



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**RAIZA IACUZIO**

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DA ESTABILIDADE DE BIOPOLÍMERO  
ATIVO ADICIONADO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES  
ANTIMICROBIANOS PARA ACONDICIONAMENTO DE QUEIJO MINAS  
FRESCAL**

**CAMPINAS**

**2019**

RAIZA IACUZIO

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DA ESTABILIDADE DE BIOPOLÍMERO  
ATIVO ADICIONADO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES  
ANTIMICROBIANOS PARA ACONDICIONAMENTO DE QUEIJO MINAS  
FRESCAL**

Dissertação de Mestrado apresentada como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Nathália Cristina Cirone Silva.

Este arquivo digital corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Raiza  
Iacuzio e orientada pela Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Nathália Cristina Cirone Silva.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

la1d      Iacuzio, Raiza, 1993-  
Desenvolvimento e análise da estabilidade de biopolímero ativo adicionado de óleos essenciais como agentes antimicrobianos para acondicionamento de queijo Minas frescal / Raiza Iacuzio. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Nathalia Cristina Cirone Silva.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Óleo essencial. 3. Biopolímeros. I. Silva, Nathalia Cristina Cirone. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development and analysis of the stability of active biopolymer added of essential oils as antimicrobial agents for Minas frescal cheese packaging

**Palavras-chave em inglês:**

Antimicrobial activity

Essential oil

Biopolymers

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Liliana de Oliveira Rocha

Marta Cristina Teixeira Duarte

Marjory Xavier Rodrigues

**Data de defesa:** 30-07-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9998-1053>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4554898706546823>

**Folha de aprovação**

---

**Profª Drª Liliana de Oliveira Rocha**

**Presidente**

---

**Profª Drª Marta Teixeira Duarte**

**Membro**

---

**Drª Marjory Xavier Rodrigues**

**Membro**

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente aos meus pais Eduardo e Laurinéa, bem como à minha irmã Taynah, por todo o apoio, cuidado e companheirismo despendidos durante toda a minha formação e em especial durante o período em que me ausentei do convívio para realização do sonho que este estudo representa. À Professora Dr<sup>a</sup> Nathália Cristina Cirone Silva, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho, bem como pela parceria e auxílios prestados durante o curso do mesmo. Aos órgãos de fomento CNPQ (processo n° 134614/2016-0) e FAEPEX (processo n° 2069/17), que tornaram a realização deste estudo possível. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Aos meus caros amigos de longa data Caio Henrique Tadashi Iwase e Elaine Ribeiro, que me incentivaram a perseguir meu sonho ativamente, me auxiliaram no processo de adaptação a uma nova realidade e estiveram lá por mim nos momentos mais difíceis e sombrios que estes anos reservaram. À Miliana Marciano, representante da Givaudan do Brasil Ltda, pela concessão de amostras de óleos essenciais para a realização deste estudo, pela parceria e compreensão. Aos Professores (as) Doutores(as) Juliana Macedo, Gabriela Macedo, Carlos Alberto Rodrigues Anjos, Anderson de Souza Sant'Ana, Gláucia Pastore e Liliana Rocha, que tiveram papel fundamental no desenvolvimento deste estudo pelo fornecimento de bases práticas e teóricas essenciais à minha formação, bem como ao meu crescimento profissional e pessoal. Aos meus caros amigos e colegas que auxiliaram diretamente no desenvolvimento deste trabalho: Antônio Matias Navarrete, Ana Paula Pereira, Juliana Carusi, William Alencar e Arthur Kael. À Karen Vanessa Munive Núñez, a irmã, cúmplice, parceira de laboratório e de vida que a universidade me deu. Aos meus queridos que eu tive o prazer de conhecer e orientar durante essa caminhada: Victoria Vilaça, Ana Carolina Gonçalves Racioni, Larissa Duarte, Tainá Vieira Marinho, Ana Serrano, Maria Eduarda Rodrigues e Jaqueline Almeida; foi uma honra poder participar da formação de vocês, e agradeço do fundo do coração por vocês terem me ensinado tanto, principalmente a como ser um ser humano melhor. Por fim, agradeço a todos os caros amigos que, cada um à sua maneira, contribuíram para o bom andamento das atividades e para a criação de memórias inesquecíveis e maravilhosas: Luis Gustavo Matos, Léia Menna B. A. Silveira, Murilo Queiroz, Felipe Verissimo. Gratidão eterna a todos vocês.

## RESUMO

Atualmente, grandes desafios vêm sendo enfrentados pela indústria de alimentos, que incluem a produção de alimentos mais próximos ao natural, sem abrir mão da qualidade, segurança e atributos sensoriais dos alimentos produzidos. Em adição, a maior conscientização dos consumidores quanto ao apelo ambiental que inclui o tratamento de resíduos sólidos pressiona a indústria no sentido da substituição de embalagens por alternativas mais sustentáveis e biodegradáveis. Neste contexto, o objetivo do atual estudo consistiu no desenvolvimento de embalagem ativa biodegradável adicionada de óleos essenciais como agentes antimicrobianos. Inicialmente, foi aplicada metodologia de Micro-Extração em Fase Sólida em conjunto com Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (HS-SPME / CG-EM) para identificação e quantificação dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais analisados. Em seguida, foi realizada análise da atividade antimicrobiana de dez óleos essenciais contra os micro-organismos contaminantes patogênicos mais comuns na cadeia produtiva de queijo Minas frescal (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria innocua*), conduzida por metodologia de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima. Posteriormente, foi desenvolvida embalagem ativa biodegradável à base de gelatina e quitosana adicionada dos dois óleos essenciais mais efetivos contra os micro-organismos analisados. A verificação da hipótese de redução do teor de óleo essencial utilizado na formulação, assim como a determinação da atividade antimicrobiana de filmes desenvolvidos com diferentes concentrações de óleo essencial, foi avaliada por meio de metodologia de disco-difusão em ágar. Para avaliação dos efeitos do biopolímero desenvolvido sobre o comportamento de crescimento dos micro-organismos em condições análogas às de estocagem foram desenvolvidos modelos primários de Microbiologia preditiva. Por fim, a influência na análise de vida de prateleira de queijos tipo Minas frescal foi avaliada por meio de análise dos grupos de micro-organismos: mesófilos, psicrotróficos, bactérias lácticas, além dos micro-organismos susceptíveis aos polímeros desenvolvidos (*Staphylococcus* spp e *Listeria* spp). A princípio, foram observados compostos majoritários compatíveis qualitativamente e quantitativamente com aqueles observados em estudos anteriores, principalmente para o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Para este óleo, foram detectados os compostos geranial ( $41,8 \pm 1,4\%$ ) e neral ( $27,3 \pm 0,7\%$ ), que constituem dois isômeros que apresentam atividade antimicrobiana, cujos principais mecanismos de ação foram atribuídos, em estudos anteriores, a danificação e alteração da permeabilidade da membrana celular. Baseado nos resultados obtidos, é possível afirmar que os óleos essenciais mais eficientes na inibição dos micro-

organismos estudados foram os provenientes das espécies *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii*. Posteriormente, dentre os polímeros desenvolvidos, aquele adicionado do óleo essencial de *C. citratus* obteve melhor atividade antimicrobiana, contudo apenas micro-organismos Gram-positivos (*S. aureus* e *L. innocua*) se mostraram susceptíveis. Para análise do comportamento dos micro-organismos por meio de desenvolvimento de modelos de Microbiologia preditiva, foi observado que o polímero desenvolvido não apresentou atividade satisfatória contra *L. innocua*, contudo, foi capaz de inativar *S. aureus* após 10-11 dias de estocagem. Para o experimento de vida de prateleira, no qual não foi realizada inoculação de micro-organismos previamente, o filme desenvolvido apresentou significativa redução da população dos grupos de micro-organismos deteriorantes analisados nos tempos 5 e 10 dias de estocagem, porém não foi possível avaliar a possibilidade de extensão da vida de prateleira dos produtos em questão. Não foram detectadas colônias fenotipicamente características de *Listeria* spp. em nenhum dos pontos analisados durante o experimento da avaliação da vida de prateleira. Baseado nos resultados obtidos, é possível afirmar que foram obtidos resultados satisfatórios pautados pelos objetivos do presente estudo, uma vez que o biopolímero desenvolvido possui atividade antimicrobiana efetiva contra *S. aureus* sob as condições intrínsecas e extrínsecas aplicadas durante o armazenamento de queijo tipo Minas frescal.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana, óleo essencial, biopolímeros, patógenos alimentares.

