

## **AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CÁPSULAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (*Thymus vulgaris*) FRENTE À *Staphylococcus aureus*.**

DENISE OLIVEIRA PACHECO<sup>1</sup>; JÉSSICA SILVEIRA VITÓRIA<sup>2</sup>; THALIA DUARTE VASCONCELOS DA SILVA<sup>3</sup>; ROSANA COLUSSI<sup>4</sup>; TATIANE KUKA VALENTE GANDRA<sup>5</sup>; ELIEZER AVILA GANDRA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [denisepaceco.ga@gmail.com](mailto:denisepaceco.ga@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [jessicasilveiravitoria@gmail.com](mailto:jessicasilveiravitoria@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [thaliaduarte01@gmail.com](mailto:thaliaduarte01@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rosana\\_colussi@yahoo.com.br](mailto:rosana_colussi@yahoo.com.br)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tkvgandra@yahoo.com.br](mailto:tkvgandra@yahoo.com.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [gandraea@hotmail.com](mailto:gandraea@hotmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

Os óleos essenciais (OE) têm sido estudados como alternativa à utilização de aditivos sintéticos, sendo considerados como aditivos naturais e ativos, que agem inibindo o desenvolvimento microbiano nos alimentos onde são incorporados (GONÇALVES *et al.*, 2017; BHAVANIRAMYA *et al.*, 2019; VALDIVIESO-UGARTE *et al.*, 2019).

Integrante da lista de *Generally Recognized as Safe* (GRAS) para uso como aditivo alimentar (FDA, 2002), o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) é um exemplo de ingrediente natural que se destaca por sua atividade antimicrobiana (GONÇALVES *et al.*, 2017; RADÜNZ, M. *et al.* 2020).

No entanto, a concentração do OE aplicado diretamente aos alimentos, deve ser considerada com cuidado devido a sua volatilidade, a sua composição extremamente suscetível a degradações e principalmente aos seus possíveis impactos negativos nas características sensoriais do alimento (GONÇALVES *et al.*, 2017; RUI-GONZALES *et al.*, 2019). Técnicas como a encapsulação auxiliam na manutenção da bioatividade dos óleos essenciais assim como diminuem a transferência de sabor e odor destes óleos ao serem adicionados em alimentos, prolongando a vida útil do produto alimentício e preservando suas características sensoriais (GONÇALVES *et al.*, 2017; RUI-GONZALES *et al.*, 2019).

Uma das maneiras de se preparar uma substância para encapsulação é através da sua inclusão em uma emulsão. Para converter a emulsão em cápsulas, um dos métodos utilizados é a liofilização (AZEREDO, 2005; BELITZ *et al.*, 2009). Este método promove grande estabilidade aos compostos encapsulados. Além da escolha do método, outro fator que influencia a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante (material de parede). O amido é um material abundante e de baixo custo, e quando modificado quimicamente passa a ter características ideais para sua utilização como material de parede (AZEREDO, 2005; BELITZ *et al.*, 2009, BIDUSKI *et al.*, 2019). Um método de modificação química envolve a introdução de grupos hidrofóbicos, através dos grupos hidroxila na molécula de amido, para produzir amido de anidrido succínico octenil (amido OSA) com propriedades ativas de superfície.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação inibitória de cápsulas de amido anidrido succínico octenil com óleo essencial de tomilho frente à *Staphylococcus aureus*.

## 2. METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foi utilizado o óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris*) adquirido comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais. Como material encapsulante foi utilizado o amido anidrido succínico octenil (CAPSUL®), um amido de grau alimentício, doado pela empresa Matrix.

Para a análise microbiológica foi utilizado *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) mantidos sob congelamento em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v).

A encapsulação do óleo essencial de tomilho foi realizada segundo a metodologia descrita por Volic' *et al.* (2022), com algumas adaptações. Primeiramente, o amido OSA foi dissolvido em água destilada a 70°C (na concentração de 20% m/v), sob agitação suave até completa dissolução. Após, com a solução submetida a temperatura a 40°C, foi adicionado o óleo essencial de tomilho, nas concentrações de 0,05%, 0,5% e 5%, e a solução foi homogeneizada em Ultra-Turrax a 3.500 rpm por 3 min. A emulsão obtida foi liofilizada, em Liofilizador (Liotop L-101 – Liobras, Brasil) a -58°C até a secagem das amostras.

Na sequência, as amostras foram maceradas manualmente e peneiradas (peneira com abertura de 212  $\mu\text{m}$ ). O material passante foi separado (amostras P) e o material retido foi moído (amostras RM) em moedor (Philco, 2022) para obtenção de produto com granulometria máxima de 212  $\mu\text{m}$ . As amostras em pó foram armazenadas em ultra freezer (Coldlab, Brasil) até a realização das análises.

Para a avaliação do potencial antimicrobiano foi realizado o teste de dispersão em ágar. O encapsulado foi adicionado e disperso por agitação manual em Agar Mueller Hinton (AMH), em três concentrações (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com a temperatura do meio em 45°C, e vertido em placas de Petri descartáveis. Uma alçada da cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) foi re-suspendida em solução salina (0,85%) e padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Após, alíquotas de 0,1 mL da solução salina com o microrganismo foram inoculadas na superfície das placas de AMH. As placas foram imediatamente fechadas e incubadas invertidas a 37 °C por 24 h. A ação antimicrobiana foi expressa pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos comparados com uma placa controle.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1, onde é possível observar que houve ação inibitória dos encapsulados frente *S. aureus*, porém, em virtude da alta concentração bacteriana utilizada no teste, a maioria das contagens foi caracterizada como “incontável” (quando a quantidade de colônias é demasiada tornando impossível sua contagem).

