mL) será cuidadosamente misturada com 0,3 mL das amostras do teste. A mistura de reação será deixada em repouso a 30 °C, durante 30 min, e a absorbância a 734 nm será medida em espectrofotômetro.

5.8 Análise estatística

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 Estatística 7.0 (StatSoft, Inc.).

6 Resultados e impactos esperados

Com este estudo espera-se verificar que o óleo essencial e microencapsulado de semente de fruta do conde (*Annona squamosa*, L.) apresenta efeitos antimicrobiano e antioxidante, potencializados pela microencapsulação, e que estes resultados sejam base para que futuramente este óleo possa ser aplicado como um conservante natural em alimentos, como por exemplo em produtos embutidos cárneos, em adição e/ou substituição de conservantes químicos como nitritos e nitratos, que podem apresentar efeitos carcinogênicos.

8 Orçamento

O orçamento será realizado conforme exposto na tabela 6.

Tabela 6. Orçamento do projeto

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Microplacas de poliestireno com 96 cavidades com tampa	15	80,05
Cloreto de Sódio (NaCl)	Frasco de 500 g	8,20
Ágar Triptona de Soja (TSA)	Frasco de 500 g	207,70
Placas de petri descartável	200 placas	59,60
Extrato de Levedura (YE)	Frasco de 500 g	173,25
Infusão Cérebro e Coração (BHI)	Frasco de 500 g	218,65
Caldo Triptona de Soja (TSB)	Frasco de 500 g	182,75
Etanol P. A.	1 L	15,45
Papel toalha	1 Pacote	14,50
Caixa porta ponteira de 200 microlitros	5	21,00
Ponteiras de 200 microlitros	1000 unidades	6,45
Ponteiras de 300 microlitros	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 ³	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 ₄ .7H ₂ 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
Tris-hcl (tris hidrocloreto; trizma-hcl; cas 1185-53-1)	1kg	206,89
Taq DNA Polimerase 5U/μl (kit c/ tampão 10X e MgCl ₂)	5x500 U	575,00
dNTP set, 100 mM	4 x 250 μL	368,00
Conjunto para PCR (Master Mix)	100 reações	400,00
Agarose	100 g	200,00
Bis acrilamida	25 g	80,00
Azul de bromofenol	10 g	115,00
Brometo de etídio	10 g/mL	110,00
Ladder 100 pb 500 μl	100 reações	330,00
TOTAL		7981,70

9 Referências bibliográficas

1. A.O.C.S. (1993). **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**, 4th Ed. Published by the American Oil Chemists Society, 1608, Broadmoor Drive, Champaign, Illinois 61826-3489.
2. ALALI, F.Q.; LUI, X.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous Acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products Nat. Prod.**, v. 62, p. 504-540, 1999.
3. ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
4. ANDRADE, E.H.A; ZOGHBI, M.G.B; MAIA, J.G.S. Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the Amazon. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 227-232, 2001.
5. ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
6. ANSARI, M.H; AFAQUE, S.; AHMAD, M. Isoricinoleic acid in *Annona squamosa* seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 62, n. 10, 1985.
7. ARAYA, H; SAHAI, M; SINGH, S; SINGH, A.K; YOSHIDA, M; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Squamocin-O(1) and squamocina-O(2), new adjacent bis-tetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v.8, p. 999-1004, 2002.
8. AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
9. BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – Review. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 446-475, 2006.

10. BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos**. 1.ed. Portugal: Forvisão, 2003, 109p.
11. 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.
12. BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p. 123-130, 1999.
13. **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.
14. BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; MONTEIRO, A.J.; MEIRELES, T. E. F.; SIDRIM, J.J.C. Tinea capitis in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brasil: the role of *Trichophyton tonsurans*, **Tropical Medicine Rounds**, v. 43, p. 575-579, 2004.
15. BRITO, H.O.; NORONHA, E.P.; FRANÇA, L.M.; BRITO, L.M.O.; PRADO, M.S.A. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.
16. CAMPOS, M. R. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A. S.; JAYME, L. B.; SANTOS, P. P.; SERAFINI, Á. B 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**, v.36, n.4, p.1221-1227, 2006.
17. CARLSON, J. G.S, CHAVES, M.A.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALVES, J.F.T. A influência da cobertura morta sobre características físicas e químicas dos frutos da pinha (*Annona squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 2, p. 287-291, 2007.

18. CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M.; GRECO, D. P. Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemisiadracunculus*Linn. (*Asteraceae*), variedade inodora – estragão - frente à *Salmonellasp*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.26, p. 75 - 79, 2006.
19. CHAVAN, M.J; SHINDE, D.B.;NIRMAL, S.A. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. bark. **Natural Product Research**, v.8, p. 754-757, 2006.
20. CHEN, Y.; HUANG, B.; HE, J.; HAN, L.; ZHAN, Y.; WANG, Y. In vitro and in vivo antioxidant effects of the ethanolic extract of *Swertia chirayita*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 309-315, 2011.
21. CORDEIRO, M.C.R.; PINTO, A.C.Q.; RAMOS, V.H.V. O cultivo da pinha, fruta do conde ou ata no Brasil. **Circular técnico – Embrapa Cerrado**, n.9, p. 1-52, 2000.
22. COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v.12, n. 4, p. 564-582, 1999.
23. DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 642-645, 2005.
24. DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K.K.; LIU, R.H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal Agricola Food Chemistry**. 2002;50(10):3010-4.
25. DONADIO, L. C.; NACHTIGAL, J. C.; SACRAMENTO, C. K. **Frutas Exóticas**. Jaboticabal: Funep, 1998. 179p.
26. Doneva-Sapceska, D. Free and potentially volatile monoterpenes in grape varieties. **Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia**, v. 25, e. 1, p.51–56, 2006.
27. **EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL**. Instruções técnicas para o cultivo da ateira. Fortaleza, n.1, 1998.
28. **EMBRAPA CERRADOS**. Circular técnico. Planaltina, n. 9, p. 1-52, 2000.

29. ERCAN, F.S. Use of random amplified polymorphic dna (rapd) to detect dna damage induced by prangos ferulacea (umbelliferae) essential oil against the mediterranean flour moth ephestia kuehniella zeller (lepidoptera: pyralidae). **Archives of Biological Science Belgrade.**, v. 67, n.1, p. 235-239, 2015.
30. FAI, A. E. C., FIGUEIREDO, E.A.T.; VERDIN, S.E.F.; PINHEIRO, N.M.S.; BRAGA, A.R.C.; STAMFORD, T.L.M. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência e saúde coletiva**, v.16, n.2, 2011.
31. FAVARO, C.M. **Caracterização e extração do óleo da semente da fruta do conde (Annona squamosa L.)**. 2014. 53f. Trabalho de conclusão de curso. Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeiras.
32. 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.
33. FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1995. 220 p.
34. FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H.S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M.F.G. Antifungal activity of essential oils Croton species from the Brazilian Caatinga biome, **Journal of Applied Microbiology**, v, 104, n. 5, p. 1383-1390, 2007.
35. FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2010, v. 2, 606 p.
36. FREIRE, J.M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química, e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *escherichia coli*, *aspergillus flavus* e *aspergillus parasiticus***.

2008. 85f. Dissertação de mestrado em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras.
37. FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. H. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. **Nature**, v. 359, p. 633- 636, 1992.
38. GOMES, P. **Fruticultura Brasileira**. 11.ed. São Paulo: Nobel, 1987, 446p.
39. GONSALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F.; ABREU, F.C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v.34, n.7, p. 1215-1223, 2011.
40. GONSALVES, J.K.M.C.; COSTA, A.M.B.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H.; NUNES, R.S. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v.5, n.11, p. 102-111, 2009.
41. GURGEL, L.A.; SIDRIM, J.J.C.; MARTINS, D.T.; CECHINEL-FILHO, V.; RAO, V.S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes, **Journal Ethnopharmacol**, v. 97, p. 409- 412, 2005.
42. HAMEDO, H.A. Monitoring of antimicrobial activity of essential oils using molecular markers. **The Open Biotechnology Journal**, v, 3, p. 103-107, 2009
43. **INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC)**. Boletim técnico. Campinas, n. 200, 1998.
44. LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v.3, v.2, p. 87-92, 2002.
45. LEAL, F. Sugar apple. In: NAGY, S.; SHAW, P.E.; WARDOWSKI, W.F.; ed. **Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses**. Lake Alfred: Florida Science Source, 1990, p. 149,158.

46. LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 645–659, 2006.
47. MAAS, P.J.M.; KAMER, H.M.V.; JUNIKKA, L.; SILVA, R.M.; REINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, n.80, p. 65,98, 2001.
48. MACHADO, A.; BARROS, E. **Antimicrobianos em Pediatria - Consulta Rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2006, 296 p.
49. MADIGAN, M. T., et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1126 p.
50. MARQUES, S.A.; CAMARGO, R.M.P.; ABBADE, L.P.F.; MARQUES, M.E.A. Mucormicose: infecção oportunística grave em paciente imunossuprimido. Relato de caso. **Diagnóstico e Tratamento**, v. 15, n. 2, p. 64-68, 2010.
51. MEDINA, R.B.; SILVA, S.R.; RODRIGUES, K.F.D.; AVLÉS, T.C.; KAVATI, R. Produção de mudas de anonáceas. **Coopercitrus**, v.350, 2015.
52. MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
53. NACHTIGAL, G.F. **Espécies de Trichoderma: fungos benéficos a serem favorecidos por práticas adequadas de manejo**. 2012. Artigo em Hypertexto. Disponível em:
<http://www.infobibos.com/Artigos/2012_1/Trichoderma/index.htm>. Acesso em: 12/5/2016
54. NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An Overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1806 – 1815, 2011.
55. NONFON, M ; LIEB, F ; MOESCHLER, H; WENDISCH, D. Four annonins from *Annona squamosa* . **Phytochemistry**, v.29, p. 1951-1954, 1990.

56. 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.
57. **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE** – OMS. Comunicado de prensa del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer sobre el Cáncer evalúa el consumo de la carne roja y de la carne processada. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/cancer-red-meat/es/>. Acesso em 1 de fevereiro de 2016.
58. OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of select plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, n.5, p. 414-420, 2007.
59. PERES, N. D.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62 n.4, 2010.
60. RAHMAN, M.M; PARVIN, S; HAQUE, M.E; EKRAMUL, I.M.; MOSADIKK, M.A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, e.76, p. 484-489, 2005.
61. RAMOS, E.; MACHADO, A.; LOPES, J.G.; COSTA, S.H.M. **Antimicrobianos em ginecologia e obstetrícia.** Porto Alegre: Artmed, 2007, 373 p.
62. REBELLO, F. F. P. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, volume? p. 134-144, 2009.
63. REGUA-MANGIA, A. H., BEZERRA, R.M.P.; ESPARIS, C.M.; TEIXEIRA, L.M. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): Filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista Patologia Tropical**, v. 38, n.1, 2009.

64. ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.
65. RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E; BRITO, E. S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza: EMBRAPA Comunicado Técnico 127, 2007, 4 p.
66. RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E; BRITO, E. S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS +**. Fortaleza: EMBRAPA Comunicado Técnico 128, 2007, 4 p.
67. 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.
68. SILVA-SANTOS, A., ANTUNES, A.M.S.; BIZZO, H.R.; D'AVILA, L.A.; Análise técnica, econômica e de tendências da indústria brasileira de óleos essenciais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 14, páginas, 2006.
69. SILVEIRA, L. M. S. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, n.90, p. 124-128, 2009.
70. SOUZA JÚNIOR, I.T.; SALES, N.L.P.; MARTINS, E.R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v. 22, n.3, p. 77-83, 2009.
71. SOUZA, T. C. R.; PARIZE, A. L.; BRIGHENTE, I. M.M.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M. Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 5, p.511–520, 2005.

72. 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.
73. SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.
74. SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n.4, p. 263 -269.
75. SUNANDA, P.; ANAND, K. Possible amelioration of hyperthyroidism by the leaf extract of *Annona squamosa*. **Current Science**, v.84, p. 1402-1404, 2003.
76. 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.
77. TASSOU, C. C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere on air. **Journal of Food Protection**, n. 59, p. 31-34, 1995.
78. VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg – myrtaceae*. **Revista do Instituto Florestal**, v.18, p. 15-22, 2006.
79. 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.
80. VIANA, J. S. **Implantação de um Pomar de Pinha irrigado no Distrito Federal**. Boletim Técnico UPIS. Brasília, DF. 2005. 37p.
81. VILAÇA, N.S.B. **Encapsulamento de fármacos em zeólitos para utilização no tratamento do carcinoma do colorretal**. 2012. 151 f. Dissertação (Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química) - Universidade do Minho, 2012.

82. WANG, G.; LI, P.; PENG, Z.; HUANG, M. KONG, L. Formulation of vanillin cross-linked chitosan nanoparticles and its characterization. **Advanced Materials Research**, v. 335-336, p.474-477, 2011.