## ABSTRACT

Currently, major challenges are being faced by the food industry, which include the production of foods closer to the natural, without giving up on the quality, safety and sensory attributes of the food produced. In addition, the increased consumer awareness of the environmental appeal pressures the industry to substitute packaging for more sustainable and biodegradable alternatives. Therefore, the objective of the current study was to develop active biodegradable packaging with added essential oils as antimicrobial agents. Initially, Solid Phase Micro-Extraction methodology was applied in conjunction with Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HS-SPME / GC-MS) to identify and quantify the major compounds present in the essential oils analyzed. The analysis of the antimicrobial activity of ten essential oils against the most common contaminant microorganisms in the Minas Frescal cheese chain (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Listeria innocua*) was carried out, conducted by Minimal Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration. Subsequently, biodegradable active packaging based on gelatin and chitosan was developed, adding the two most effective essential oils against the microorganisms analyzed. The verification of the hypothesis of reduction of the essential oil content used in the formulation, as well as the determination of the antimicrobial activity of the films developed with different concentrations of essential oil, were evaluated by disc-diffusion methodology in agar. To evaluate the effects of the biopolymer developed on the growth behavior of pathogenic microorganisms susceptible to it under conditions analogous to those of storage, primary models of predictive microbiology were developed. Finally, the influence on the shelf-life analysis of Minas frescal cheeses was evaluated by analyzing the groups of microorganisms: mesophiles, psychrotrophs, lactic bacteria, and microorganisms susceptible to the developed polymers (*Staphylococcus* spp and *Listeria* spp). In principle, compatible compounds were observed qualitatively and quantitatively with those observed in previous studies mainly for the essential oil of *C. citratus*. For this oil, the geranial ( $41.8 \pm 1.4\%$ ) and neral ( $27.3 \pm 0.7\%$ ) compounds were detected, which are two isomers that present antimicrobial activity whose main mechanisms of action are attributed to the damage and alteration of cell membrane permeability. Based on the results obtained, it is possible to state that the most efficient essential oils in the inhibition of the studied microorganisms were those from the species *C. citratus* and *C. martinii*. Later, among the polymers developed, the one added of the essential oil of *C. citratus* obtained better antimicrobial activity, however only Gram-positive microorganisms (*S. aureus* and *L. innocua*) showed to be susceptible. For the analysis of microorganism behavior

through the development of predictive microbiology models, it was observed that the polymer developed did not present satisfactory activity against *L. innocua*, however, it was able to inactivate *S. aureus* after 10-11 days of storage. For the shelf life experiment, in which no microorganisms were previously inoculated, the developed film showed a significant reduction in the population of the deteriorating microorganisms groups analyzed at 5 and 10 days of storage, but it was not possible to evaluate the possibility of extending the shelf life of the products in question. However, no phenotypically characteristic colonies of *Listeria* spp. in any of the analyzed points of this experiment were observed. Based on the obtained results, it is possible to affirm that satisfactory results based on the objectives of the present study were obtained, since the developed biopolymer has effective antimicrobial activity against *S. aureus* under the intrinsic and extrinsic conditions applied during the storage of Minas frescal cheese.

**Key words:** Antimicrobial activity, essential oil, biopolymers, foodborne pathogens.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	JUSTIFICATIVA.....	14
3	OBJETIVOS.....	15
3.1	Objetivo Geral.....	15
3.2	Objetivos Específicos .....	15
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1	Leite .....	16
4.2	Contaminação leite cru e queijos frescos.....	16
4.3	Queijo Minas Frescal .....	16
4.4	Mercado Nacional do Queijo Minas Frescal .....	18
4.5	Doenças Transmitidas por Alimentos .....	18
4.5.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
4.5.2	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	20
4.5.3	<i>Escherichia coli</i> .....	21
4.5.4	<i>Salmonella</i> spp. ....	23
4.6	Desenvolvimento de mecanismos de resistência a antibióticos.....	24
4.7	Abordagens Alternativas – Alvos múltiplos .....	25
4.8	Óleos essenciais .....	25
4.8.1	Alecrim.....	26
4.8.2	Vetiver.....	27
4.8.3	Capim limão .....	27
4.8.4	Palmarosa .....	29
4.8.5	Citronela.....	31
4.8.6	Eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> ) .....	32
4.8.7	Eucalipto ( <i>Eucalyptus citriodora</i> ).....	33

4.8.8	Hortelã-pimenta .....	33
4.8.9	Pimenta preta.....	34
4.8.10	Patchouli.....	35
4.9	EMBALAGENS ATIVAS .....	35
4.9.1	Embalagens antimicrobianas.....	35
4.9.2	Antimicrobianos sintéticos e naturais .....	36
4.9.3	Biopolímeros .....	37
4.9.4	Gelatina .....	39
4.9.5	Quitosana .....	40
4.9.6	Emulsificantes - Lecitina de soja .....	41
4.9.7	Agentes plastificantes .....	41
4.9.8	Glicerol.....	42
4.9.9	Sorbitol.....	43
4.9.10	Lipídeos.....	43
5	MATERIAL E MÉTODOS .....	45
5.1	Composição química dos óleos essenciais.....	45
5.2	Cepas utilizadas .....	46
5.3	Análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
5.4	Análise de Concentração Bactericida Mínima (MBC) .....	47
5.5	Desenvolvimento de biopolímero ativo .....	47
5.6	Atividade antimicrobiana dos filmes desenvolvidos .....	48
5.7	Estudo da viabilidade da redução de concentração de OE .....	49
5.8	Microbiologia Preditiva .....	50
5.8.1	Formulação queijo minas frescal .....	50
5.8.2	Cepas e preparo de inóculo .....	51
5.8.3	Distribuição de pontos .....	51
5.8.4	Contagens.....	52

5.8.5	Análise dos dados.....	52
5.9	Análise da vida de prateleira.....	52
5.10	Análises estatísticas.....	53
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	54
6.1	Composição Química dos Óleos Essenciais .....	54
6.2	Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais.....	56
6.3	Atividade Antimicrobiana do Filme ativo .....	60
6.4	Estudo da viabilidade da redução de concentração de óleo essencial .....	62
6.5	Microbiologia Preditiva .....	64
6.5.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	64
6.5.2	<i>Listeria innocua</i> .....	66
6.6	Análise de vida de prateleira.....	69
7	CONCLUSÃO .....	73
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
	ANEXOS.....	90

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ocorrem em nível mundial e são responsáveis por grandes gastos nos sistemas de saúde em decorrência de sua morbidade e mortalidade (KIRK et al., 2015). A contaminação pode ocorrer em qualquer etapa da produção, no campo, durante o processamento ou preparo em casa. Estima-se que ocorram muito mais casos que os relatados, em decorrência do subdiagnóstico e subnotificação (KIM et al., 2015). Após a contaminação, a tendência é que produtos com elevada disponibilidade de nutrientes e água, como carnes frescas e laticínios, constituam um meio propício à multiplicação destes micro-organismos. Neste contexto, o queijo de tipo Minas frescal é um produto popular amplamente consumido pela população brasileira, de massa fresca e macia, de coloração branca e sabor suave. Devido à alta umidade e disponibilidade de nutrientes, é um alimento altamente perecível, mesmo quando armazenado sob refrigeração (SANGALETTI et al., 2009).