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana do encapsulado de óleo essencial de tomilho branco em amido OSA frente *Staphylococcus aureus*

Concentração de OET	Obtenção da amostra	Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC.g <sup>-1</sup> )		
		Dispersão de 10 µg.mL <sup>-1</sup> de AMH	Dispersão de 100 µg.mL <sup>-1</sup> de AMH	Dispersão de 1000 µg.mL <sup>-1</sup> de AMH
0,05%	P	INC	INC	INC
	RM	INC	INC	INC
0,5%	P	INC	INC	INC
	RM	INC	INC	INC
5%	P	INC	INC	516
	RM	INC	INC	760

OET: óleo essencial de tomilho; P: peneirado; RM: retido moído; INC: incontável; AMH: Agar Mueller Hinton

Apenas na amostra 5% de OET adicionada 1.000 µg.mL<sup>-1</sup> de AMH foi possível quantificar as colônias, fato que permitiu inferir o efeito inibitório das cápsulas comparadas ao controle e as demais amostras, onde a elevada concentração microbiana não possibilitou contagens. Também foi observado um número menor de UFC e maior inibição microbiana da amostra P (516 UFC.g<sup>-1</sup>) do que da amostra RM (760 UFC.g<sup>-1</sup>). Este fato pode ser explicado, pois possivelmente, houve ruptura do revestimento de amido OSA durante o processo de moagem, ocasionando liberação precoce dos compostos voláteis do OET, responsáveis pela ação antimicrobiana do encapsulado. Assis *et al.* (2012) explicam que a ruptura mecânica é um dos mecanismos de liberação dos materiais ativos encapsulados, o que no caso deste estudo foi desfavorável.

Em seu estudo, Radünz *et al.* (2020) também avaliaram a atividade antibacteriana de óleo essencial de tomilho encapsulado. Na análise *in vitro*, o óleo essencial de tomilho apresentou efeito inibitório contra todas as bactérias avaliadas, incluindo *S. aureus*.

Os resultados obtidos pelo presente estudo são dados parciais que irão nortear o andamento da pesquisa. Os dados demonstram potencial antimicrobiano das cápsulas, principalmente aquelas produzidas com 5% de OET e não submetidas ao processo de moagem. Do mesmo modo, foi possível observar a necessidade de novo teste antimicrobiano, porém utilizando concentrações menores de inóculo bacteriano.

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que as cápsulas produzidas com 5% de óleo essencial de tomilho possuem potencial antimicrobiano e tem sua ação otimizada quando a amostra não passa pelo processo de moagem.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, Leticia Marques de; ZAVAREZE, Elessandra da Rosa; PRENTICE-HERNANDEZ, Carlos; SOUZA-SOARES, Leonor Almeida de. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, abr./jun. 2012. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000004>

AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro de. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos & Nutrição**, Araraquara. v.16, n.1, p.89-97, 2005

BELITZ, Hans Dieter, GROSH, Werner, SCHIEBERLE, Peter. **Food Chemistry**. 4ª edição. Springer: Berlin. 2009

BHAVANIRAMYA, Sundaresan; VISHNUPRIYA, Selvaraju; AL-ABOODY, Mohammad Saleh; VIJAYAKUMAR, Rajendran; BASKARAN, Dharmar. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**. v. 2, n. 2, p 49-55. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S259025981930007X>>. Acesso em 27 fev. 2023.

BIDUSKI, Bárbara; KRINGEL, Dianini Hütner; COLUSSI, Rosana; HACKBART, Helen Cristina dos Santos; LIM, Loong-Tak; DIAS, Álvaro Renato Guerra; ZAVAREZE, Elessanda da Rosa. Electrospayed octenyl succinic anhydride starch capsules for Rosemary essential oil encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 132, p.300–307, 2019

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

RADÜNZ, Marjana; HACKBART, Helen Cristina dos Santos; CAMARGO, Taiane Mota; NUNES, Camila Francine Paes; BARROS, Felipe Antonio Primon de; MAGRO, Jacir Dal; SANCHES, Pedro José Filho; GANDRA, Eliezer Avila; RADÜNZ, André Luiz; ZAVAREZE, Elessandra da Rosa. Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. **International Journal of Food Microbiology**, p 330. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108696>

VALDIVIESO-UGARTE, Magdalena; GOMES-LORENTE, Caroline; PLAZA-DÍAZ, Julio; GIL, Ángel. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: a systematic review. **Nutrients**. v. 11, p. 2786, 2019. DOI:10.3390/nu11112786

VOLIC´, M. et al. Design and characterization of whey protein nanocarriers for thyme essential oil encapsulation obtained by freeze-drying. **Food Chemistry**. v. 386, 2022. Disponível em: <[https://www-sciencedirect.com/periodicos/capes.gov.br/science/article/pii/S0308814622007117?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com/periodicos/capes.gov.br/science/article/pii/S0308814622007117?via%3Dihub)>. Acesso em 20 fev 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132749