83. WU, Y.C; HUNG, Y.C; CHANG, F.R; COSENTINO, M; WANG, H.K & LEE, K.H. Identification of ent-16 beta, 17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v.6, p. 635-637,1996.

6 RELATÓRIO DE CAMPO

6.1 Amostra

O objetivo inicial do presente estudo foi extrair, microencapsular e avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo de semente de fruta do conde (*Annona squamosa*, L.), entretanto devido à dificuldade de aquisição da amostra e de problemas metodológicos em relação a extração do óleo se tornou inviável a continuação da utilização da semente da referida fruta.

Devido a esses fatos, optou-se pela utilização do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) em substituição a semente de fruta do conde. A escolha deste se deve, principalmente devido ao alto rendimento de extração e comprovada ação frente as bactérias patogênicas. Neste sentido, o objetivo do trabalho passou a ser a extração, microencapsulação e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de cravo-da-índia.

6.2 Encapsulação

Em razão do crescente número de trabalhos utilizando quitosana como material de encapsulação, e a comprovada ação antimicrobiana desta que se tornaria um viés para o estudo, optou-se pela substituição por alginato de sódio.

A utilização da vanilina também foi substituída pelos emulsificantes monoestearato de glicerol e monolaurato de polioxietileno sorbitana em razão de problemas com a aquisição do material.

6.3 Atividade antimicrobiana

Em razão de problemas com tempo viável para o desenvolvimento das análises, optou-se por excluir do projeto a realização da atividade antifúngica do óleo essencial e das micropartículas frente aos fungos *Trichoderma ssp* e *Rhizopus ssp*. Em substituição a esses, foi realizado análise antimicrobiana da bactéria *Salmonella Typhimurium*, e das demais propostas anteriormente: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

Foi retirado do projeto a análise de Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) devido ao tempo e custo da análise, sendo comutada por aplicação e avaliação da ação do óleo essencial puro e das micropartículas aplicadas em um produto cárneo similar a um hambúrguer (avaliação *in situ*) contaminado com bactérias selecionadas.

Os tratamentos que apresentaram atividade bactericida foram submetidos a teste de atividade *in situ* em produto cárneo e avaliado nos tempos 0 e 7 dias.

7 ARTIGO

Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista LWT – Food Science and Technology

Atividade antimicrobiana e antioxidante de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) puro e encapsulado

Resumo

Introdução: A utilização de óleos essenciais tem sido estudada para substituir conservantes químicos com potencial cancerígeno. Dentre eles, o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) apresenta forte ação antioxidante e antimicrobiana frente às principais bactérias patogênicas, mas tem a aplicação limitada em razão do forte odor, portanto a encapsulação se torna uma alternativa viável. *Objetivos:* Extrair, encapsular e avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano do óleo essencial de cravo-da-índia. *Resultados:* O óleo essencial apresentou forte atividade antioxidante e antimicrobiana, tendo efeito bactericida *in vitro* frente a *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* e *in situ* superior a atividade do nitrito frente a *S. aureus*. As partículas de óleo encapsuladas com alginato de sódio e emulsificantes apresentaram alta eficiência de encapsulação, baixa atividade antioxidante e forte ação inibitória frente às bactérias testadas. A adição, das partículas e do nitrito, não promoveu efeito bactericida. *Conclusão:* O óleo essencial de cravo-da-índia puro apresenta forte atividade antimicrobiana podendo ser utilizado para substituição de nitrito em alimentos.

Palavras-chave: *Syzygium aromaticum*; Encapsulação; Bactericida; Emulsificante

Abstract

Introduction: The use of essential oils has been studied to replace chemical preservatives with carcinogenic potential. Among them, clove essential oil (*Syzygium aromaticum*, L.) has a strong antioxidant and antimicrobial action against the main pathogenic bacteria, but it has limited application due to the strong odor, therefore the encapsulation becomes a viable alternative. *Objectives:* To extract, encapsulate and evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of clove essential oil. *Results:* The essential oil presented strong antioxidant and antimicrobial activity, having bactericidal effect *in vitro* against *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* and *in situ* superior to nitrite activity against *S. aureus*. The oil particles encapsulated with sodium alginate and emulsifiers presented high encapsulation efficiency, low antioxidant activity and strong inhibitory action against the tested bacteria. The addition of the particles and the nitrite did not promote bactericidal effect. *Conclusion:* Pure clove essential oil has strong antimicrobial activity and can be used to replace nitrite in food.

Keywords: *Syzygium aromaticum*; Encapsulation; Bactericide; Emulsifier

1 Introdução

Segundo a Agência Internacional de Investigação do Câncer, órgão da Organização Mundial de Saúde, conservantes químicos sintéticos utilizados em produtos embutidos cárneos como os nitritos, apresentam potencial carcinogênico, devido à produção de nitrosaminas (Sindelar & Milkowski, 2011; OMS, 2015).

Diante disto, estudos têm sido realizados para encontrar alternativas viáveis e naturais para a substituição desses na indústria, frente às principais bactérias patogênicas presentes em alimentos, entre elas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*. Dentre as alternativas, há a possibilidade de utilização de compostos antimicrobianos naturais oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas, como os óleos essenciais que apresentam elevada atividade antimicrobiana e antioxidante devido à presença de terpenos e compostos fenólicos (Oliveira et al., 2009; Lang & Buchbauer, 2012;).

O óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) extraído do botão floral seco do craveiro-da-índia apresenta atividades antimicrobianas e antioxidantes devido à presença do eugenol em sua composição (Balasundram, 2006; Chaieb et al., 2007). Porém, por apresentarem intenso odor e serem compostos voláteis, a utilização dos óleos essenciais de forma pura se torna um limitante na indústria; diante disto a encapsulação destes óleos surge como alternativa para a sua aplicação em alimentos (Nedovic et al., 2011).

A encapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia já foi avaliada com a utilização de fosfolipídeos da soja (Sebaaly et al., 2015) e ciclodextrina (Sebaaly et al., 2015), sendo encontrado apenas um estudo com a utilização do alginato de sódio (Soliman et.al, 2013).

O alginato de sódio é um copolímero linear constituído de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4, sintetizado por algas marrons encontradas em regiões costeiras do mar. Esse polímero tem sido utilizado na encapsulação de óleos essenciais, sendo que a suas propriedades podem ser alteradas com a utilização em conjunto de emulsificantes (Müller, 2011; Natrajan et al., 2015; Ghayempour & Mortazavi, 2015)

Dado o contexto exposto, o objetivo do presente estudo foi extrair e caracterizar o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), quanto à composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium. Além disso, encapsular o óleo em alginato de sódio com a utilização de emulsificantes e caracterizar a ação das partículas quanto à eficiência de encapsulação, comportamento térmico, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana *in vitro* e *in situ*.

2. Materiais e métodos

2.1 Aquisição da amostra

As amostras de botões florais secos de cravo-da-índia foram adquiridas no comércio local da cidade de Pelotas – RS e acondicionadas em sacos plásticos até sua utilização.

2.2 Extração do óleo essencial de cravo-da-índia

As amostras de cravo-da-índia foram moídas em moinho de facas (Marconi) e após o óleo essencial foi extraído de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010), por meio do processo de hidrodestilação por arraste a vapor com o auxílio do

equipamento Clevenger durante 3 h. Após a extração, o óleo essencial foi armazenado em frasco âmbar em temperatura de congelamento (-18°C).

2.3 Caracterização do óleo essencial de cravo-da-índia

2.3.1 Rendimento de extração

Para o cálculo de rendimento de extração do óleo, foram acoplados em Clevenger um balão contendo 100 g de cravo-da-índia moído e 100 mL de água destilada e destilados por arraste de vapor por 4 h. Após o conteúdo de óleo foi recolhido em tubo graduado e calculado através da razão entre o teor de óleo em mililitro por 100 g da amostra de acordo com a Farmacopéia Brasileira (Brasil, 2010).

2.3.2 Terpenos

Para a identificação dos compostos presentes no óleo essencial, utilizou-se análise cromatográfica em equipamentos GC/MS, marca Shimadzu QP2010, equipado com um divisor split/splitless e com uma coluna capilar Rtx-5MS Restek (30 m x 0,25 mm x 0,25 microns) nas seguintes condições cromatográficas: transportador de gás de hélio obtido por fragmentos de impacto de elétrons a uma potência de 70 eV de 1,2 mL min⁻¹, 1:50 fluxo dividido e o volume de amostra injetada de 1 µL.

Temperatura programada do forno: a temperatura inicial foi de 40 °C com uma rampa de aquecimento entre 10 °C a 280 °C min⁻¹ mantendo-se estável a essa temperatura durante 10 min. Subsequentemente, a temperatura foi aumentada a uma taxa de 10 °C a 300 °C min⁻¹ durante um tempo total de 41 min com uma temperatura de injetor de 250 °C e temperatura de interface de 300 °C.

Os compostos presentes no óleo foram identificados com base na comparação dos índices de retenção e espectro de massa destes com os padrões presentes na biblioteca NIST EP/EPA/MIH (NIST 05) do aparelho.

2.3.3 Fenólicos totais

O teor total de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Swain & Hills, 1959). Para isto, 0,1 g de óleo essencial de cravo-da-índia foi diluído em 10 mL de metanol e deixado em repouso por 24 h. Após, 1 mL desta solução foi diluído em 9 mL de etanol, desta nova solução foram retirados 0,1 mL e diluídos em 4 mL de etanol, posteriormente, foram retirados 0,5 mL da solução final para a reação, sendo a esta adicionados 250 μ L de solução de Folin-Ciocalteu 0,25 M e deixado reagir por 3 min. Após, 500 μ L de carbonato de sódio 1 M foi adicionado. A reação foi armazenada no escuro por 2 h e após realizada a 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) 100g^{-1} de amostra.

2.3.4 Comportamento térmico

A análise do comportamento térmico do óleo essencial de cravo-da-índia 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 $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, com um fluxo de nitrogênio de 50 mL min^{-1} (Rutz et al., 2013).

2.3.5 Atividade antimicrobiana do óleo essencial

A avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial foi realizada por meio de três metodologias: disco difusão, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Foram testados os efeitos antimicrobianos do óleo essencial sobre as 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). Os resultados de disco difusão foram expresso em mm \pm desvio padrão após três medidas equidistantes dos halos formados, CIM foi expressa em mg mL⁻¹ e CBM com crescimento ou inibição de crescimento do microrganismo.

2.3.5.1 Reativação dos microrganismos

As bactérias utilizadas no experimento foram 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, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Após uma alçada desse crescimento foi estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Entérico Hektoen (HEA) para *S. Typhimurium*, ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli*, ágar Oxford para *L. monocytogenes* e ágar Baird-Paker para *S. aureus*, e incubadas por 24 h a 37 °C, para o isolamento das colônias.

Do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e ressuspensa em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.3.5.2 Disco difusão

A análise de disco difusão foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2005).

A solução salina padronizada contendo o inóculo foi semeada com auxílio de um *swab* estéril na superfície de placas com ágar Muller-Hinton. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm. Após, 10 µL de óleo essencial de cravo-da-índia foram impregnados sobre os discos de papel e as placas incubadas por 24 h a 37 °C. Logo após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição, sendo os resultados expressos em centímetros.

2.3.5.3 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações.

Para isto foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram acrescentadas em cada poço 100 µL de caldo BHI, 100 µL de inóculo (80 µL de caldo BHI e 20 µL de água salina com crescimento bacteriano) e óleo essencial em cinco diferentes concentrações de óleo puro (100 µL de óleo essencial puro); 1:5 (20 µL de óleo essencial e 80 µL de dimetilsulfóxido (DMSO)); 1:10 (10 µL de óleo essencial e 90 µL de DMSO); 1:100 (1 µL de óleo essencial e 99 µL de DMSO) e 1:1000 (0,1 µL de óleo essencial e 99,9 µL de DMSO).

Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação foram avaliadas em espectrofômetro (Biochrom EZ Read 400) a 620 nm. Em seguida, procedeu-se a incubação por 24 h a 37 °C, e após, foi realizada nova leitura em espectrofotômetro.

A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

2.3.5.4 Concentração Bactericida Mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações.

Após a realização da CIM, foram retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri com ágar BHA (*Brain Heart Infusion Agar*) e incubados por 24 h a 37 °C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano.

2.3.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada de acordo com o método proposto por Brand-Willians et al. (1995) com modificações utilizando o ensaio espectrofotométrico DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Para isto, 0,1 g do óleo essencial de cravo-da-índia foi homogeneizado em Ultra-Turrax (Metabo) com 10 mL de metanol. Essa solução foi mantida em repouso por 24 h e após este período foi submetida a centrifugação a 4200 rpm, a 25 °C por 15 min e retirada uma alíquota do sobrenadante para a realização da análise de atividade antioxidante.

