

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO

TAMIRES SOARES SCHUG¹; MARIANO MICHELON²; JÉSSICA SILVEIRA VITÓRIA³; ELIEZER GANDRA⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – tamiresschug@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – michelonmariano@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – jessicasilveiravitoria@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são compostos derivados de plantas aromáticas que são comumente empregadas na preparação de alimentos, considerados antimicrobianos naturais com ação contra bactérias, vírus e fungos (HUSSEIN et al., 2021). Sendo reconhecidos como seguros para consumo humano como aditivos alimentares pela União Europeia (FAO, 2012).

O óleo de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) têm sido amplamente utilizado na área alimentícia, por possuir forte atividade inibitória contra diversos patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium. Este efeito antibacteriano está relacionado principalmente a presença de timol, que atua na membrana citoplasmática da célula bacteriana, causando danos funcionais e estruturais à membrana, aumentando a permeabilidade e levando a morte. Além do timol o óleo essencial apresenta outros monoterpenos com atividade antimicrobiana como o carvacrol, o c-terpineol, e o p-cimeno (HUSSEIN et al., 2021; ALMASI et al., 2021; LIU & LIU, 2020).

No entanto, sua aplicação em alimentos é limitada devido a sua alta volatilidade, baixa solubilidade em água e transferência de forte sabor e odor ao produto alimentício. Nesse contexto, a aplicação de métodos inovadores, como nanoemulsões, para carrear e possibilitar a incorporação de óleos essenciais em produtos alimentícios, tem despertado interesse como uma forma de enfrentar essas dificuldades (ALMASI et al., 2021).

As nanoemulsões (NEs) são sistemas coloidais, cineticamente estáveis, que necessitam de alta energia mecânica para a sua formação. São caracterizadas como uma emulsão óleo/água com tamanho médio de gotícula que varia de 50 a 1000 nm e necessitam de baixas concentrações de surfactantes para a sua formulação (ALMASI et al., 2021). Diversos autores reportam o uso de nanoemulsão como alternativa para aumentar a biodisponibilidade de óleos essenciais (HE et al., 2021; HOJATI et al., 2022; SNOUSSI et al. 2022). Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, das nanoemulsões de óleo essencial de tomilho.

2. METODOLOGIA

As nanoemulsões foram preparadas no Laboratório de Microbiologia e Biosseparação da Escola de Química de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil. A fase oleosa (10% m/m) da nanoemulsão foi composta

por óleo essencial de tomilho e óleo de girassol, enquanto a fase aquosa (89% m/m) foi composta de água Milli-Q e Tween 20 (1% m/m) como surfactante. Duas formulações foram feitas, com variação da composição da fase oleosa, F1(1% de óleo essencial de tomilho e 9% de óleo de girassol) e a F2 (5% de óleo essencial de tomilho e 5% de óleo de girassol).

Primeiramente, a fase aquosa foi preparada por meio da homogeneização de Tween 20 e água Mili-Q, com auxílio de um agitador magnético por 5 min. Em seguida foi pesada a fase oleosa e após dispersa na fase aquosa e efetuada a homogeneização em Ultra Turrax (Modelo IKA T10 Basic) a 21.100 rpm por 3 min, seguida de Ultrassom (Modelo QSonica-Q700) a 40% de amplitude por 1 min. A metodologia utilizada seguiu as recomendações de GUO et al. (2020) e YANG et al. (2022), com modificações.

Foram efetuadas análises com relação ao tamanho das gotas, índice de polidispersividade e potencial Zeta (ζ), 24 h após a homogeneização. As emulsões foram avaliadas por espalhamento de luz dinâmica, utilizando o equipamento Litesizer 500 (Anton Paar, Brasil) conforme WAN et al. (2019).