Em relação aos laticínios, estudos apontam para práticas que comprometem sua qualidade e segurança, como ordenha e utilização de leite proveniente de animais acometidos por mastite, cujo principal micro-organismo associado é o *Staphylococcus aureus*, causador de surtos de intoxicação alimentar em decorrência da produção de toxina estafilocócica (MEHLI et al., 2017). Deficiências na higiene de manipuladores, sanitização de equipamentos e instalações, somados à intensa manipulação contribuem para contaminação por este micro-organismo e outros como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, consideradas as principais ameaças à inocuidade de queijos (WOLUPECK et al., 2012). A *L. monocytogenes* é um importante patógeno de origem alimentar, causa a listeriose, com taxa de mortalidade entre 20 e 30%. Populações de risco elevado incluem recém-nascidos, mulheres grávidas, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Alguns alimentos são considerados veículos comuns deste micro-organismo, incluindo carne bovina e de aves, queijos e vegetais (SU et al., 2016).

Ao considerarmos a elevada possibilidade de contaminação e perecibilidade destes grupos de alimentos, algumas soluções tecnológicas como adição de agentes conservantes e antioxidantes constituíam uma alternativa à essas questões, contudo, no cenário atual, a crescente demanda por alimentos com teores reduzidos de conservantes, e os alimentos minimamente processados, em conjunto com a incidência de patógenos resistentes à antibióticos e conservantes tradicionais têm impulsionado a indústria produtora de alimentos na direção da redução de aditivos químicos e sintéticos e desenvolvimento compostos conservantes, antioxidantes e antimicrobianos alternativos (MILITELLO et al., 2010). Os óleos

essenciais são amplamente utilizados pela indústria farmacêutica, alimentícia e pela medicina alternativa com as mais diversas finalidades, dentre elas aromatização produtos de perfumaria, alimentos e bebidas (ANDRADE et al., 2013) e também para aplicação em repelentes, medicamentos e embalagens (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

As embalagens ativas incorporadas de óleos essenciais demonstraram ser uma boa alternativa para a indústria alimentícia, pois conservam a qualidade dos produtos, promovem a segurança do consumidor, prolongam a vida de prateleira e, ao serem projetadas com fontes biodegradáveis como gelatina e quitosana, ainda possuem apelo de sustentabilidade do ponto de vista ambiental (BASTOS et al., 2013).

## **2 JUSTIFICATIVA**

No Brasil, o mercado de produtos lácteos ainda se encontra em expansão. Em 2016, cerca de 35% do leite produzido no Brasil foi direcionado à produção de queijos. Para esta classe de produtos, foram 5,4kg per capita/ano em 2017, e com previsões que indicam um aumento estimado para 7,5kg per capita/ano em 2020 (MILKPOINT, 2017). Em adição, o queijo Minas frescal apresenta-se como uma boa alternativa de investimento, em decorrência de seu bom rendimento, valor nutricional e volume de consumo, uma vez que se trata do terceiro tipo de queijo mais consumido no Brasil, com 11,4% das vendas (GALAN; PEREIRA, 2017). No período entre os anos de 2000 e 2017, cerca de 3,21% dos 12.308 surtos de Doenças Transmitidas por alimentos foram atribuídos ao consumo de laticínios. Contudo, em razão de sua elevada umidade, disponibilidade de nutrientes e elevada manipulação, características que fazem deste um alimento de fácil contaminação e multiplicação dos micro-organismos, estima-se que este número seja ainda maior, uma vez que em mais de 46% dos casos reportados não foi possível correlacionar o surto ocorrido com o alimento causador (BRASIL, 2018).

Cerca de 40% dos 250 milhões de toneladas de polímeros de origem petroquímica foram destinados à produção de embalagens. Com o amplo descarte, em conjunto com a extensa durabilidade destes materiais, os consumidores são conscientizados acerca do impacto ambiental causado e as indústrias procuram por alternativas para substituição destes materiais (ROBERTSON, 2013). Para os biopolímeros, o mercado para este produto em 2010 já era de US\$454 milhões, e os destaques para sua utilização são relativos à sua abundância, baixo custo, degradabilidade e possibilidade de utilização de subprodutos da indústria de alimentos como gelatina em sua produção (PELLISSARI et al., 2009; GÓMEZ-ESTACA et al., 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

✓ Avaliar a eficiência de óleos essenciais quanto à sua atividade antimicrobiana frente a patógenos de importância em alimentos e, posteriormente, aplica-los no desenvolvimento de embalagem ativa para acondicionamento de queijos tipo Minas frescal.

#### 3.2 Objetivos Específicos

✓ Determinar os compostos majoritários e testar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Alecrim (*R. officinalis*), Vetiver (*V. zizanioides*), Capim limão (*C. citratus*), Citronela (*C. nardus*), Eucalipto (*E. globulus*), Eucalipto (*E. citriodora*), Palmarosa (*C. martinii*), Hortelã-pimenta (*M. piperita*), Pimenta preta (*P. nigrum*) frente às cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. innocua*.

✓ Selecionar os dois óleos essenciais com melhor atividade antimicrobiana para desenvolvimento de biopolímeros ativos.

✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes desenvolvidos e selecionar aquele com melhor desempenho relacionado à atividade antimicrobiana. Posteriormente, determinar a menor concentração de óleo essencial possível para a aplicação no filme e correlacionar este parâmetro com a atividade antimicrobiana dos mesmos.

✓ Utilizar os biopolímeros desenvolvidos para acondicionar queijos tipo Minas frescal inoculados com os micro-organismos susceptíveis às embalagens desenvolvidas e avaliar o comportamento microbiano a partir de desenvolvimento de modelos primários de Microbiologia preditiva.

✓ Determinar, por meio de experimento que avalie a vida de prateleira do produto, a susceptibilidade dos micro-organismos naturalmente presentes na matriz alimentar frente aos biopolímeros desenvolvidos, bem como a possibilidade de extensão da vida de prateleira a partir da aplicação dos mesmos.

## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Leite**

O leite é um alimento composto por 87,3% de água, 3,6% de gordura, 3,3% de proteínas, 4,9% de lactose e 0,9% de minerais, que representa uma das principais fontes de proteínas e cálcio para a população brasileira e possui papel fundamental no controle de doenças ligadas à insuficiência vitamínica por conter vitaminas lipossolúveis como K, A, D e E; hidrossolúveis como B1, B2 e C e minerais como o cálcio, sódio, potássio e magnésio (MENEZES, 2014).