Para o preparo da solução concentrada de DPPH, foi diluído 24 mg de DPPH em 100 mL de metanol. Em seguida, foi preparada uma diluição dessa solução, sendo retirado uma alíquota de 20 mL da solução concentrada e adicionado 90 mL de metanol até se obter uma absorbância entre 1,080 – 1,120, com leitura realizada em espectrofotômetro (Jenway 6705 UV/Vis) a 515 nm.

Para a realização da reação foram homogeneizados 0,2 µL da amostra, 98 µL de metanol e 3,8 mL da solução diluída de DPPH, em seguida as amostras ficaram armazenadas em repouso na ausência de luz por 24 h, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 515 nm.

2.3.7 Encapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia

Para a encapsulação, uma solução aquosa de alginato de sódio (GastronomyLab) 2% foi preparada sob agitação a 70 °C (Belalia & Djelali, 2014) e deixada em repouso por 24 h, a 4 °C. Após esse processo a solução de alginato de sódio foi homogeneizada em Ultra-Turrax (Metabo) a 12.000 rpm por 5 min, e quando previsto adicionado de 0,5% de emulsificante monoestearato de glicerol (Vogler) ou monolaurato de polioxietileno sorbitana (Tween 20) (Synth). Em seguida, 1% de óleo essencial de cravo-da-índia foi adicionado e homogeneizado em Ultra-Turrax a 12.000 rpm por 10 min.

A mistura de alginato de sódio, emulsificante quando previsto, e óleo essencial foi adicionada em uma solução de cloreto de cálcio (Vetec) 5% sob agitação em Ultra-Turrax nas mesmas condições descritas. Após esse processo a solução final foi filtrada com o auxílio de uma bomba à vácuo, lavada com água destilada até atingir pH 7,0 e secas em estufa de circulação de ar (Cienlab) a 30 °C durante 48 h. Posteriormente, foram armazenadas em frasco de vidro em congelador (- 4 °C) até a utilização.

Finalizado o processo foi possível o desenvolvimento de três partículas diferentes: a primeira contendo alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia (AO); a segunda composta por alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia (AMO) e a terceira com alginato de sódio, monolaurato

de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia (ATO). Amostras controle foram produzidas da mesma forma, entretanto sem a presença do óleo essencial.

2.4 Caracterização das partículas

2.4.1 Eficiência de encapsulação

A eficiência da encapsulação (EE) dos compostos fenólicos do óleo essencial de cravo-da-índia foi realizada segundo o método proposto por Rutz et al. (2013). A EE foi determinada em função dos compostos presentes na superfície e dentro das partículas. Para isto, 0,1 g de partículas foram homogeneizadas em Ultra-Turrax (Metabo) em 10 mL de metanol e mantidas em repouso por 24 h. Após esse período, a solução foi centrifugada a 4200 rpm, a 25 °C por 15 min, do sobrenadante foram retirados 0,5 mL para a realização da análise. As frações recolhidas foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu (Swain & Hills, 1959), conforme descrito no item 2.3.3. A EE foi dada em porcentagem de compostos fenólicos, conforme equação descrita abaixo.

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

2.4.2 Comportamento térmico

O comportamento térmico das partículas foi determinado pelo método de Calorimetria Diferencial de Varredura conforme descrito no item 2.3.4.

2.4.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das partículas foi realizada através da CIM e CBM, conforme descrito nos itens 2.3.5.3 e 2.3.5.4.

2.4.4 Atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante das partículas foi realizada conforme método descrito no item 2.3.6, entretanto foi utilizado 200 µL da amostra diluída das partículas e 3,8 µL da solução diluída de DPPH.

2.4.5 Atividade antimicrobiana *in situ*

Para a determinação da atividade antimicrobiana *in situ* optou-se por formular um produto cárneo análogo a hambúrguer como alimento teste e realizar uma contaminação artificial deste produto com *S. aureus*, a escolha deste microrganismo foi baseada nos resultados encontrados *in vitro*. Os produtos cárneos foram preparados seguindo as recomendações de Terra (2005) com modificações. A formulação padrão utilizada para a formulação dos tratamentos foi: 57% de carne bovina magra, 10% de gordura suína (toucinho), 15% de gelo, 15% de água gelada, 3% de proteína de soja.

Primeiramente foi realizada a higienização de todos os materiais e utensílios, bancadas e das mãos, utilizando água, detergente e álcool 70%. Após, com o auxílio de uma faca, a carne e o toucinho refrigerados foram cortados em pedaços e posteriormente moídos em moedor de carne (Britânia) com disco de 6 mm. Em seguida, foram misturadas a carne, o toucinho, a proteína de soja previamente hidratada e moída, a água e gelo.

A seguir, foram adicionados a massa obtida, quando previsto, o óleo essencial, as partículas ou conservante nitrito de sódio e o inóculo bacteriano de *S. aureus*. No final do preparo dos hambúrgueres foi adicionado 1 mL de inóculo de *S. aureus* ATCC 10832, previamente crescido em meio caldo Triptona de Soja (TSB) durante 24 h, contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Os produtos cárneos análogos a hambúrgueres foram modelados em placas de Petri com envoltórios plásticos e mantidos sob refrigeração a 4 °C por 15 dias. Na tabela 1 podem-se visualizar as formulações utilizadas neste estudo.

Tabela 1. Formulações dos produtos cárneos análogos a hambúrgueres

Tratamento	Ingredientes
Controle 1	FPPC*
Controle 2	FPPC com adição de inóculo bacteriano de <i>S. aureus</i>
Controle 3	FPPC, com inóculo bacteriano de <i>S. aureus</i> e conservante nitrito de sódio 0,25%
Tratamento 1	FPPC, com inóculo bacteriano de <i>S. aureus</i> e óleo essencial de cravo-da-índia na concentração de 1 µL g ⁻¹
Tratamento 2	FPPC, com inóculo bacteriano de <i>S. aureus</i> e óleo essencial de cravo-da-índia na concentração de 0,1 µL g ⁻¹
Tratamento 3	FPPC, com inóculo bacteriano de <i>S. aureus</i> e partícula AO** na concentração de 0,0239g g ⁻¹
Tratamento 4	FPPC, com inóculo bacteriano de <i>S. aureus</i> e partícula ACO*** na concentração de 0,0071g g ⁻¹

* FPPC – Formulação padrão do produto cárneo: carne, gordura suína, proteína de soja, água e gelo;

AO –Partícula contendo alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia; *AMO –Partícula contendo alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia

2.4.5.1 Enumeração de *S. aureus*

Para avaliar se as amostras de óleo essencial puro ou encapsulado apresentaram atividade antimicrobiana, foi realizada enumeração de *S. aureus* seguindo as recomendações de Downes e Ito (2001) com modificações.

Para isto, foram retiradas 25 g de cada uma das formulações dos produtos cárneos análogos aos hambúrgueres e foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada estéril. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 1:1000 (10^{-3}) com água peptonada estéril (1%).

Após a diluição foram retirados 0,1 mL da solução e transferidas para placas de Petri contendo ágar Baird-Parker, espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas por até 48 h a 37 °C.

A contagem manual das colônias bacterianas foi realizada após 48 h de incubação e os resultados expressos em UFC g⁻¹.

2.5 Análise estatística

A análise estatística da eficiência de encapsulação, da atividade antioxidante e da atividade antimicrobiana foi realizada por meio da análise de variância seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Enquanto a análise da atividade antimicrobiana *in situ* foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Fisher's da diferença mínima significativa - teste LSD ($p < 0,05$).

3 Resultados

3.1 Análises do óleo essencial de cravo-da-índia

3.1.1 Rendimento de extração

O rendimento de extração do óleo essencial de cravo-da-índia foi de 1%.

3.2.1 Terpenos

Na figura 1 é possível visualizar o cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia. Por meio deste estudo detectou-se a presença de três compostos, sendo o eugenol o majoritário com 56,06%, seguido pelo cariofileno com 39,63% e pelo α -cariofileno com 4,31% (Tabela 2).

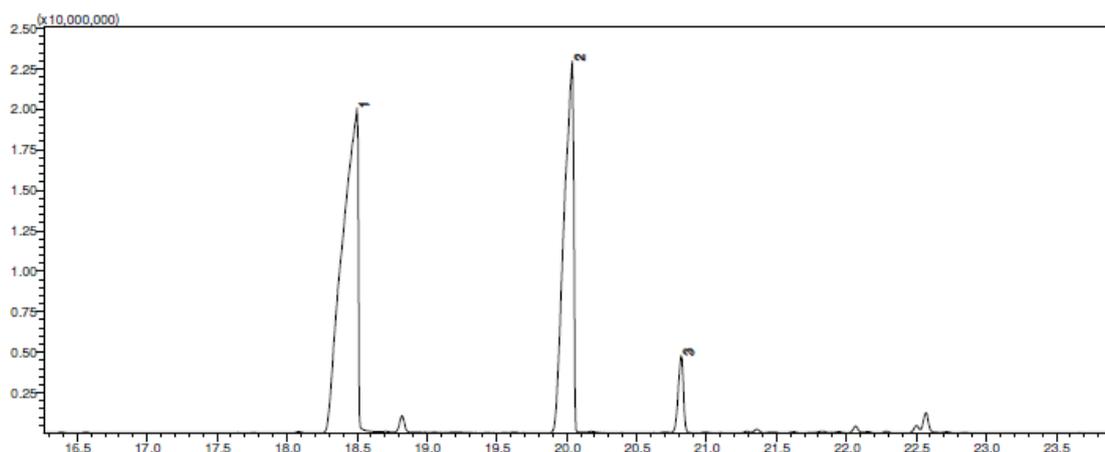


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.)

Tabela 2. Compostos presentes no óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.).

Linha	Tempo de retenção (min)	Quantidade relativa em área do espectro (%)	Composto
1	18,498	56,06	Eugenol
2	20,038	39,63	Cariofileno
3	20,819	4,31	α -cariofileno

3.2.2 Fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos presentes no óleo essencial foi de 9,07 EAG mg g⁻¹ de amostra.

3.2.3 Atividade antimicrobiana

3.1.4.1 Disco difusão

Por meio da técnica de disco difusão foi possível verificar que o óleo essencial de cravo-da-índia puro gerou halos de inibição superiores a 2 cm para as bactérias *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli* (Tabela 3).

Tabela 3. Halos de inibição obtidos pelo método de disco difusão por aplicação de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) frente as bactérias *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Bactérias	Halo de inibição (cm*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,83±0,1
<i>Escherichia coli</i>	2,81±0,3
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,47±0,2
<i>Salmonella Thyphimurium</i>	2,22±0,1

*Média das triplicatas

3.1.4.2 Concentração inibitória mínima

O óleo essencial de cravo-da-índia proporcionou a inibição do crescimento das bactérias *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli* em sua forma pura, e diluída com DMSO nas concentrações 1:5, 1:10, 1:100 e 1:1000 conforme pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) frente as bactérias *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Bactérias	Concentrações (mg mL ⁻¹)			
	Puro	1:5*	1:100*	1:1000*
<i>Salmonella</i> Typhimurium	292,66	60,93	3,047	0,3047
<i>Listeria monocytogenes</i>	292,66	60,93	3,047	0,3047
<i>Staphylococcus aureus</i>	292,66	60,93	3,047	0,3047
<i>Escherichia coli</i>	292,66	60,93	3,047	0,3047

*Número de diluições do óleo essencial com dimetilsulfóxido

3.1.4.3 Concentração bactericida mínima

Quando avaliada a CBM do óleo essencial de cravo-da-índia em sua forma pura ou diluída com DMSO, observou-se que ocorreu a morte bacteriana de *S.*

Typhimurium, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli* em todas as diluições (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração bactericida mínima do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) frente as bactérias *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Bactérias	Concentrações (mg mL ⁻¹)			
	Puro	1:5*	1:100*	1:1000*
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-

*Número de diluições do óleo essencial com dimetilsulfóxido; - Inibição de crescimento do microrganismo

3.1.5 Atividade antioxidante

O óleo essencial de cravo-da-índia na concentração 1:20 (óleo:metanol) apresentou capacidade de inibição de radicais livres de 94,86%.

3.2 Análise das partículas

3.2.1 Eficiência de encapsulação

Obtiveram-se altos valores de EE variando de 83,60% para partículas contendo monolaurato de polioxietileno sorbitana (ATO) a 92,12% para aquelas contendo monoestearato de glicerol (AMO), conforme expresso na tabela 6. Houve diferença significativa na eficiência de encapsulação em função da utilização dos diferentes emulsificantes. Entretanto, não houve diferença significativa entre os valores de EE para a amostra em que não foi utilizado emulsificante (AO) em relação àquela em AMO foi utilizado.

Tabela 6. Eficiência de encapsulação (%) dos compostos fenólicos do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) com alginato de sódio e diferentes emulsificantes

Partículas	Eficiência de encapsulação (%)
AO	90,02±1,8 ^a
AMO	92,12±1,1 ^a
ATO	83,60±1,5 ^b

Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Partículas: (AO) Alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia; (AMO) Alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia; (ATO) Alginato de sódio, monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia.