A avaliação do efeito antimicrobiano foi realizada por meio de duas metodologias fenotípicas: concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. Foram testados os efeitos antimicrobianos da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (NEOT) frente as cepas padrão das espécies de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). O inóculo bacteriano utilizado foi padronizada na escala de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com o protocolo proposto pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (2012) com pequenas modificações. Para isto foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram acrescentados em cada poço 100 μ L de caldo BHI, 100 μ L de inóculo (80 μ L de caldo BHI e 20 μ L de água salina com crescimento bacteriano) e a NEOT em cinco diferentes concentrações (100 μ L de NEOT); 1:5 (20 μ L de NEOT e 80 μ L de caldo BHI); 1:1 (50 μ L De NEOT e 50 μ L de BHI); 1:10 (10 μ L de NEOT e 90 μ L de BHI); 1:100 (1 μ L de NEOT e 99 μ L de BHI). Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação foram lidas em espectrofômetro (Biochrom EZ Read 400) em 620 nm. Em seguida, foram incubadas por 24 h a 37 °C, e após, foi realizada nova leitura em espectrofotômetro.

Após a realização da CIM, foram retirados 15 μ L dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri com ágar soja triptona (TSA) e incubados por 24 h a 37 °C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor do potencial Zeta é utilizado como indicativo de estabilidade das gotículas de óleo contra agregação e coalescência. As nanoemulsões apontaram valores de - 33,59 mV e - 27,42 mV, para F1 e F2 respectivamente. Diversos autores relatam que valores absolutos próximos a 30 mV estão relacionados com a força de repulsão eletrostática e alta estabilidade físico-química (LIU & LIU, 2020; MIRSHARIFI et al., 2023).

O diâmetro médio das nanoemulsões foi de 282,9 nm para F1 e 201,7 nm para F2, demonstrando a estrutura adequada da nanoemulsão. Pequenas dimensões de gotículas podem significar que as nanoemulsões apresentam uma boa

estabilidade física contra separação gravitacional, floculação e coalescência (CHANG et al., 2015).

O índice de polidispersão (PDI) representa a homogeneidade do tamanho da gota na nanoemulsão, nas amostras analisadas foi possível observar valores de 0,2625 para F1 e 0,2719 para F2. Este resultado indica que há uniformidade nos tamanhos das gotas da nanoemulsão. Um valor pequeno de PDI (<0,08) indica partículas quase monodispersas, enquanto um valor grande de PDI (>0,7) mostra uma ampla distribuição de tamanho de partícula (MIRSHARIFI et al., 2023).

Na técnica de CIM as formulações F1 e F2 apresentaram ação inibitória frente as duas bactérias, sendo a formulação F2 a que apresentou a menor concentração inibitória, de 0,0002 $\mu\text{L}.\mu\text{L}^{-1}$. Já na técnica de CBM apenas a formulação F2 apresentou ação bactericida, que foi de 0,0083 $\mu\text{L}.\mu\text{L}^{-1}$ para *E. coli* e 0,0002 $\mu\text{L}.\mu\text{L}^{-1}$ para *S. aureus* (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana de nanoemulsões de óleo essencial de tomilho por meio da técnica de CMI e CBM.

Formulações	CMI ($\mu\text{L}.\mu\text{L}^{-1}$)		CBM ($\mu\text{L}.\mu\text{L}^{-1}$)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Óleo de tomilho	0,003	0,003	0,003	0,003
F1	0,0003	0,00003	ND	ND
F2	0,0002	0,0002	0,0083	0,0002

*ND- Não detectado. F1- Formulação com 1% de óleo essencial de tomilho; F2- formulação com 5% de óleo essencial de tomilho.

Assim como ocorreu neste estudo, GUO et al. (2020) e Zhang et al. (2020), também verificaram que a estratégia de utilizar o óleo essencial de tomilho na forma de nanoemulsão aumentou a efetividade do efeito inibitório deste óleo essencial. GUO et al. (2020) avaliaram o efeito antimicrobiano sinérgico de ultrassom e nanoemulsão de óleo essencial de tomilho contra *Escherichia coli* O157:H7. Os resultados mostraram que houve uma redução da população de *E. coli* em até 7,72 logs. Isso ocorreu pois a nanoemulsão com ultrassom aumentou notavelmente a permeabilidade da membrana celular, alterando a morfologia e a microestrutura das células bacterianas, resultando em mais vazamento de constituintes internos.