### **4.2 Contaminação do leite cru e queijos frescos**

A princípio, ao ser secretado dos alvéolos da glândula mamária de um animal saudável, o leite é estéril, porém pode ser contaminado por fonte exógena (equipamentos, superfícies, manipuladores, recipientes) ou endógena (no caso de animais enfermos). A partir destas fontes, os principais micro-organismos responsáveis pela contaminação desta matéria-prima podem ser classificados em dois grupos: Contagiosos, que sobrevivem dentro do hospedeiro e, neste caso, dentro da glândula mamária (*S. aureus* e *S. agalactiae*); e oportunistas, que possuem origem ambiental e não sobrevivem dentro do hospedeiro (grupo enterobacteriaceae especialmente *E. coli* e *S. uberis*) (MENEZES, 2014). Estudos atentam para altas contagens dos micro-organismos *S. aureus* e *E. coli* em queijos tipo Minas frescal, apontando para má qualidade da matéria prima, obtida de animais enfermos (mastite); processo de pasteurização ineficiente ou ausência do mesmo, a exemplo de queijos artesanais tradicionais no Brasil produzidos a partir de leite cru como o tipo proveniente da Serra da Canastra – MG; além da deficiência nos processos de higiene e sanitização de manipuladores, equipamentos, superfícies e utensílios (WOLUPECK et al., 2012; DORES et al., 2013; MEHLI et al., 2017).

### **4.3 Queijo Minas Frescal**

Segundo a Portaria N°146, de 7 de março de 1996, entende-se por queijo o produto fresco ou maturado obtido a partir da separação parcial do soro de leite ou leite reconstituído, coagulados através da ação de coalho e/ou enzimas similares, podendo ser combinado ou não com fermentação a partir de bactérias lácticas específicas. Os queijos do tipo Minas frescal,

ainda, podem ser classificados ainda como frescos, semi-gordos (teor de gordura em base seca de 25 a 44%) e de muito alta umidade (acima de 55%) (BRASIL, 1996; WOLUPECK et al., 2012). É um dos queijos mais populares no Brasil, consumido por todas as camadas da população, e que devido à sua alta perecibilidade mesmo sob refrigeração, deve ser consumido preferencialmente nos primeiros quinze dias após sua fabricação (SANGALETTI et al., 2009).

Segundo a Resolução 12, de 02 de janeiro de 2001, que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, os queijos considerados de muito alta umidade, dentre estes os queijos tipo Minas frescal, tem limite de tolerância de coliformes a 45°C e de estafilococos coagulase positiva de  $5 \times 10^2$  UFC/g. Para os microrganismos *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, devem apresentar ausência em 25g (BRASIL, 2001).

O processo produtivo do queijo Minas frescal consiste inicialmente na pasteurização do leite, que pode ser realizada por meio de processo LTLT (Low Temperature, Long Time) com binômio de tempo x temperatura em torno de 63°C/30 min ou HTST (High Temperature Short Time), que é aplicado com os parâmetros de no mínimo 72°C/15s (JORDAN; HUNT; HOORFAR, 2012; LI et al, 2018). Os processos de pasteurização HTST são atualmente os mais utilizados pela indústria de laticínios em decorrência da redução drástica de tempo necessário para processamento, possibilidade de aplicação da metodologia em processo contínuo, redução das alterações sensoriais do produto e manutenção de características importantes da matéria prima para produção de queijos como a maior estabilidade de íons de cálcio que auxiliarão no processo de coagulação, a partir da ligação destes íons, dotados carga positiva ( $\text{Ca}^{2+}$ ), às micelas de caseína presentes no leite e naturalmente dotadas de carga negativa, reduzindo a barreira energética e facilitando a coagulação com a chegada ao ponto isoelétrico (MAGALHÃES; SANTOS, 2017). Nos casos em que são aplicados abuso de temperatura ou tempo prolongado de tratamento térmico, ocorre a redução da disponibilidade e solubilidade do cálcio (PINGLE; PAWAR, 2016), o que pode ocasionar a formação de coágulos menos firmes e acarretar em menor rendimento na produção de queijos. Com o objetivo de auxiliar na correção dos teores de cálcio no leite a ser utilizado para a produção de queijos e melhorar o rendimento, utiliza-se comumente a adição de cloreto de cálcio na forma de solução aquosa após a pasteurização e previamente à adição das enzimas coagulantes como a quimosina (SILVA, 2017). Posteriormente, o corte do coágulo e agitação intermitente possuem como objetivo a expulsão gradativa do soro do leite do interior dos grânulos de maneira a favorecer a firmeza e facilitar o processo de dessoragem da massa, que consiste na remoção do soro e compactação dos grânulos para formação do queijo Minas frescal. Por fim, o processo de salga pode ser realizado

diretamente na massa ou na superfície dos queijos a partir da adição de cerca de 2% (p/p) de NaCl com objetivo de promover atributo sensorial e ao mesmo tempo auxiliar na conservação do produto.

#### **4.4 Mercado Nacional do Queijo Minas Frescal**

Segundo a ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias do Queijo), o mercado nacional de queijos movimentou cerca de R\$ 19 milhões no ano de 2014. Entre os anos de 2005 e 2013, os queijos tiveram seu consumo aumentado em 76%, com uma média de 8 a 9% de avanço ao ano, totalizando uma média de 1,032 milhões de toneladas produzidas no ano de 2013 (ROCHA, 2014). Atualmente, cerca de 35% do leite produzido no país, que em 2016 foi equivalente a 33,625 bilhões de litros, é direcionado à produção de queijos. No ano de 2017, a média de consumo de queijos per capita no Brasil foi de 5,4kg, com previsão de chegar aos 7,5kg no ano de 2020 (MILKPOINT, 2017). Quanto à participação do queijo Minas frescal no valor total de venda no mercado brasileiro, no ano de 2016, este era o terceiro colocado, atrás dos queijos mussarela (43,7%) e prato (31%), com 11,4% das vendas (GALAN; PEREIRA, 2017).

Contudo, apesar da elevada rentabilidade deste tipo de queijo, sua maior umidade, em conjunto com uma elevada disponibilidade de nutrientes o tornam um alimento altamente perecível e passivo da contaminação por micro-organismos deteriorantes e patogênicos, o que pode ocasionar uma redução da vida de prateleira deste produto e causar Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (SANGALETTI et al., 2009).

#### **4.5 Doenças Transmitidas por Alimentos**

No Brasil, dos anos 2000 a 2017, foram notificados 12.503 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos, que afetaram 236.403 indivíduos, com 182 óbitos. Contudo, estima-se que as estatísticas apresentadas sejam uma pequena parcela da totalidade dos surtos ocorridos, em decorrência de algumas DTA possuírem sintomas mais brandos, bem como a subnotificação de surtos pelos órgãos de saúde. Até o ano de 2017, foi estimado que 3,21% dos surtos notificados ocorreram em decorrência do consumo de leite e derivados contaminados, contudo, em 46,82% dos surtos notificados não foi possível determinar qual alimento foi o

causador, então estima-se também que os valores estimados para esta classe de alimento sejam superiores ao reportado (BRASIL, 2018). Dentre os principais micro-organismos causadores dos surtos, destacaram-se a *Salmonella* spp. (31%), seguido de *Escherichia coli* (24%) e *Staphylococcus aureus*, responsabilizado por 16% dos surtos ocorridos (BRASIL, 2018). Embora no estudo supracitado o micro-organismo *Listeria monocytogenes* não tenha sido citado entre os principais dez causadores de DTA no Brasil em decorrência de sua baixa incidência (0,26 a cada 100 mil habitantes), sua elevada taxa de mortalidade (20 a 30%) e suas características intrínsecas que direcionam para uma afinidade a este tipo de matriz alimentar e suas condições de estocagem destacam a importância de sua pesquisa (UNZELTE, 2017).