3.2.2 Comportamento térmico

O comportamento térmico das partículas pode ser visualizado nas figuras 2 (AO), 3 (AMO) e 4 (ATO).

De acordo com os termogramas de DSC do óleo essencial de cravo-da-índia (Figuras 3a, 4a e 5a), um evento endotérmico em 240,50 °C pode ser observado.

Picos endotérmicos foram visualizados nos termogramas dos materiais de parede, para AO em 175,31 °C, AMO em 69,46 °C e 173,15 °C e para ATO em 154,48 °C (Figuras 3b, 4b e 5b).

Nos termogramas das partículas foram identificados eventos endotérmicos, para aquelas AO em 181,19 °C, AMO em 69,06 °C e 171,93 °C, e ATO em 165,31 °C (Figuras 3c, 4c e 5c).

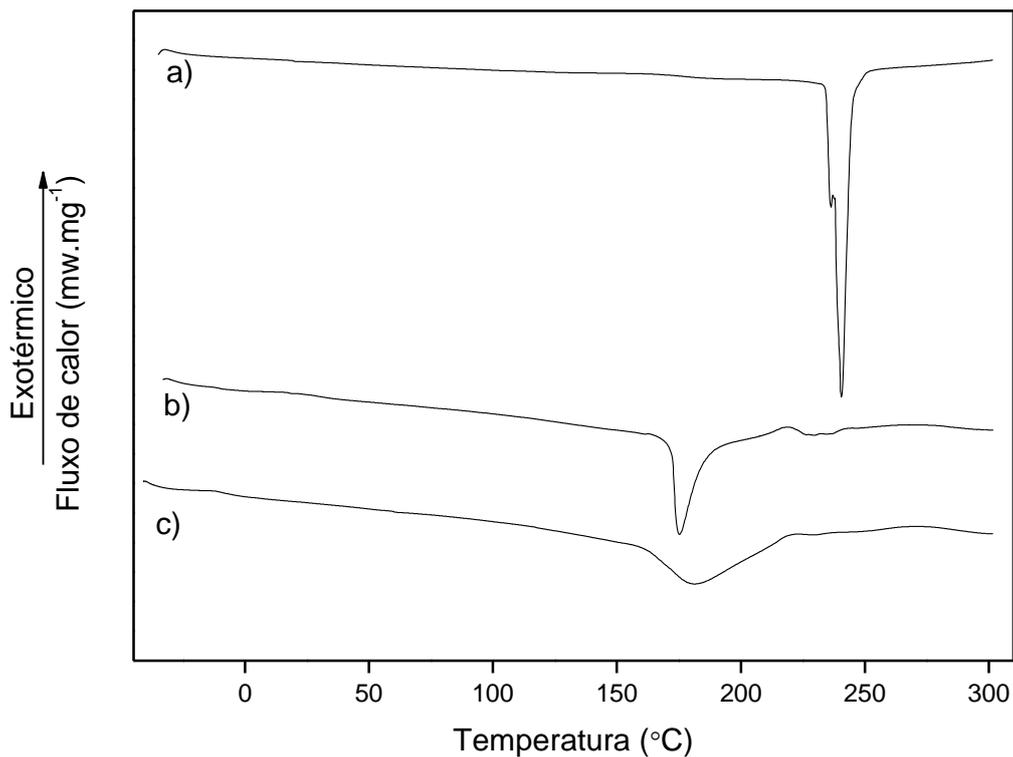


Figura 2. Comportamento térmico da partícula de alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.). a) óleo essencial de cravo-da-índia; b) alginato de sódio; c) partícula de alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia.

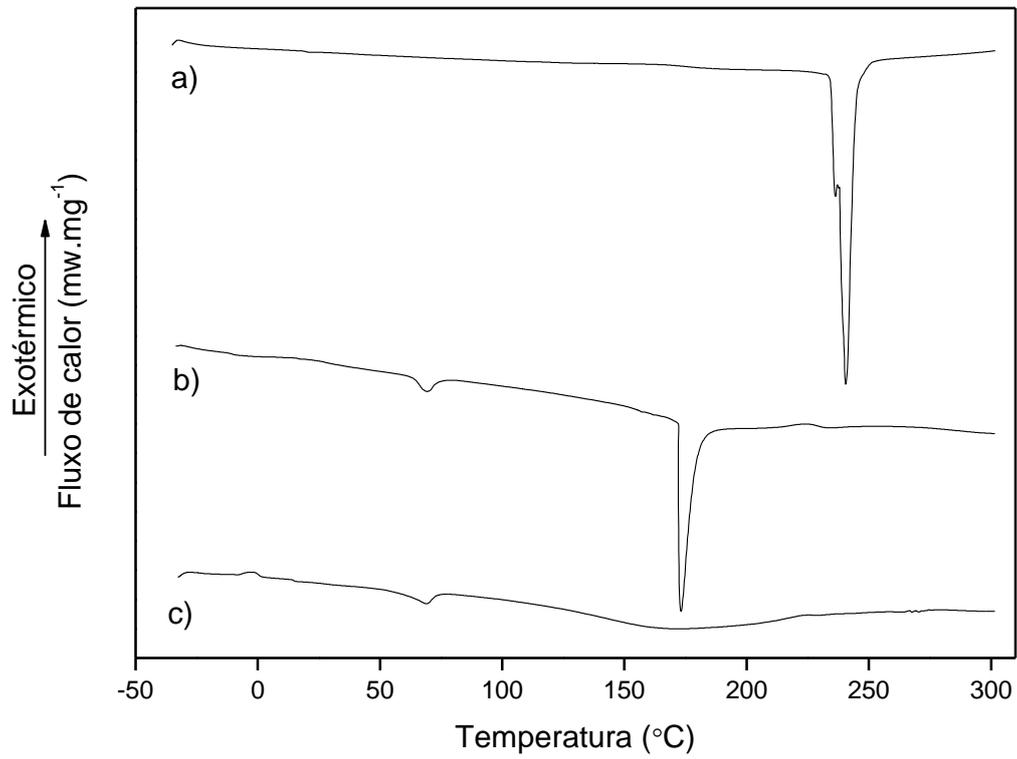


Figura 3. Comportamento térmico da partícula de alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.). a) óleo essencial de cravo-da-índia; b) alginato de sódio e monoestearato de glicerol; c) partícula de alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia.

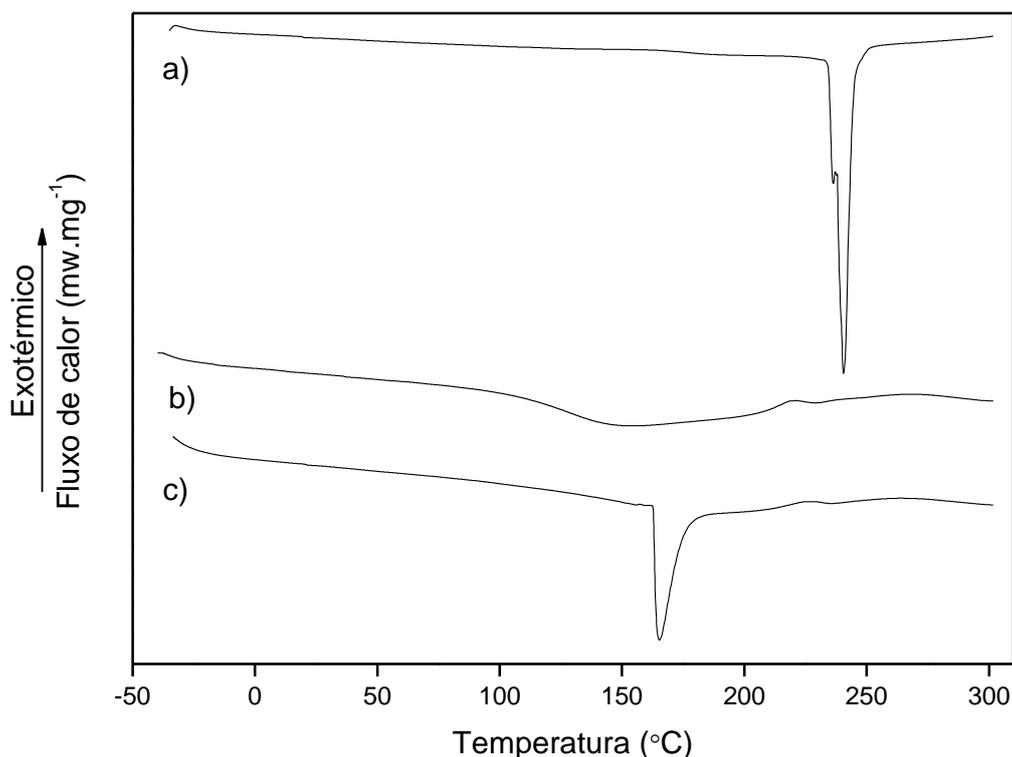


Figura 4. Comportamento térmico da partícula de alginato de sódio, monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.). a) óleo essencial de cravo-da-índia; b) alginato de sódio e monolaurato de polioxietileno sorbitana; c) partícula de alginato de sódio, monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia

3.2.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das partículas na concentração 1:10 (óleo:metanol) pode ser observada na tabela 7. As partículas que apresentaram maior EE (AO e AMO) dos compostos fenólicos do óleo essencial de cravo-da-índia apresentaram maior atividade antioxidante como sequestrante de radicais DPPH. Enquanto as partículas de ATO apresentaram percentual de inibição de atividade antioxidante significativamente menor em relação a ambas.

Tabela 7. Percentual de atividade antioxidante das partículas de alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia com diferentes emulsificantes

Amostra	% de inibição
AO	9,73±0,2 ^a
AMO	7,69±0,4 ^b
ATO	2,16±0,6 ^c

Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Partículas: (AO) Alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia; (AMO) Alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia; (ATO) Alginato de sódio, monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia.

3.2.4 Atividade antimicrobiana

3.2.4.1 Concentração inibitória mínima

A análise da CIM das partículas de óleo essencial diluídas 1:100 e 1:1000 apresentaram inibição de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E.coli* (Tabela 8).

Tabela 8. Concentração inibitória mínima das partículas de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) frente as bactérias *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Bactérias	Concentrações (mg mL ⁻¹)					
	AO		AMO		ATO	
	1:100	1:1000	1:100	1:1000	1:100	1:1000
<i>Salmonella Typhimurium</i>	79,6	7,96	236,66	23,66	124,66	12,46
<i>Listeria monocytogenes</i>	79,6	7,96	236,66	23,66	124,66	12,46
<i>Staphylococcus aureus</i>	79,6	7,96	236,66	23,66	124,66	12,46
<i>Escherichia coli</i>	79,6	7,96	236,66	23,66	124,66	12,46

*Número de diluições com dimetilsulfóxido; Partículas: (AO) Alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia (AMO) Alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia; (ATO) Alginato de sódio, monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia.

3.2.4.2 Concentração bactericida mínima

Quando avaliada a CBM das partículas, observou-se que aquelas contendo AMO promoveram a morte bacteriana de *S. Typhimurium* e *S. aureus* nas diluições 1:100 e 1:1000 e que as partículas de AO promoveram a morte bacteriana de *S.*

aureus na concentração 1:100. Já as partículas de ATO não apresentaram CBM. Na tabela 9 é possível visualizar os resultados encontrados na avaliação da CBM das partículas de óleo essencial de cravo-da-índia.

Tabela 9. Concentração bactericida mínima das partículas de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) frente as bactérias *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Bactérias	Concentrações (mg mL ⁻¹)					
	AO		AMO		ATO	
	1:100	1:1000	1:100	1:1000	1:100	1:1000
<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	+	-	-	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+

*Número de diluições com dimetilsulfóxido; - Inibição de crescimento do microrganismo; + crescimento do microrganismo. Partículas: (AO) Alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia (AMO) Alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia; (ATO) Alginato de sódio, monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia.

3.2.4.3 Análise antimicrobiana *in situ*

Os resultados encontrados para a atividade antimicrobiana *in situ* realizada com produtos cárneos análogos a hambúrgueres como alimentos teste em dois tempos distintos (tempo 0 e tempo 7 dias) frente a *S. aureus* com adição de conservante comercial e das amostras de óleo essencial de cravo-da-índia puro e das partículas encontra-se descrita na tabela 10.