Em outro estudo, realizado por Zhang et al. (2020), foram avaliadas as propriedades de automontagem do caseinato de sódio para preparar nanoemulsões com caseinato e óleo essencial de tomilho, observou-se que a nanoemulsão melhorou a atividade antimicrobiana do óleo de tomilho contra *E. coli* O157:H7 e *S. aureus*.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que as nanoemulsão de óleo essencial de tomilho apresentaram forte atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* testadas *in vitro*.

A formulação F2 que continha 5% de óleo essencial de tomilho foi selecionada para dar seguimento a próxima fase do estudo, uma vez que foi a nanoemulsão que apresentou melhor ação antibacteriana para as duas bactérias investigadas. A nanoemulsão de óleo essencial de tomilho pode ser aplicada em uma matriz alimentar como antimicrobiano natural, reduzindo assim o uso de conservantes sintéticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMASI, L.; RADİ, M.; AMİRİ, S.; TORRİ, L. Fully dilutable *Thymus vulgaris* essential oil:acetic or propionic acid microemulsions are potent fruit disinfecting solutions. **Food Chemistry**, v. 343, 2021.
- CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, v. 172, p. 298–304, 2015.
- CLSI. **M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. 2012b.
- FAO. Commission Regulation (EU) No 432/2012 Establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children development and health. **Official Journal of the European Union**. 2012. Oline. Acessado em 11 de setembro de 2023. Disponível em: https://www.legislation.gov.uk/eur/2012/432/pdfs/eur_20120432_2017-08-22_en.pdf
- GUO, M.; ZHANG, L.; HE, Q.; et al. Synergistic antibacterial effects of ultrasound and thyme essential oils nanoemulsion against *Escherichia coli* O157:H7. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, 2020.
- HE, Q.; ZHANG, L.; SONG, L.; et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* using ultrasound in combination with thyme essential oil nanoemulsions and its synergistic mechanism. **LWT**, v. 147, 2021.
- HOJATI, N.; AMİRİ, S.; RADİ, M. Effect of cinnamaldehyde nanoemulsion on the microbiological property of sausage. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 4, p. 2478–2485, 2022.
- HUSSEIN, M.; MAKRAM MOUSTAFA ALI, R.; ELSAYED THARWAT, A.; RIZK EL-GHAREEB, W.; ABDEL-MOEZ ISMAIL, H. **Quality parameters of buffalo meat sausage containing essential oils**. 2021.
- LIU, T.; LIU, L. Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1509–1515, 2020.
- MIRSHARIFI, S. M.; SAMI, M.; JAZAERI, M.; REZAEI, A. Production, characterization, and antimicrobial activity of almond gum/polyvinyl alcohol/chitosan composite films containing thyme essential oil nanoemulsion for extending the shelf-life of chicken breast fillets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 227, p. 405–415, 2023.
- SNOUSSI, A.; CHOUAIBI, M.; BEN HAJ KOUBAIER, H.; BOUZOUITA, N. Encapsulation of Tunisian thyme essential oil in O/W nanoemulsions: Application for meat preservation. **Meat Science**, v. 188, 2022.
- WAN, J.; ZHONG, S.; SCHWARZ, P.; CHEN, B.; RAO, J. Enhancement of antifungal and mycotoxin inhibitory activities of food-grade thyme oil nanoemulsions with natural emulsifiers. **Food Control**, v. 106, 2019.
- YANG, Z.; HE, Q.; ISMAIL, B. B.; HU, Y.; GUO, M. Ultrasonication induced nano-emulsification of thyme essential oil: Optimization and antibacterial mechanism against *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 133, 2022.
- ZHANG, Y.; ZHOU, L.; ZHANG, C.; et al. Preparation and characterization of curdlan/polyvinyl alcohol/ thyme essential oil blending film and its application to chilled meat preservation. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, 2020.