#### 4.5.1 *Staphylococcus aureus*

As cepas de *S. aureus* são caracterizadas por cocos Gram positivos, com formação em aglomerados de células que lembram cachos de uva. São anaeróbios facultativos, catalase positivos, coagulase positivos, DNase termoestável positivo e redução do telurito também positivo. Possuem temperatura ótima de crescimento entre 35 e 45°C, com limites de crescimento a 7°C e 47,8°C. Contudo, para a produção de enterotoxinas, a faixa de temperatura requerida vai dos 10°C aos 46°C. Consegue crescer em uma faixa de pH que varia entre 4,2 e 9,3, com atividade de água mínima de 0,83 e consegue suportar concentrações de NaCl de até 25%. A intoxicação causada por *S. aureus* ocorre pela ingestão da toxina estafilocócica, que é constituída por proteínas de baixo peso molecular, termorresistentes e também resistente às enzimas proteolíticas (JAY, 2005; SILVA, 2010).

Por não ser um bom competidor à microbiota original dos alimentos crus, sua contaminação está associada com manipulação intensa e imprópria, uma vez que é estimado que este micro-organismo seja comensal em cerca de 20 a 30% da população através da pele e das mucosas, associado posteriormente à estocagem em condições favoráveis ao crescimento do micro-organismo e produção das toxinas relacionadas. Também é comum em animais e gado, principalmente se acometidos por mastite. As principais características e sintomas da intoxicação alimentar causada pela toxina estafilocócica incluem náusea, vômito, dores abdominais, que podem ser acompanhadas ou não por diarreia. Em decorrência da geração das toxinas ocorrer no alimento, fora do corpo do hospedeiro, e sua ação se dar no nervo vago do estômago, bem como o estímulo deste nervo ser responsável pela reação de vômito, é uma intoxicação que se inicia brevemente, a partir de 2 horas após o consumo dos alimentos

contaminados (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). É uma doença breve e os sintomas tendem a ser dissipados num período de 24-48 h após o início dos mesmos (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). Quando observado na produção de queijos frescos como o queijo Minas frescal, está relacionado às más práticas de manipulação e é comumente encontrado neste tipo de produto, com incidência que varia de 54,2 a 70,8%, de acordo com estudos anteriormente realizados (PIMENTEL-FILHO et al., 2013; QUEIROZ et al., 2017).

#### 4.5.2 *Listeria monocytogenes*

As cepas do gênero *Listeria* são identificadas pela forma de pequenos bastonetes Gram positivos, não formadores de esporos, catalase positivos e não produtores de H<sub>2</sub>S. Possuem uma ampla faixa de temperatura para crescimento, variando de 1 a 45°C, com temperatura ótima entre 30 e 37°C, o que as define como psicotolerantes, em função da habilidade de se multiplicarem à temperatura de refrigeração. Quanto ao pH, em geral são capazes de crescimento na faixa de 4,1 a 9,6, com ideal entre 6 e 8. Quando relacionado à atividade de água ( $w$ ), a *L. monocytogenes* é capaz de se desenvolver em valores inferiores a 0,93. São oxidase negativas, fermentam a glicose com produção de ácido e sem produção de gás, são anaeróbias facultativas, hidrolizam a esculina e o hipurato de sódio (JAY, 2005; SILVA, 2010; SKAF et al., 2017).

Quando relacionada a queijos frescos, a *L. monocytogenes* é um outro patógeno em potencial, devido à sua capacidade de multiplicação em baixas temperaturas, possibilidade de formação de biofilmes nos ambientes e equipamentos fabris, acidez e umidade favoráveis ao seu crescimento e ausência de tratamento térmico prévio ao consumo deste tipo de alimento (HONG KONG, 2014). Em adição, a possibilidade de infecção sem expressão de sintomas por parte de indivíduos saudáveis e elevado risco para populações como gestantes, recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos, bem como a detecção de cepas dotadas de genes de resistência aos antimicrobianos mais comuns salientam a importância do estudo deste patógeno na matriz alimentar em questão. Nos Estados Unidos da América, por exemplo, estima-se que cerca de 1600 pessoas adquiram a listeriose por ano, e cerca de 260 venham a óbito (SU et al., 2016; ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2018).

Embora não sejam comuns, foram reportados também casos nos quais *L. monocytogenes* foi apontado como causador de mastite em bovinos em decorrência de sua presença como contaminante em leite cru recém-ordenhado (JORDAN; HUNT; HOORFAR, 2012), o que

reforça quanto à necessidade de aplicação de tratamentos que eliminem por completo o micro-organismo supracitado (pasteurização, cura de queijos produzidos a partir de leite cru entre outros), tendo em vista que mesmo baixíssimas concentrações do patógeno em questão já são capazes de causar infecção quando ingeridos. Em surto envolvendo o consumo de milk-shakes contaminados por *L. monocytogenes* nos Estados Unidos da América, foi estimado que a dose do micro-organismo presente nos produtos foi de 8 UFC/g. Para o produto em questão, os valores observados em surtos anteriores envolvendo a mesma matriz alimentar variaram entre 9-12 UFC/g (POUILLOT et al., 2016). Estas características, quando associadas ao elevado tempo de incubação, que dificulta o rastreamento do alimento veiculador e análise de sobras, agregam fatores à periculosidade potencial do micro-organismo em questão (POUILLOT et al., 2016). Segundo os dados disponibilizados pelo Centers of Disease Control (CDC) (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2019), somente entre os anos de 2012 e 2018, sete surtos relacionados com a contaminação de queijos e leite cru por *L. monocytogenes* resultaram na contaminação de 81 indivíduos, dos quais 13 casos evoluíram para óbito. Uma criança recém-nascida sobreviveu aos surtos, e uma mulher grávida sofreu um aborto espontâneo em decorrência do patógeno em questão. Outro fator que aponta para a elevada periculosidade deste micro-organismo é a elevada taxa de mortalidade. Somente para a classe de produtos analisados, e com os dados fornecidos acima, 16% dos indivíduos acometidos e cujos casos foram acompanhados foram a óbito, mas a supressão de sintomas e dificuldade de correlação com o alimento causador fazem com que seja estimado que os números sejam maiores que os dados supracitados.

No Brasil, bactérias da espécie *L. monocytogenes* consistem em um contaminante ambiental de pequenos e grandes estabelecimentos que processam queijos do tipo Minas frescal. Em estudos realizados anteriormente, foi observada a presença do patógeno em questão em 9,6- 15% das amostras de origem ambiental, além de sua presença em queijos Minas frescais, na superfície de queijo tipo prato e na salmoura utilizada no processo de salga dos queijos (BARANCELLI et al., 2011; PIMENTEL-FILHO et al., 2013).

#### **4.5.3 *Escherichia coli***

As cepas de *E. coli* podem ser caracterizadas por bastonetes Gram negativos, anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos. São comensais comuns da flora intestinal de mamíferos e ótimas competidoras, em decorrência de sua habilidade de utilização do

gluconato no cólon de maneira mais eficiente que outros micro-organismos coexistentes. Quando patogênicas, podem ser classificadas em seis patotipos diferentes: Enteroagregativas (EAEC), Enterohemorrágicas (EHEC), Enteroinvasivas (EIEC), Enteropatogênicas (EPEC), Enterotoxigênicas (ETEC) e difusas aderentes (DAEC) (YANG; WANG, 2014). Conseguem se desenvolver em uma faixa de pH que varia entre 3,6 e 9,0, com faixa ótima próximo à neutralidade 6,0-7,0. Quanto à temperatura, são capazes de sobreviver numa faixa que varia entre 8°C e 42°C, com ideal de 37°C (JAY, 2005).