Tabela 10. Análise antimicrobiana *in situ* realizada em produtos cárneos análogos a hambúrgueres como alimento teste com adição de conservante nitrito e das amostras de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) puro e das partículas de óleo frente a *Staphylococcus aureus* em dois tempos distintos

Tratamentos	Concentração de <i>S. aureus</i> (Log UFC g ⁻¹)	
	Tempo 0*	Tempo 7**
Controle sem inóculo	3,69 ^{aA}	4,47 ^{bA}
Controle com inóculo	4,08 ^{aB}	4,90 ^{bB}
Nitrito	3,47 ^{aA}	4,11 ^{bC}
Óleo essencial 1:100***	4,70 ^{aC}	3,84 ^{bD}
Óleo essencial 1:1000****	5,0 ^{aD}	4,47 ^{bE}
Partícula AO 1:100*****	4,0 ^{aA}	4,79 ^{bF}
Partícula AMO 1:1000*****	3,47 ^{aA}	4,74 ^{bG}

* tempo 0 – retirada de amostra para análise após o preparo dos produtos cárneos análogos a hambúrgueres; ** tempo 7 – retirada de amostra para análise após 7 dias de preparo dos produtos cárneos análogos a hambúrgueres; *** óleo essencial de cravo-da-índia na concentração 3,047 mg mL⁻¹; **** óleo essencial de cravo-da-índia na concentração 0,3047 mg mL⁻¹; *****partícula de alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia na concentração 79,6 mg mL⁻¹; *****partícula de alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia na concentração 23,66 mg mL⁻¹. Letras minúsculas diferentes na linha ou maiúsculas diferentes coluna indicam diferenças significativas (p<0,05).

4. Discussão

4.1 Análises do óleo essencial de cravo-da-índia

4.1.1 Rendimento

O rendimento de extração do óleo essencial de cravo-da-índia foi inferior ao encontrado na literatura, com variação de 1,87% a 8,88% (Silvestri et al., 2010;

Hernández-Ochoa et al., 2014). Possivelmente, essa redução na extração do óleo essencial esteja relacionada a variedade e as características de solo e clima da região onde o cravo-da-índia foi produzido (Alma et al., 2007), além das condições de secagem e extração.

4.1.2 Terpenos

O óleo essencial de cravo-da-índia apresentou três componentes: eugenol, cariofileno e α -cariofileno, sendo majoritário o primeiro com 56,06%. Jirovetz et al. (2006) encontraram no óleo essencial de cravo-da-índia 23 compostos, sendo o majoritário eugenol com 76,8%, seguido pelo α -cariofileno com 17,4% e pelo α -humuleno com 2,1%. No estudo de Chaieb et al. (2007) foi detectada a presença de 36 compostos no óleo essencial de cravo-da-índia, sendo os principais eugenol (88,58%), acetato de eugenol (5,62%) e β -cariofileno (1,39%). Alma et al. (2007) observaram a presença de 18 compostos no óleo essencial de cravo-da-índia sendo majoritário o eugenol com 87%, enquanto Oliveira et al. (2009) identificaram 5 componentes no óleo, sendo os principais eugenol com 82,47%, β -cariofileno com 12,22% e acetato de eugenol com 1,89%.

Pode-se constatar que o eugenol constitui o componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia. Os teores de eugenol e a presença de outros compostos, pode ter sido influenciada pela variedade, clima e solo de cultivo das plantas (Oliveira et al., 2009).

Possivelmente, o baixo número de compostos presentes nas amostras tenha sido afetado pelo método e tempo de extração do óleo essencial, o cravo-da-índia do presente estudo foi submetido a extração durante 3 h em Clevenger, enquanto no estudo de Alma et al. (2007) o óleo essencial foi extraído por 3 h em destilador

industrial e o de Oliveira et al. (2009) em Clevenger por 4 h.

4.1.3 Fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos presentes na amostra foi de 9,07 mg EAG g⁻¹, resultado inferior ao encontrado por Babaoglu et al. (2017) (18,59 mg EAG.g⁻¹) e por Wang et al. (2009) (480 mg EAG g⁻¹). Por outro lado, o estudo de Mashkor (2015) relatou baixa concentração de compostos fenólicos no cravo-da-índia (240,70 mg EAG 100 g⁻¹), o que sugere que a concentração seja dependente do método de extração do óleo ou das próprias características da amostra. O principal composto fenólico presente no cravo-da-índia é o eugenol (Ivanovic et al., 2013). No estudo de Adefegha et al. (2016), outros compostos fenólicos foram identificados no cravo-da-índia como: quercitrina, quercetina, campferol, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido cafeico, luteolina, rutina, catequina e o ácido elágico.

4.1.4 Atividade antimicrobiana

4.1.4.1 Disco difusão

A presença e o tamanho dos halos de inibição indicam a suscetibilidade das bactérias frente ao óleo essencial, quando estes forem menores que 0,7 cm são considerados não-ativos frente a bactéria, e quando apresentarem diâmetro maior que 1,2 cm são considerados de efeito inibitório satisfatório (Arora & Kaur, 1999). Assim, o óleo essencial de cravo-da-índia avaliado neste estudo pode ser considerado com efeito inibitório satisfatório, frente a todas as bactérias avaliadas. Entretanto, na literatura diferentes valores são relatados para o óleo essencial de cravo-da-índia.

O halo de inibição formado pelo óleo essencial de cravo-da-índia do presente

estudo frente a *S. aureus* foi de 2,83 cm, valor inferior aos 3,2 cm encontrados por Silvestri et al. (2010) e superior ao halo de inibição de 1,57 cm encontrado por Santos et al. (2011) e 2,5 cm encontrados por Trajano et al. (2009).

Para *E. coli* foi encontrado halo de inibição de 2,81 cm, resultado superior ao 1,97 cm (Silvestri et al., 2010), aos 1,1 cm (Santos et al., 2011) e 2,5 cm de inibição (Trajano et al., 2009), encontrados na literatura.

Quando avaliada a inibição para *L. monocytogenes*, foi encontrado halo de 2,47 cm, sendo este resultado semelhante aos 2,5 cm encontrados em outro estudo (Trajano et al., 2009) e superior a 0,43 cm encontrados por Oliveira et al. (2013).

O halo de inibição formado pelo óleo essencial de cravo-da-índia frente a *S. Typhimurium* apresentou 2,22 cm, resultado inferior ao estudo de Trajano et al. (2009) que encontraram halo de inibição de 2,6 cm e superior aos 1,57 cm encontrados por Silvestri et al. (2010) e 1,1-1,5 cm encontrados por Chaeib et al. (2007).

A presença do halo de inibição formado pelo óleo essencial de cravo-da-índia frente as bactérias avaliadas, se deve, possivelmente, a sua característica lipofílica que permite uma interação entre o óleo e os lipídeos da membrana celular da bactéria alterando a permeabilidade desta (Bakkali et al. 2008; Costa et al., 2011).

4.1.4.2 Concentração inibitória mínima

O óleo essencial de cravo-da-índia apresentou efeito inibitório até a concentração 0,3047 mg mL⁻¹ frente as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*, sem distinção em relação as características das membranas dos microrganismos. A ação do óleo essencial de cravo-da-índia se

deve, principalmente, à presença de eugenol em sua estrutura, pois este composto promove a ruptura da membrana citoplasmática das bactérias, proporcionando o aumento da sua permeabilidade e com isto o extravasamento dos íons e a perda de proteínas intracelulares que levam a morte celular (Devi et al., 2010).

Um óleo deve apresentar CIM de até $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para ter uma forte atividade antimicrobiana; entre $0,6$ a $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para moderada e acima de $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$ para fraca atividade (Duarte et al., 2007), portanto o óleo essencial de cravo-da-índia do presente estudo apresentou forte atividade antimicrobiana.

O estudo de Scherer et al. (2009) que avaliou óleo essencial de cravo-da-índia encontrou para *S. aureus* valores de CIM entre $0,400$ - $0,600 \text{ mg mL}^{-1}$, enquanto outros autores encontraram valores de $0,64 \text{ mg mL}^{-1}$ (Ivanovic et al., 2013) e $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ (Silvestri et al., 2010), sendo os primeiros superiores e o último semelhante ao valor de CIM encontrado no presente estudo ($0,3047 \text{ mg mL}^{-1}$).

Para *E. coli*, foi encontrado valor de CIM de $0,3047 \text{ mg mL}^{-1}$, resultado inferior ao encontrado em outros estudos com óleo essencial de cravo-da-índia, Silvestri et al. (2010) obtiveram CIM de $0,400$ - $0,600 \text{ mg mL}^{-1}$, enquanto o CIM de Silva et al. (2015) foi de $0,550 \text{ mg mL}^{-1}$ e superior ao estudo de Moreira et al. (2005) que encontraram CIM $0,250 \text{ mg mL}^{-1}$.

Quando avaliada CIM para *S. Typhimurium*, Scherer et al. (2009) encontraram valores entre $0,600$ - $0,800 \text{ mg mL}^{-1}$ e Beraldo et al. (2013) de $0,0400 \text{ mg mL}^{-1}$, sendo superiores a CIM do óleo do presente estudo.

A CIM para *L. monocytogenes* encontrada em um estudo com óleo essencial de cravo-da-índia foi entre $0,400$ - $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$ (Oliveira et al., 2013), enquanto

outro apresentou CIM 0,800 mg mL⁻¹ (Beraldo et al., 2013), ambos superiores ao resultado encontrado neste estudo.

As diferenças entre os valores de CIM podem ser em razão do tipo de cultivo da amostra, concentrações das substâncias e diferenças de métodos (Rios & Recio, 2005).

4.1.4.3 Concentração bactericida mínima

Foi possível observar que o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou efeito bactericida até a concentração 0,3047 mg mL⁻¹ para os quatro microrganismos testados.

Esse resultado foi inferior ao CMB de 0,550 mg mL⁻¹ obtida por Silva et al. (2015) e de 0,500 mg mL⁻¹ encontrada por Souza et al. (2016), semelhante ao 0,300 mg mL⁻¹ relatados por Moreira et al. (2005) e superior ao estudo de Fu et al. (2007) que alcançaram 0,250 mg mL⁻¹ para *E. coli*.

Para *S. aureus*, Silva et al. (2015) encontraram CBM de 1 mg mL⁻¹, muito superior ao obtido em nosso estudo, enquanto Fu et al. (2007) encontraram valor inferior de CBM (0,250 mg mL⁻¹).

Quando avaliada CBM para *L. monocytogenes*, o valor encontrado foi superior ao relatado por Beraldo et al. (2013) (0,180 mg mL⁻¹) e por Devi et al. (2010) (0,250 mg mL⁻¹) em óleo essencial de cravo-da-índia.

Devi et al. (2010) obtiveram CBM de 0,250 mg mL⁻¹ para *Salmonella typhi*, resultado inferior ao encontrado no presente estudo.

A morte bacteriana ocorreu, provavelmente, pois os microrganismos

apresentam sensibilidade ao eugenol, que aumenta a permeabilidade da membrana bacteriana (Bara & Vanetti, 1998).

As diferenças entre os teores de CBM encontrados no presente estudo e na literatura, possivelmente, são em razão da concentração de óleo testada para as bactérias, tipo de amostra e método (Rio & Recio, 2005).

4.1.5 Atividade antioxidante

Apesar do óleo essencial de cravo-da-índia ter apresentado baixo teor de compostos fenólicos, o percentual de atividade antioxidante do óleo na concentração de 484,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1:20) (óleo:metanol) foi de 94,86%, resultado superior ao encontrado por Mashkor (2015) (87,5%) e por Silvestri et al. (2010) na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (45,27%), sendo semelhante ao percentual encontrado na concentração de 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que evidencia que o óleo do presente estudo apresenta forte atividade antioxidante. O resultado ainda foi superior a 92,82% encontrado por Sebaaly et al. (2016).

Este efeito da atividade antioxidante, mesmo em baixas concentrações possivelmente pode ser explicado pelo alto poder antioxidante dos componentes do óleo mesmo em quantidades mínimas devido ao efeito sinérgico de interação entre os compostos do óleo essencial.

4.2 Análise das partículas

4.2.1 Eficiência de encapsulação

No presente estudo foi avaliado a utilização de emulsificantes com valores de BHL distintos, 3,8 para o monoestearato de glicerol e 16,7 para o monolaurato de

polioxietileno sorbitana. Isto significa que o primeiro apresenta baixa relação de grupos hidrofílicos/hidrofóbicos e o segundo alta relação. Os valores de BHL informam a solubilidade em óleo ou em água, e podem ser utilizados na predição do tipo de emulsão que será formada. Assim, os emulsificantes de baixos valores de BHL (3 a 6) são predominantemente hidrofóbicos e os emulsificantes com elevados valores (8 a 18) são predominantemente hidrofílicos (Araújo, 2004).

Em função dos resultados, observa-se que as características do emulsificante, influenciaram nos valores de EE, visto que a utilização do emulsificante monoestearato de glicerol, aumentou significativamente a EE do óleo em relação ao monolaurato de polioxietileno sorbitana. Porém, em função do alto valor de EE obtido com a amostra em que não foi utilizado emulsificante, presume-se que a alta velocidade de agitação utilizada no preparo da mistura da solução de alginato e óleo e a composição química do alginato, foram suficientes para produzir uma emulsão.

Possivelmente, a interação do alginato com o óleo essencial de cravo-da-índia tenha ocorrido por meio dos grupos ácidos carboxílicos e hidroxilas do primeiro com os grupamentos polares presentes no óleo, como a hidroxila presente no eugenol, através de ligações íon-dipolo, dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio. No entanto, sugere-se que a presença do emulsificante monoestearato de glicerol, tenha propiciado a encapsulação de outros compostos com características apolares como o cariofileno.

Baixos valores de EE (21 a 48%), em relação a este estudo, foram obtidos por Oliveira et al. (2014) ao encapsular óleo de *Lippia sidoides* com alginato e goma de caju, em diferentes concentrações, com a utilização de monooleato de polioxietileno sorbitana – Tween 80, que apresenta alto valor BHL 15,0. Sebaaly et al. (2015), ao

encapsular óleo essencial de cravo-da-índia com fosfolipídios de soja obtiveram variação de 57,9% a 84,6%. Benavides et al. (2016) ao encapsular óleo essencial de tomilho com alginato de sódio sem a utilização de emulsificantes observaram EE de até 85%, sendo demonstrado que a concentração do óleo e a velocidade aplicada na formação da emulsão, influenciam nos valores.

4.2.2 Comportamento térmico

O evento endotérmico observado no óleo essencial de cravo-da-índia foi atribuído à ebulição dos compostos, segundo Santos et al. (2009), principalmente ao eugenol, cujo evento endotérmico do óleo essencial de cravo-da-índia foi observado em 270,2 °C. Em relação ao evento visualizado somente para o alginato de sódio, para Abulateefeh e Taha (2015) refere-se a entalpia de clivagem da ligação carboxilato-cálcio, formada previamente durante o processo entre o alginato de sódio e o cloreto de cálcio e obtida em 197 °C. De acordo com os autores, o termograma obtido para o alginato de sódio, na ausência do cloreto de cálcio, é distinto do observado, sendo visualizado um evento endotérmico em 85 °C, referente à perda de água. As distintas temperaturas, observadas para os demais materiais de parede, foram influenciadas pela presença dos emulsificantes.

Nos termogramas das partículas AO e AMO não foi identificado o evento característico do óleo essencial de cravo-da-índia e nas partículas ATO houve deslocamento do evento endotérmico, em ambos os casos os comportamentos estão relacionados com a interação da matriz com o óleo, sendo um indicativo do processo de encapsulação (Feyzioglu & Tornuk, 2016; Rutz et al., 2013).

4.2.3 Atividade antimicrobiana

4.2.3.1 Concentração inibitória mínima

As partículas de óleo essencial diluídas 1:100 e 1:1000 apresentaram inibição de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E.coli*, porém em distintas concentrações.

Não houve distinção na inibição dos microrganismos em relação às características das membranas. E independente das partículas, a encapsulação potencializou o efeito antimicrobiano em relação ao óleo puro, possivelmente por ter alterado a hidrofobicidade do óleo. Porém, ao se comparar os resultados da CIM das partículas com as diluições do óleo, percebe-se que o óleo diluído apresentou melhor efeito inibitório que as partículas. Segundo Smith-Palmer et al. (1998), bactérias gram-positivas apresentam maior sensibilidade aos óleos essenciais que as gram-negativas, entretanto a interação do material de parede com o óleo essencial potencializou o efeito inibitório das micropartículas frente a todas as bactérias testadas.

Hill et al. (2012) avaliaram a CIM do óleo essencial de cravo-da-índia encapsulado com β -ciclodextrina contra *S. Typhimurium* e encontraram valor de $0,693 \text{ mg mL}^{-1}$, resultado inferior ao encontrado no presente estudo.

Quando avaliada a CIM das partículas frente a *S. aureus*, o resultado obtido foi superior a faixa de atividade encontrada por Meneses (2016) que objetivou encapsular óleo essencial de cravo-da-índia com lipídios e encontrou CIM para *S. aureus* entre $0,224$ e $0,856 \text{ mg mL}^{-1}$.

Para *E. coli*, o valor de CIM também foi superior ao encontrado por Meneses

(2016), de 0,228 a 0,999 mg mL⁻¹ para óleo essencial encapsulado com lipídios, resultados também inferiores ao de nosso estudo.

A CIM para *L. monocytogenes* variou de 7,96 – 23,66 mg mL⁻¹ entre os tratamentos, estes valores são superiores ao encontrados por Hill et al. (2012) para *L. innocua* em amostras de óleo essencial de cravo-da-índia encapsulado com β-ciclodextrina que foi de 1,155 mg mL⁻¹.

Possivelmente, as diferenças de CIM entre os resultados encontrados e os presentes na literatura seja em razão da utilização de material de parede diferente, diferentes processos de encapsulação, tamanho das partículas, eficiência de encapsulação e interação entre o óleo essencial e os agentes encapsulantes.

4.2.3.2 Concentração bactericida mínima

Quando avaliado o efeito bactericida das partículas AMO na concentração 23,66 mg mL⁻¹, o presente estudo encontrou resultado positivo para *S. aureus* e *S. Typhimurium*, enquanto AO na concentração 79,6 mg mL⁻¹ apresentou CBM para *S. aureus*.

Apesar de, geralmente, os óleos essenciais apresentarem efeito bactericida em menores concentrações em bactérias gram-negativas, pode-se observar um maior efeito bactericida das partículas sobre o *S. aureus*, isso pode ser explicado devido a uma maior sensibilidade das bactérias gram-positivas em relação ao eugenol presente no cravo-da-índia.

Observa-se também uma relação de CIM com a EE%, pois as partículas que apresentaram efeito bactericida foram aquelas que apresentaram maior EE% e, portanto, maior conteúdo de óleo essencial.

Estudos comprovam que a ação bactericida dos óleos essenciais é afetada em maior e menor grau devido ao tipo de material de parede. O trabalho de Hill et al. (2012) que utilizou β -ciclodextrina como material de parede, apresentou CBM contra *S. Typhimurium* na concentração 1,115 mg mL⁻¹, resultado inferior a CBM do presente estudo.

Cui et al. (2015) também encontraram CBM para *S. aureus*, em óleo essencial de cravo-da-índia encapsulado com lipossomas.

Apesar das partículas não terem apresentado CBM para *L. monocytogenes*, um estudo com encapsulação de óleo essencial de cravo-da-índia com lipídios encontrou CBM para *L. innocua* de 1,155 mg mL⁻¹. Enquanto o estudo de Cui et al. (2015) não encontrou CBM frente a *E. coli* em óleo essencial de cravo-da-índia encapsulado em lipossomas, concordando com o resultado encontrado em nosso estudo. A ausência de CBM frente a *E. coli* e *L. monocytogenes* pode ser em razão do tipo de material de parede que não interage com a bactéria ou com as concentrações testadas.

4.2.4 Atividade antioxidante

Apesar do óleo essencial de cravo-da-índia ter apresentado alto percentual de atividade antioxidante, de uma forma geral, baixo percentual de inibição foi obtido com as partículas, possivelmente em função da forte interação entre os compostos fenólicos com o material de parede, pois segundo Pramod et al. (2015) o alginato de sódio apresenta boa compatibilidade com o eugenol. Dentre as partículas, as de AO apresentaram significativamente maior percentual de inibição (9,73%), possivelmente, a ausência do emulsificante tenha facilitado a liberação dos compostos para a reação com o DPPH. Por outro lado, aquelas de ATO

apresentaram significativamente o menor percentual de inibição (2,16%), fato que em parte pode ser explicado pelo menor valor de EE obtido e também em função do tamanho da cadeia e do número de carbonos, pois o maior número de carbonos no monolaurato de polioxietileno sorbitana dificultaria a liberação do óleo retido em relação ao monoestearato de glicerol que apresenta menos carbonos em sua cadeia, o que poderia facilitar a liberação do óleo. Entretanto, esses resultados não são conclusivos, pois outros métodos de análise devem ser realizados.

Os resultados encontrados foram inferiores aos percentuais de atividade antioxidante de outros estudos com encapsulação de óleo essencial de cravo-da-índia: Sebaaly et al. (2016) ao avaliarem a encapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia em ciclodextrina obtiveram percentuais de atividade antioxidante variando entre 92,31 a 89,39%, resultado superior ao encontrado nas partículas do presente estudo, isto possivelmente se deve ao material de parede ser diferente e permitir uma maior liberação dos compostos fenólicos. Enquanto Meneses (2016) encontrou percentual de atividade antioxidante superior a 80% em óleo essencial de cravo-da-índia encapsulado com lipídios.

Essas diferenças de percentuais de atividade antioxidante podem ser relacionadas aos materiais de parede, as características das partículas, como tamanho e carga, além do método de análise.

4.3 Análise antimicrobiana *in situ*

Quando avaliada a atividade antimicrobiana *in situ* dos produtos cárneos análogos a hambúrgueres, foi possível observar que os óleos essenciais nas concentrações 3,047 mg mL⁻¹ (1:100) e 0,3047 mg mL⁻¹ (1:1000) promoveram controle microbiológico de *S. aureus* sendo mais efetivo do que o conservante

comercial nitrito.

Em razão do nitrito poder formar nitrosaminas que podem apresentar potencial cancerígeno, a substituição total ou parcial deste por óleo essencial de cravo-da-índia se torna uma alternativa viável de conservante natural, pois promoveu resultados de controle microbiológicos superiores. Porém, sabe-se que os nitritos, além da atuação como antimicrobianos, também atuam gerando características sensoriais típicas de produtos cárneos como cor e sabor, sendo a sua substituição total pelo óleo possível, desde que se encontrem também alternativas para suprir as características sensoriais esperadas nestes produtos.

As partículas de óleo essencial de cravo-da-índia permitiram crescimento de *S. aureus*, mas também foi possível verificar crescimento nas amostras que continham conservante nitrito. O estudo de Cui et al. (2015) aplicou óleo essencial de cravo-da-índia em tofu e verificou que este promoveu controle de crescimento de *S. aureus* em concentrações diferentes da utilizada no presente estudo.

5 Conclusão

Pode-se concluir que o óleo essencial de cravo-da-índia puro apresenta forte atividade antioxidante, podendo ser utilizado para o controle dos radicais livres. Também apresentou forte ação inibitória e bactericida frente a *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* testadas *in vitro*. Ainda, apresentou efeito inibitório frente a *S. aureus* testado *in situ* em produtos cárneos análogos a hambúrgueres, verificando-se o potencial do óleo para ser utilizado como uma alternativa a conservantes químicos sintéticos com potencial carcinogênico em alimentos.

As partículas obtidas apresentaram alta eficiência de encapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia, baixa atividade antioxidante, maior ação inibitória em relação ao óleo puro, independente do microrganismo avaliado, porém o efeito bactericida *in vitro* foi dependente do material de parede e do microrganismo avaliado. Observou-se efeito bactericida das partículas frente a *S. aureus* e *S. Typhimurium* sendo, portanto, também, uma alternativa de conservante.

Quando avaliada a aplicação *in situ* das partículas em produtos análogos a hambúrgueres observou-se que estas permitiram o crescimento bacteriano, assim como o conservante químico nitrito.

6 Referências bibliográficas

Abulateefeh, S.R., Taha, M.O. (2015). Enhanced drug encapsulation and extended releases profiles of calcium-alginate nanoparticles by using tannic acid as a bridging cross-linking agent. *Journal of Microencapsulation*, 32, 96-105.

Adefegha, S.A., Oboh, G., Oyeleye, S.I., Osunmo, K. (2016). Alteration of starch hydrolyzing enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phenolic profile of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) by cooking duration. *Food Science e Nutrition*, 4, 250-260.

Alma, M.K., Ertas, M., Nitz, S., Kollmannsberger H. (2007). Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated turkish clove (*Syzygium aromaticum*, L.). *BioResources*, 2, 265-269.

Araújo, J.M.A (2004). *Química de alimentos*. Viçosa: UFV.

Arora, D.S., Kaur, J. (1999). Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobials Agents*, 12, 257-262.

Babaoglu, H.C., Bayrak, A., Ozdemir, N., Ozgun, N. (2017). Encapsulation of clove essential oil in hydroxypropyl beta-cyclodextrin for characterization, controlled release, and antioxidant activity. *Food Processing and Preservation*, 13202.

Bakkali, F., Averbeck, S., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.

Bara, M.F.V., Vanetti, M.C.D. (1998). Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 7, 22 – 34.

Belalia, F., Djelali, N. (2014). Rheological properties of sodium alginate solutions. *Revue Roumanie de Chimie*, 59, 135-145.

Benavides, S., Cortés, P., Parrada, J., Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77-83.

Beraldo, C., Daneluzzi, N.S., Scanavacca, J., Doyama, J.T., Fernandes Júnior, A., Moritz, C.M.F. (2013). Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, 43, 436-440.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.

BRASIL (2010). *Farmacopeia Brasileira, v. 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Brasília: Anvisa.

Brasil. 1999. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. *Métodos de análise microbiológica para alimentos*. Coordenação de Laboratório Animal.