As infecções ou toxi-infecções causadas por *E. coli* veiculada por alimentos podem causar sintomas comuns de gastroenterites, como diarreia severa, por vezes sanguinolenta, dores abdominais, vômitos e esporadicamente febre. Neste caso, os sintomas se iniciam no período de 1 a 10 dias após o consumo dos alimentos infectados, e podem durar de 6 a 8 dias. Contudo, no caso de ocorrência de Síndrome Urêmica Hemolítica em decorrência da infecção por este micro-organismo, podem ser observados os sintomas de redução da produção de urina, acompanhado de escurecimento da mesma, palidez e paralização gradativa dos rins. Neste caso, o tratamento tende a estender-se para toda a vida (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2018b).

Em estudo conduzido por Queiroz et al. (2017), no qual foi avaliada a qualidade higiênico-sanitária de queijos Minas frescais comercializados na cidade de Botucatu, foi observada contagem de coliformes termotolerantes a 45 °C acima do permitido pela legislação vigente em 36% das amostras analisadas em data próxima à data de fabricação dos produtos, que progrediu para 44% das amostras analisadas ao fim da vida de prateleira do produto. Em queijos produzidos a partir de leite cru, o prognóstico é ainda mais preocupante, visto que em estudo realizado por Paneto et al. (2007), 96% das amostras de queijo Minas frescal foram identificadas como contaminadas pelo micro-organismo supracitado, nas variedades verotoxigênica (VTEC) e enterotoxigênica (ETEC). Em adição, foram observados elevados índices de resistência aos antimicrobianos: cefalotina (60,0% dos isolados), ácido nalidíxico (40,0%), doxiciclina (33,0%), tetraciclina (31,0%) e ampicilina (29,0%). Portanto, tendo em vista os dados supracitados, que incluem a elevada incidência do micro-organismo em questão para este produto, com o agravante de periculosidade pelo mecanismo da infecção e índices de resistência dos isolados aos antimicrobianos comuns, destaca-se a importância do desenvolvimento de metodologias alternativas que controlem os níveis de contaminação e aumentem a segurança dos produtos alimentícios analisados frente ao consumidor.

#### 4.5.4 *Salmonella* spp.

As cepas do gênero *Salmonella* podem ser caracterizadas por bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. Crescem em uma faixa de temperatura que varia entre 5 e 45°C, com temperatura ótima de 37°C, quanto ao pH, o ideal para seu desenvolvimento é próximo à neutralidade, entre 6,6 e 8,2, passando a ser bactericida abaixo de 4,05 e acima de 9. Já quanto à umidade disponível, sua inibição ocorre em  $a_w$  inferior a 0,94 (JAY, 2005).

É um micro-organismo cujo principal habitat é o intestino de humanos e animais de sangue quente. Grande parte dos sorotipos causa gastroenterite leve, sem necessidade de tratamento, contudo em crianças e idosos os sintomas podem ser mais severos. Os sintomas incluem náusea, vômitos, diarreia, febre e dor de cabeça, e ocorrem geralmente entre 6 e 48 horas após o consumo do alimento contaminado. Contudo, quando relacionado à *Salmonella* Tiphly e Paratiphly, os sintomas são mais severos e incluem septicemia, com infecções subsequentes, artrite pós enterite e síndrome de Reiter (SILVA, 2010).

Em 2018, na França, um surto envolvendo queijos produzidos a partir de leite cru levou à contaminação de 83 pessoas por uma estirpe de *Salmonella* Enteriditis, que foi identificada também em países próximos como Bélgica e Alemanha, para os quais o queijo também foi distribuído (FLYNN et al., 2018). Pelo banco de dados disponibilizado pelo CDC, não foram encontrados surtos relacionando *Salmonella* spp. a queijos frescos entre os anos de 2007 e 2019. Contudo, um surto envolvendo gado leiteiro em 2016 por uma cepa de *Salmonella* Heidelberg multirresistente à antibióticos levou à contaminação de 56 pessoas em 15 estados por meio de contato com os animais infectados, gerando 17 hospitalizações (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2016). Estes dados reforçam a necessidade de adoção de boas práticas de fabricação, de medidas que reduzam ao máximo o contato entre o couro e fezes dos animais com o leite ordenhado e de parâmetros eficientes de pasteurização para garantia de inativação térmica de possíveis patógenos oriundos destas fontes. Em adição, a multirresistência aos antimicrobianos da cepa identificada do patógeno, aponta para a utilização indiscriminada e negligente de antibióticos de amplo espectro em animais produtores de alimentos, que deve ser abordada com alternativas como utilização de antimicrobianos naturais quando possível.

#### 4.6 Desenvolvimento de mecanismos de resistência a antibióticos

Vêm sendo observado, nas últimas décadas, um aumento consistente e preocupante na proporção de patógenos de categoria bacteriológica resistentes a múltiplos antimicrobianos, com um período cada vez menor entre o lançamento dos antimicrobianos em questão pela indústria farmacêutica e a detecção de estirpes já resistentes. Isto fez com que as bactérias multirresistentes a antimicrobianos passassem a ser consideradas como um importante problema de saúde pública e um mal emergente a nível global (ROCA et al., 2015). Os mecanismos de proteção das células microbianas que evoluíram com o tempo incluem a prevenção de entrada ou maneiras de expulsão dos agentes antimicrobianos do interior das células, produção de enzimas ou proteínas que modifiquem o antimicrobiano ou impeçam seu modo de ação ( $\beta$ -lactamases e proteínas que se ligam ao DNA com objetivo de proteger o alvo), e alteração do alvo dos antimicrobianos em questão (DNA-girase) (HOLMES et al., 2016).

Quanto aos mecanismos que podem resultar no desenvolvimento de resistência por parte dos micro-organismos, estes podem ocorrer via transmissão de material genético entre as células microbianas por meio de três processos: transdução (no qual o material genético de uma bactéria é englobado por alguma partícula viral e transmitida a outra bactéria que atuará como recipiente para o vírus durante a infecção); Conjugação (processo no qual ocorre a transferência genética através de tubos minúsculos formados entre as células microbianas que transportarão o plasmídeo correspondente entre as mesmas); e Transformação, mecanismo pelo qual a bactéria é capaz de capturar fragmentos de DNA livres no ambiente e incorporar em seu próprio cromossomo (HOLMES et al., 2016).

Quando detectado em micro-organismos associados à cadeia produtiva de alimentos, principalmente de origem animal, a presença de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos convencionais geralmente está relacionada com a utilização indiscriminada de antibióticos em animais produtores de alimentos por abordagens como promotores de crescimento e profilaxia, que aumentam a pressão seletiva por estirpes mais resistentes. Em adição, a utilização de antimicrobianos com um único mecanismo de ação tornam mais simples o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos micro-organismos. Desta maneira, se torna necessária e urgente a pesquisa e desenvolvimento de abordagens e antimicrobianos alternativos mais eficientes para o controle da ameaça iminente que bactérias multirresistentes representam (YAP et al., 2014; ROCA et al., 2015).