Cabral, I. S. R., Prado, A., Bezerra, R.M.N., Alencar, S.M., Ikegaki, M., Rosalen, P.L. (2009). Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, 32, 1523-1527.

Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum*, L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy research*, 21, 501-506.

CLSI – Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (2005). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada, 23, 1. http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Accessed 10/01/17.

Costa, A.R.T., Amaral, M.F.Z.J., Martins, P.M., Paula, J.A.M., Fiuza, T.S., Resvenzol, L.M.F., Paula, J.R., Bara, M.T.F. (2011). Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 13, 240 – 251.

Cui, H., Zhao, C., Lin, L. (2015). The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. *Food Control*, 56, 128 -134.

Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., Pandian, S.K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 107-115.

Downes, F. P., Ito, H. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed.). Washington: American Public Health Association.

Duarte, M. C. T., Leme, C., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G. (2006). Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8, 139-143.

Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and Rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy research*, 21, 989 – 994.

Hill, L.E., Gomes, C., Taylor, T.M. (2012). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 51, 86-93.

Ivanovic, J., Drimitrijevic-Brankovic, S., Misic, D., Ristic, M., Zizovic, I. (2013). Evaluation and improvement of antioxidante and antinbacterial activities of supercritical extracts from clove buds. *Journal of Functional Foods*, 5, 416-423.

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 6303-6307.

Lang, G., Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 13–39.

Mashkor, I.M.A.A. (2015). Evaluation of antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum*). *International Journal of Chemical Science*, 13, 23-30.

Meneses, A.C. (2016). *Encapsulação de óleo de cravo em nanopartículas lipídicas e poliméricas em sistema livre de solvente*. 155f. (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina.

Moreira, M.R., Ponce, A.G., Valle, C.E., Roura, S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oil to reduce a foodborne pathogen. *LWT – Food Science and Technology*, 38, 565 – 570.

Müller, J.M., Santos, R.L., Brigido, R.V. (2011). Produção de Alginato por Microrganismos. *Polímeros*, 21, 305-310.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An Overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1,1806–1815.

Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Goulart, M.O.F., Silva, C.A., Bechara, E.J.H., TREVISAN, M.T.S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32, 689-702.

Oliveira, E.F., Paula, H.C.B., Paula, R.C.M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. (2014). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 146-151.

Oliveira, T.L.C., Cardoso, M.G., Soares, R.A., Ramos, E.M., Piccoli, R.H., Tebaldi, V.M.R. (2013). Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 357-365.

Organização Mundial da Saúde – OMS. Comunicado de prensa del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer sobre el Cáncer evalúa el consumo de la carne roja y de la carne processada. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/cancer-red-meat/es/>. Accessed 13/12/16.

Pramod, K., Suneesh, C.V., Shanavas, S., Ansari, S.H., Ali, J. (2015). Unveiling the compatibility of eugenol with formulation excipients by systematic drug-excipient compatibility studies. *Journal of Analytical Science and Technology*, 6, 1 -14.

Rio, J.L., Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80 – 84.

Rutz, J.K., Zambiasi, R.C., Borges, C.D., Krumreich, F.D., Luz, S.R., Hartwig, N., Rosa, C.G. (2013). Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1256-1265.

Salles, R.K., Goulart, R. (1997). Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. *Revista de Saúde Pública*, 31, 131-139.

Santos, A.L., Chierice, G.O., Kenneth, S.A., Riga, A., Matthews, E. (2009). Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 96, 821-825.

Santos, J.C., Carvalho Filho, C.D., Barros, T.F., Guimarães, A.G. (2011). Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. *Semina: Ciências Agrárias*, 32, 1557-1564.

Scherer, R., Wagner, R., Duarte, M.C.T., Godoy, H.T. (2009). Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11, 442-449.

Sebaaly, C., Charcosset, C., Stainmesse, S., Fessi, H., Greige-Gergesa, H. (2016). Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: From laboratory to large scale using a membrane contactor. *Carbohydrate Polymers*, 138, 75-85.

Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chemistry*, 178, 52–62.

Silva, A.A., Anjos, M.M., Ruiz, S.P., Panice, L.B., Mikcha, J.M.G., Machinski Junior, M., Abreu Filho, B.A. (2015). Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e dos conservantes benzoate de sódio e sobato de potássio em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 33, 111-117.

Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M.H., Santos, R. F. S., Gomes, R. A. R. (2007). *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. (3th ed.). São Paulo: Varela.

Silva-Santos, A., Antunes, A.M.S., Bizzo, H.R., D'Avila, L.A. (2006). Análise técnica, econômica e de tendências da indústria brasileira de óleos essenciais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8, 14.

Silvestri, J.D.F., Paroul, N., Czyewski, E., Lerin, L., Rotava, I., Cansian, R.L., Mossi, A., Toniazzo, G., Oliveira, D., Treichel, H. (2010). Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Revista Ceres*, 57, 589-594.

Sindelar, J.J., Milkowski, A.L. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curity and examining the risk/benefits of its use. *American Meat Science Association*, 3.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 118–122.

Soliman, E.A., El-Moghazy, A.Y., El-Din, M.S.M., Massoud, M.A. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 3, 48-55.

Souza, A.A., Dias, N.A.A., Piccoli, R.H., Bertolucci, S.K.V. (2016). Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre

Escherichia coli enterotoxigênica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18, 105 – 112.

Swain, T., Hills, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica* I.- The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10, 63-68.

Tassou, C. C., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. (1995). 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*, 59, 31-34.

Terra, N. N. (2005). *Apontamentos em Tecnologia de Carnes*. São Leopoldo: Editora da Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

Trajano, V.N., Lima, E.O., Souza, E.L., Travassos, A.E.R. (2009). Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 542-545.

Wang, H.F., Wang, Y.K., Yih, K.H. (2009). DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five kinds of essential oils. *International journal of cosmetic science*, 31, 475 -476.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de cravo-da-índia apresentou um rendimento de extração inferior ao presente na literatura, entretanto estas diferenças são em razão do clima e solo de cultivo da amostra, além do tipo de extração.

O principal constituinte do óleo essencial de cravo-da-índia foi o eugenol que é o principal responsável pela atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo.

Foi encontrado baixo teor de compostos fenólicos na amostra, entretanto estes mesmo que em baixas quantidades promoveram forte atividade antioxidante.

O óleo apresentou também efeito inibitório e bactericida frente a *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* mesmo em concentrações baixas (0,3047 mg mL⁻¹).

O óleo puro possui ótimo desempenho *in situ* frente a *S. aureus*, sendo superior a ação do conservante químico nitrito que apresenta potencial cancerígeno, o que demonstra potencial para sua aplicação em produtos cárneos análogos a hambúrgueres. Quando avaliada análise *in situ* frente a *S. aureus*, observa-se crescimento bacteriano, entretanto é possível notar que este também manteve-se viável nas amostras com conservante químico nitrito.

A encapsulação do óleo essencial com alginato de sódio promoveu uma alta eficiência de encapsulação quando sozinho ou associado ao emulsificante monoestearato de glicerol, entretanto a utilização do Tween 20 com alginato de sódio promoveu uma menor eficiência. Independente do tratamento, a encapsulação foi confirmada pela técnica de Calorimetria Diferencial de varredura.

Todas as partículas obtidas apresentaram baixa atividade antioxidante, proporcional à sua eficiência de encapsulação.

As partículas apresentaram também efeito inibitório frente a *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*, entretanto apenas dois dos tratamentos apresentaram efeito bactericida frente a *S. aureus* e *S. Typhimurium*.

Quando avaliada a aplicação *in situ* das partículas em produtos análogos a hambúrgueres observou-se que estas permitiram o crescimento bacteriano, assim como o conservante químico nitrito. Em função disto, ficou demonstrado o potencial do óleo essencial de cravo-da-índia puro para o controle microbiológico em alimentos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .

ABULATEEFEH, S.R.; TAHA, M.O. Enhanced drug encapsulation and extended releases profiles of calcium-alginate nanoparticles by using tannic acid as a bridging cross-linking agent. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, p. 96-105, 2015.

ADEFEGHA, S.A.; OBOH, G.; OYELEYE, S.I.; OSUNMO, K. Alteration of starch hydrolyzing enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phenolic profile of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) by cooking duration. **Food Science e Nutrition**, v. 4, p. 250-260, 2016.

AFFONSO, R.S.; RENNÓ, M.N.; SLANA, G.B.C.A.; FRANÇA, T.C.C. Aspectos químicos e biológicos de óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.2, p.146-161, 2012.

ALMA, M.H.; ERTAS, M.; NITZ, S.; KOLLMANNNSBERGER, H. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). **BioResources**, v. 2, n.2, p.265-269, 2007.

ALMEIDA, A.C.A.; OLIVEIRA, L.; PAULO, P.D.; MARTINS, E.R.; SOUZA, R.M.; FIGUEIREDO, L.S.; SANTOS, C.A.; FONSECA, H.C. Potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.) em carne moída de ovinos contaminada experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, n.4, p. 248-451, 2013.

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, J.M.A. **Química de alimentos**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2004, 478p.

ARORA, D.S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. Internation. **Journal of Antimicrobials Agents**, v. 12, p. 257-262, 1999.

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

BABAUGLU, H.C.; BAYRAK, A.; OZDEMIR, N.; OZGUN, N. Encapsulation of clove essential oil in hydroxypropyl beta-cyclodextrin for characterization, controlled release, and antioxidant activity. **Food Processing and Preservation**, e. 13202, 2017.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 446-475, 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos**. 1.ed. Portugal: Forvisão, 2003, 109p.

BARA, M.F.V.; VANETTI, M.C.D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7, p. 22 – 34, 1998.

BELALIA, F.; DJELALI, N. Rheological properties of sodium alginate solutions. **Revue Roumanie de Chimie**, v.59, n.2, p. 135-145, 2014.

BENAVIDES, S.; CORTÉS, P.; PARRADA, J.; FRANCO, W. Developmente of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77-83, 2016.

BERALDO, C.; DANELUZZI, N.S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J.T.; FERNANDES JÚNIOR, A.; MORITZ, C.M.F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 43, n. 4, p. 436-440, 2013.

BERALDO, C.; DANELUZZI, N.S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J.T.; FERNANDES JÚNIOR, A.; MORITZ, C.M.F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n.4, p. 436-440, 2013.

BONA, T.D.M.M.; PICKLER, L.; MIGLINO, L.B.; KURITZA, L.N.; VASCONCELOS, S.P.; SANTIN, E. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.5, p. 411-418, 2012.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

BRASIL. 1999. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Métodos de análise microbiológica para alimentos**. Coordenação de Laboratório Animal.

BRASIL. 2015. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em: 09/02/2017.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira, v. 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2010, 904p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos por doenças transmitidas por alimentos**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 02 de março de 2017.

BUCHANAN, R.; LINDQVIST, R.; ROSS, T.; SMITH, M.; TODD, E.; WHITING, R. **Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods**. Microbiological Risk Assessment Series, 2004, 267p.

CABRAL, I. S. R.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CAMPOS, M. R. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A. S.; JAYME, L. B.; SANTOS, P. P.; SERAFINI, Á. B 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**, v.36, n.4, p.1221-1227, 2006.

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

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A.B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum*, L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy research**, v.21, p.501-506, 2007.

CLSI – Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (2005). **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada, 23, 1.** http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Accessed 10/01/17.

CONNOR, B.A.; SCHWARTZ, E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. **The Lancet Infectious Diseases**, v.5, n.10, p. 623-628, 2005.

CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, n.2, p. 90-96, 2014.

COSTA, A.R.T.; AMARAL, M.F.Z.J.; MARTINS, P.M.; PAULA, J.A.M.; FIUZA, T.S.; RESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p. 240- 245, 2011.

CUI, H.; ZHAO, C.; LIN, L. The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. **Food Control**, v. 56, p. 128 – 134, 2015.

DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107-115, 2010.

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

DUARTE, M. C. T.; LEME, C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 139-143, 2006.

FAI, A. E. C., FIGUEIREDO, E.A.T.; VERDIN, S.E.F.; PINHEIRO, N.M.S.; BRAGA, A.R.C.; STAMFORD, T.L.M. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência e saúde coletiva**, v.16, n.2, 2011.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA. **Farmacopéia Portuguesa VII**. Lisboa: Infarmed, 2002.

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.

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

FREIRE, J.M.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; ANDRADE, M.A. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p.209-2014, 2011.

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and Rosemary essential oils alone and in combination.

Phytotherapy research, v. 21, p. 989 – 994, 2007.

GHAYEMPOUR, S.; MORTAZAVI, S.M. Preparation and investigation of sodium alginate nanocapsules by different microemulsification devices. **Journal of Applied Polymer Science**, v.132, n.17, 2015.

HILL, L.E.; GOMES, C.; TAYLOR, T.M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 86-93, 2012.

HUNZICKER, G.M. G. M. A novel regulatory system in plants involving mediumchain fatty acids. **Planta**, v. 231, n. 1, p. 143-153, 2009.

IVANOVIC, J.; DRIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S.; MISIC, D.; RISTIC, M.; ZIZOVIC, I. Evaluation and improvement of antioxidante and antinbacterial activities of supercritical extracts from clove buds. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 416-423, 2013.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; SCHMIDT, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 54, p. 6303-6307, 2006.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v.3, v.2, p. 87-92, 2002.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.27, p. 13–39, 2012.

LEE, K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry]. **Food Chemistry**, v.74, p.443-448, 2001.

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

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

MADIGAN, M. T., MARTINCO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1126 p.

MARTINS, O. A.; GRANER, C. A. F. Determinações espectrofotométricas dos íons nitrito e nitrato em sais de cura. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 18, p. 129-156, 2008.

MASHKOR, I.M.A.A. Evaluation of antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum*). **International Journal of Chemical Science**, v. 13, 23-30., 2015.

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; VALLE, C.E.; ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oil to reduce a foodborne pathogen. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, p. 565 – 570, 2005.

MÜLLER, J.M.; SANTOS, R.L.; BRIGIDO, R.V. Produção de Alginato por Microrganismos. **Polímeros**, v. 21, n.4, p. 305-310, 2011.

MÜLLER, P.S. **Microencapsulação de óleo essencial de laranja**. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

NATRAJAN, D.; SRINIVASAN, S.; SUNDAR, K.; RAVINDRAN, A. Formulation of essential oil-loaded chitosan e alginate nanocapsules. **Journal of food and drug analysis**, v.23, p. 23, 560- 568, 2015.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An Overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1806 – 1815, 2011.

OLIVEIRA, A.B.A.; PAULA, C.M.D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M.R.I.; TONDO, E.C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v.30, n.3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, E.F.; PAULA, H.C.B.; PAULA, R.C.M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 146-151, 2014.

OLIVEIRA, R.A.; REIS, T.V.; SACRAMENTO, C.K.; DUARTE, L.P.; OLIVEIRA, F.F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.3, p.771-775, 2009.

OLIVEIRA, T.L.C.; CARDOSO, M.G.; SOARES, R.A.; RAMOS, E.M.; PICCOLI, R.H.; TEBALDI, V.M.R. Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 357-365, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. **Comunicado de prensa del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer sobre el Cáncer evalúa el consumo de la carne roja y de la carne processada**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/cancer-red-meat/es/>. Acesso em 13 de dezembro de 2016.

ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; ANTHONY, S. 2009. **Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0**. Disponível em: <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>. Acesso em 04 de dezembro de 2016.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of select plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, n.5, p. 414-420, 2007.

PASQUALIM, P.; CULPI, T.A.; KAMINSKI, G.A.T; FIN, M.T.; SASSO, D.G.B.; COSTA, C.K.; MIGUEL, M.D.; FUJIWARA, G.M.; RODRIGUES, B.H.; ZANIN, S.M.W. Microcápsulas de alginato de cálcio e óleo vegetal pela técnica de gelificação iônica: um estudo da capacidade de encapsulamento e aplicação dermatológica. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 1, p. 1518-5192, 2010.

PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M.G.; ABREU, L.R.; MORAIS, A.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

PERES, N. D.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62 n.4, 2010.

PRAMOD, K.; SUNEESH, C.V.; SHANAVAS, S.; ANSARI, S.H.; ALI, J. Unveiling the compatibility of eugenol with formulation excipients by systematic drug-excipient compatibility studies. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 6, n.34, p. 1 -14, 2015.

PRINS, C.L.; VIEIRA, I.J.C.; FREITAS, S.P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian society of plant physiology**, v.22, n.2, p.91-102, 2010.

RAMOS, E.; MACHADO, A.; LOPES, J.G.; COSTA, S.H.M. **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.

REGUA-MANGIA, A. H., BEZERRA, R.M.P.; ESPARIS, C.M.; TEIXEIRA, L.M. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): Filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista Patologia Tropical**, v. 38, n.1, 2009.

RIO, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80 – 84, 2015.

ROESLER, R.; MALTA, L.M.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p. 53-60, 2007.

RUTZ, J.K.; ZAMBIAZI, R.C.; BORGES, C.D.; KRUMREICH, F.D.; LUZ, S.R.; HARTWIG, N.; ROSA, C.G. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1256-1265, 2013.

SALLES, R.K.; GOULART, R. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n.2, p. 131-139, 1997.

SANTOS, A. L., SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, A.L.; CHIERICE, G.O.; KENNETH, S.A.; RIGA, A.; MATTHEWS, E. Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 96, p. 821-825, 2009.

SANTOS, J.C.; CARVALHO FILHO, C.D.; BARROS, T.F.; GUIMARÃES, A.G. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1557-1564, 2011.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p. 442-449, 2009.

SEBAALY, C.; CHARCOSSET, C.; STAINMESSE, S.; FESSI, H.; GREIGE-GERGESA, H. Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: From laboratory to large scale using a membrane contactor. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 75-85, 2016.

SEBAALY, C.; JRAIJ, A.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**, v. 178, p.52–62, 2015.

SERVIN, A.L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, p.264-292, 2005.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. *Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.

SILVA, A.A.; ANJOS, M.M.; RUIZ, S.P.; PANICE, L.B.; MIKCHA, J.M.G.; MACHINSKI JUNIOR, M.; ABREU FILHO, B.A. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e dos conservantes benzoate de sódio e sobato de potássio em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. n.1, p. 33, 111-117, 2015..

SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES JUNIOR, A. 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, p. 257-262, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela. 2007, 536 p..

SILVA-SANTOS, A., ANTUNES, A.M.S.; BIZZO, H.R.; D'AVILA, L.A.; Análise técnica, econômica e de tendências da indústria brasileira de óleos essenciais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 14, 2006.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SILVESTRI, J.D.F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHE, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p. 589-594, 2010.

SINDELAR, J.J.; MILKOWSKI, A.L. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curity and examining the risk/benefits of its use. **American Meat Science Association**, n.3, 2011.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118–122, 1998.

SOLIMAN, E.A.; EL-MOGHAZY, A.Y.; EL-DIN, M.S.M.; MASSOUD, M.A. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v.3, p. 48-55, 2013.

SOUZA, A.A.; DIAS, N.A.A.; PICCOLI, R.H.; BERTOLUCCI, S.K.V. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre

Escherichia coli enterotoxigênica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n.1, p. 105 – 112, 2016.

STIEVEN, A.C.; MOREIRA, J.J.S.; SILVA C.F. Óleos essenciais de uvaia (Eugenia pyriformis Cambess): Avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v.34, n.3, p.7-13, 2009.

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.; DALL'GNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

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

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.

TIBÉRIO, C. C.; MALCZEWSKI, L.; WATAYA, E. S.; GARCIA, C. G.; LAZINSKI, L. M.; ZANNIN, D.; FUJIWARA, G. M.; PASQUALIM, P.; NUNES, F. F.; DALARMI, L.; DIAS, J. F.G.; COSTA, C. K.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W. Óleo essencial de cravo da Índia microencapsulado como ativo antienvhecimento. **Visão acadêmica**, v.15, n.3, p. 39-50, 2014.

TRAJANO, V.N.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAVASSOS, A.E.R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 542-545, 2009.

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.

WANG, H. F.; WANG, Y. K.; YIH, K. H. DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five kinds of essential oils. **International journal of cosmetic science**, v.31, n.6, p. 475 -476, 2009.

WILLAERT, R.G.; BARON, G.V. Gel entrapment and microencapsulation: methods, applications and engineering principles. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 12, n. 1-2, p. 5-205, 1996.

10 APÊNDICES

10.1 Apêndice A

As figuras 1, 2 e 3 demonstram a microscopia eletrônica de varredura das partículas AO, AMO e ATO ampliadas 50 e 10000 vezes.

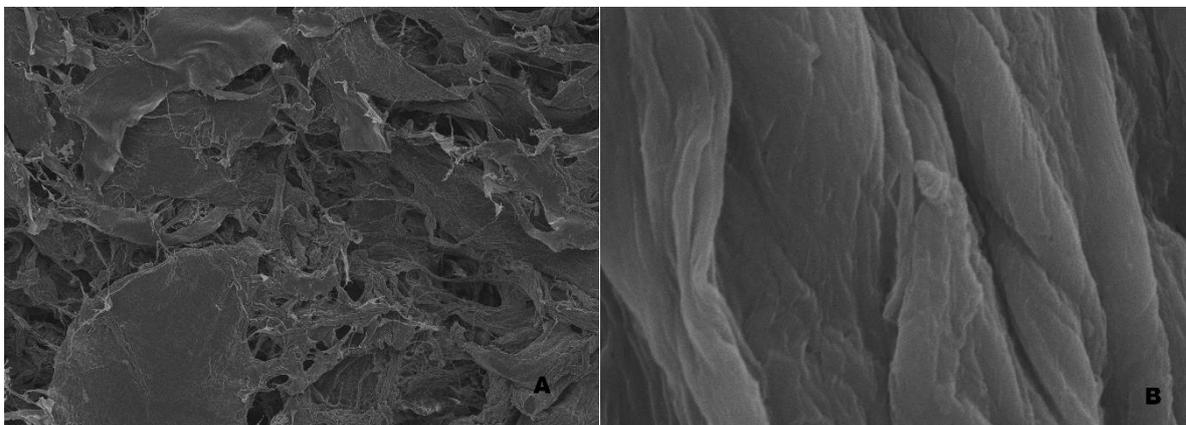


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da partícula de Alginato de sódio e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) ampliada 50 (a) e 10000 (b) vezes

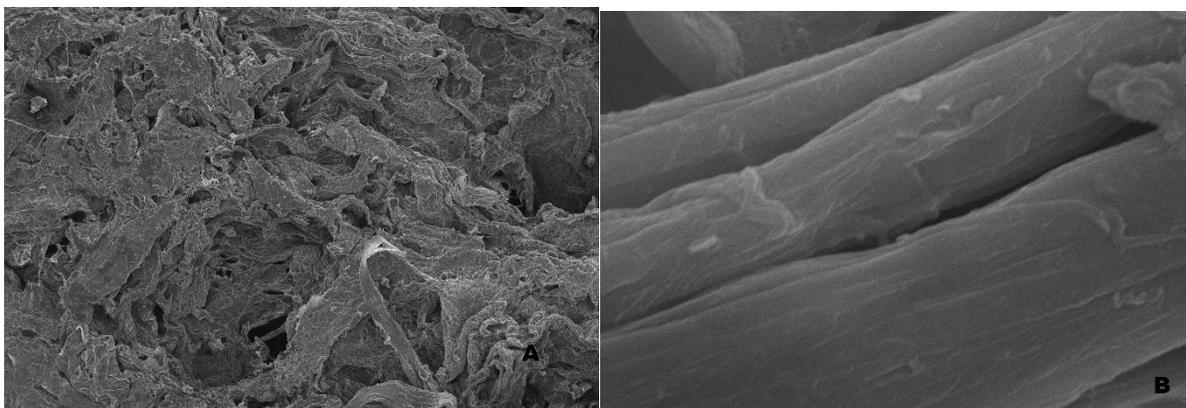


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura da partícula de Alginato de sódio, monoestearato de glicerol e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) ampliada 50 (a) e 10000 (b) vezes

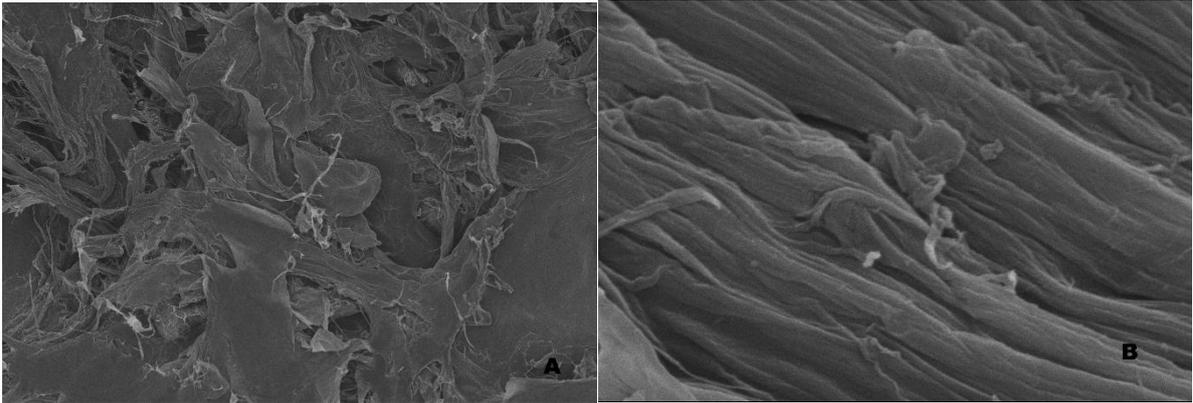


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura da partícula de Alginato de sódio, monolaurato de polioxietileno sorbitana e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) ampliada 50 (a) e 10000 (b) vezes