#### 4.7 Abordagens Alternativas – Alvos múltiplos

Ao considerarmos a elevada diversidade de compostos químicos presentes na composição dos óleos essenciais, em conjunto com a hipótese postulada de que compostos presentes em menores concentrações regulariam as funções dos compostos majoritários e auxiliariam na potencialização do efeito sinérgico dos mesmos, faz com que seja mais provável que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais esteja relacionada mais proximamente com o conjunto de compostos observados em vez de um composto isolado. Desta maneira, destaca-se a hipótese de que a potencialização do efeito antimicrobiano seja decorrente da ação em conjunto de diversos compostos em diversos sítios das células, que configuram a utilização de uma abordagem à alvos múltiplos e mecanismos diversos que levam à inativação dos micro-organismos (YAP et al., 2014).

#### 4.8 Óleos essenciais

Por definição, os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas, líquidos oleosos obtidos a partir de partes de vegetais como folhas, flores, caules, raízes, frutos e sementes e podem ser obtidos métodos como fermentação, ação enzimática extração, compressão e destilação à vapor, o mais utilizado na produção destes compostos em escala industrial (GUENTHER, 2013).

A partir da década de 1920, a descoberta e a produção de antibióticos revolucionaram a medicina. Na década de 1960, a descoberta de alguns dos mais importantes grupos de antibióticos e a resolução dos principais problemas relacionados à quimioterapia deram, a essa época, o título de “era dourada”. Porém, atualmente, estes compostos estão perdendo sua eficácia devido à melhoria da resistência microbiana frente aos mesmos (MAYERS et al., 2009; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Dentre vários agentes utilizados na conservação de alimentos, os óleos essenciais são utilizados pela indústria alimentícia devido ao seu potente efeito antimicrobiano contra vários micro-organismos patogênicos e deteriorantes e por serem compostos naturalmente presentes em diversas espécies de plantas medicinais ou comestíveis, ervas e especiarias (MILITELLO et al., 2010; ARTIGA-ARTIGAS; ACEVEDO-FANI; MARTÍN-BELLOSO, 2017). Segundo a Food and Drug Administration (FDA), os óleos essenciais de Capim-limão, Hortelã-pimenta, Pimenta preta, Alecrim, Citronela e Palmarosa são considerados Generally Recognized as Safe (GRAS), podendo ser utilizados em contato

direto com alimentos ou inseridos nas formulações (UNITED STATES OF AMERICA, 2016). Para os óleos essenciais de Eucalipto, Patchouli e Vetiver, portanto, os resultados obtidos poderão ser aplicados em estudos futuros no desenvolvimento de antimicrobianos sem contato direto com alimentos, como por exemplo sanitizantes. É conhecido o fato de que micro-organismos diferentes apresentam diversos graus de resistência aos óleos essenciais. De maneira geral, estes compostos possuem característica hidrofóbica, o que confere maior eficiência contra bactérias Gram-positivas, uma vez que a camada mais externa de bactérias Gram-negativas possui uma camada de lipopolissacarídeos, o que dificulta a penetração de antimicrobianos de natureza química, em especial lipofílicos como os óleos essenciais, e consequente ação antimicrobiana (DUSSAULT; VU; LACROIX, 2014).

#### **4.8.1 Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* - Alecrim**

Em estudo conduzido por Silveira et al. (2012), foram determinadas a composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de 10 espécies vegetais cultivadas no sul do Brasil. Dentre elas, o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apresentou composição de 24,4% de cânfora, 14,24% de 1,8-cineol, 12,5% de  $\beta$ -mirceno, 9,85% de  $\alpha$ -pineno e 6,99% de  $\beta$ -pineno. Quanto à atividade antimicrobiana, possuiu os melhores resultados contra os microrganismos *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*. O valor referente a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para *S. aureus* variou entre 5 e 20 mg/ml.

##### **4.8.1.1 Cânfora**

A cânfora pode ser caracterizada fisicamente por um pó cristalino, de coloração branca ou sem coloração, com aroma característico de naftalina e densidade similar à da água. Possui característica inflamável e é comumente utilizada na produção de fármacos e flavorizantes, em decorrência de suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, aromáticas, repelente de insetos e pode ser aplicada em bálsamos e diversas preparações para cuidados com a pele (PUBCHEM, 2019f). Quando avaliada em relação à sua atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*, em linhas gerais não apresentou resultados favoráveis, com zonas de inibição de cerca de 10-15mm por meio de metodologia de difusão em ágar, e quando analisada por

meio de metodologia de microdiluição em caldo os resultados apontaram para CIM que variou de entre 6-60ppm para os micro-organismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*; e entre 60-600ppm para *E. coli*, apontando para atividade antimicrobiana ineficiente contra um dos cinco micro-organismos analisados (SCHMIDT et al., 2005).

#### 4.8.2 Óleo Essencial de *Vetiveria zizanioides* - Vetiver

A espécie *Chrysopogon zizanioides* constitui um capim perene que cresce comumente na Índia, e possui estimada posição na mitologia e práticas medicinais indianas. É utilizado como relaxante do sistema nervoso, melhora o ritmo cardíaco e respiração, possui propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antioxidante entre outras (PRAJNA; RICHA; DIPJYOTI, 2013). Os principais componentes do óleo essencial de vetiver são cedr-8-em-13-ol (12,4%),  $\alpha$ -amorfenol (7,8%),  $\beta$ -vatirenenol (5,94%) e  $\alpha$ -gurjuneno (5,91%) (CHOU et al., 2012). Quanto à atividade antimicrobiana, realizada pelo método de diluição em caldo, o extrato de *C. zizanioides* se mostrou mais efetivo contra bactérias gram-negativas como *E. coli* quando comparado a *Bacillus subtilis* e *M. luteus* (PRAJNA; RICHA; DIPJYOTI, 2013).

#### 4.8.3 Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* - Capim limão

A espécie *Cymbopogon citratus*, também conhecido como capim-limão ou capim-cidreira, pertence à família *Poaceae*. É comumente utilizado na medicina popular para tratamento de distúrbios nervosos e gastrointestinais, e como antiespasmódico, analgésico, anti-inflamatório, anti-pirético, diurético e sedativo (BASSOLÉ et al., 2011). O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* é constituído principalmente por citral, em concentração que varia entre 65 e 85%, geralmente distribuídos entre dois isômeros:  $\alpha$ -citral, também conhecido por geranial (39,53- 48,57%), e  $\beta$ -citral (32,86 – 34,6%), também conhecido por neral. Em adição, mircenol (11-11,4%) também pertence aos compostos majoritários do óleo essencial da espécie em questão (KORENBLUM et al., 2013). Em análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM), apresentou melhor atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ( $2,5 \pm 0,1$  mg/ml), *Salmonella* Enterica ( $2,1 \pm 0,1$  mg/ml) e *Salmonella* Typhimurium ( $2,5 \pm 0$  mg/ml) quando comparado à *E. coli* ( $10 \text{ mg/ml} \pm 0$ ) e *L. monocytogenes* ( $8,3 \pm 0,2$  mg/ml) (ANDRADE et al., 2013; BASSOLÉ et al., 2011; MATASYOH et al., 2011).

#### 4.8.3.1 $\alpha$ -Citral

Também conhecido como geranial, consiste em um monoterpeno aldeído acíclico e insaturado, encontrado na composição dos óleos essenciais de diversas espécies vegetais como limões, capim-limão, tangerina e laranjas. Em decorrência de seu aroma característico e pronunciado, geralmente é utilizado como aromatizante em bebidas à base de cítricos entre outros. É considerado pelo FDA como aditivo alimentício GRAS, o que, associado às suas características sensoriais agradáveis, faz com que este composto seja um ingrediente antimicrobiano natural a ser utilizado amplamente pela indústria alimentícia. É conhecido que o mecanismo de ação dos terpenos frente às células microbianas consiste primariamente na ação tóxica deste composto quando em contato com as membranas plasmáticas (SOMOLINOS et al., 2009).

Em estudo realizado para avaliação dos mecanismos de ação do geranial frente à *Cronobacter sakazakii*, foram observadas mudanças intracelulares nas concentrações de ATP e pH, na morfologia das células, na integridade da membrana e também alterações de sua permeabilidade, o que resultou, por fim, no colapso das membranas celulares (SHI et al., 2016). Quando analisado frente aos patógenos *S. aureus* (três cepas padrões, incluindo duas cepas MRSA), e *L. monocytogenes*, o composto citral apresentou MIC por microdiluição e diluição em ágar variável, entre 0,06 e 0,08mg/ml, com atividade bactericida (MBC) em concentração entre 0,08 e 0,15mg/ml por técnica de microdiluição. Estes valores são consistentemente inferiores, portanto indicadores de maior eficiência antimicrobiana do composto isolado quando comparado ao óleo essencial na íntegra, o que confirma a hipótese de se tratar de um dos principais compostos com atividade antimicrobiana de sua composição. Em adição, não foi observado o desenvolvimento de resistência aos compostos analisados no estudo em questão, e o mesmo apresentou elevada eficácia no combate à formação de biofilmes pelos microorganismos analisados (APOLÓNIO et al., 2014).

#### 4.8.3.2 Neral

As moléculas de neral podem ser caracterizadas como um isômero da molécula de alfa-citral ou geranial, consiste em um monoterpenóide, de configuração enal e que também pode ser citado como 3,7-dimetiloctanal com insaturações nas posições C-2 e C-6. Naturalmente, também é isolado a partir do óleo essencial de espécies cítricas como limão, tangerina, laranja

ou capim-limão. É um metabólito vegetal, que possui ação como indutor à apoptose celular (PUBCHEM, 2019).

#### 4.8.3.3 Mirceno

Também presente em outras espécies vegetais como manga e manjeriço, é um composto que possui princípio ativo sedativo. Quando utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica na produção de aromas e fragrâncias, respectivamente, possui características sensoriais como aroma frutado e característico de cravo, podendo expressar aroma pungente quando aplicado em maiores concentrações. É um composto que possui atividade sinérgica com outros terpenos por reações variadas (HARTSEL et al., 2016). Suas características físicas compõem um óleo líquido e de cor amarela, menos denso que a água e insolúvel na mesma. Como agentes de periculosidade, é inflamável e pode gerar irritações. Contudo, é considerado GRAS, podendo ser utilizado na aplicação direta em alimentos, e normatizado pelo JECFA como agente aromatizante (PUBCHEM, 2019b).

#### 4.8.4 Óleo Essencial de *Cymbopogon martinii* - Palmarosa

A Palmarosa é uma gramínea perene, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, e seu óleo essencial é um valioso componente de perfumes, cosméticos e produtos farmacêuticos. Possui propriedades como repelente de insetos, na aromaterapia e como antimicrobiano (KHAN et al., 2015). Os principais componentes do óleo essencial de Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) são o geraniol (52,49-57,49%), acetato de geraniol (12,01-13,56%) e linalool (1,15-1,71%), composto cujo mecanismo antimicrobiano está relacionado com sua elevada solubilidade em água e habilidade de penetração na parede celular bacteriana. O óleo essencial em questão mostrou-se, a partir da metodologia de Concentração Inibitória Mínima (CIM), eficiente composto antimicrobiano mesmo em baixas concentrações contra cepas de *S. aureus* (CIM 0,48-1,04mg/ml) e *E. coli* (CIM 1,54 – 2,09mg/ml) (TSAI et al., 2011; ANDRADE et al., 2013).

#### 4.8.4.1 Geraniol

Consiste em um álcool monoterpene acíclico, que é resultante da mistura de dois cis-trans isômeros: trans-geraniol e cis-nerol. Suas características físicas constituem um óleo de cor amarela-pálida, insolúvel em água, mas geralmente solúvel em solventes orgânicos. É comumente encontrado em tecidos vegetais e flores, em conjunto com geranial e neral, que consistem em produtos da oxidação do geraniol. É um composto amplamente utilizado na formulação de fragrâncias, como repelente de insetos natural, possui atividade antimicrobiana e anti-tumoral comprovada (CHEN; VILJOEN, 2010). Quando extraído da espécie *C. citratus*, apresentou ainda, atividade antimicrobiana superior quando comparado ao óleo essencial na íntegra, por meio de observação de maiores zonas de inibição por meio de metodologia de disco-difusão em ágar frente à 20 micro-organismos dentre eles bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*), bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) e fungos (*C. albicans* e *Aspergillus flavus*) (ARPUTHA; SELVAMANI; LATHA, 2012). Terpenóides como o geraniol possuem elevado potencial de utilização na indústria produtora de alimentos em decorrência da sua capacidade de inibição de um amplo espectro de micro-organismos, e o mecanismo de ação desta classe de compostos está normalmente associada à presença do grupo hidroxil e presença de elétrons deslocados, contudo os mecanismos específicos de ação do composto supracitado ainda necessitam de maior elucidação (MANU, 2016).

#### 4.8.4.2 Acetato de geranil

Consiste em um composto natural e orgânico, classificado abaixo dos monoterpenos. Suas características envolvem um líquido incolor, insolúvel em água, mas solúvel em óleos e álcool, com aroma frutal e floral agradável, podendo ser aplicado amplamente como aromatizante em alimentos e também como componente de fragrâncias pela indústria de cosméticos e farmacêutica (GUPTA et al., 2013). Possui atividade antiinflamatória e antifúngica comprovada na ordem de 0.32 µl/ml a 1.25 µl/ml para os micro-organismos *Cryptococcus neoformans* e *Candida guilliermondii*, respectivamente (GONÇALVES, 2012).

#### 4.8.4.3 Linalool

Consiste em um monoterpenóide com um grupo hidróxi na posição 3, classificado, portanto, como um álcool terciário. É um composto produzido naturalmente por mais de 200 espécies vegetais, dentre elas frutas cítricas e canela. De elevada aplicabilidade comercial em essências devido ao seu aroma floral com um toque picante, constitui um componente oleoso e volátil, com atividade antimicrobiana superior em decorrência de sua solubilidade facilitada em água (ANDRADE et al., 2013; PUBCHEM, 2019c). Quando aplicado isoladamente e em filmes biodegradáveis produzidos a base de amido de milho, foi testada a eficiência da atividade antimicrobiana deste composto frente à *S. aureus* por meio da metodologia de disco-difusão. Baseado nos resultados, foi observada atividade antimicrobiana satisfatória a partir da formação de halos de dimensão de  $18,6 \pm 1$  mm quando aplicado na concentração de 2,38%. Em adição, seguiu inoculação de *S. aureus* nas superfícies superior e inferior de queijos cheddar na ordem de  $10^4$  UFC/g, com posterior acondicionamento nos biopolímeros desenvolvidos. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar a inibição do micro-organismo em questão nas condições analisadas (KUORWEL et al., 2011). O mecanismo de ação antimicrobiana do linalool inclui a permeabilização da membrana celular e facilitação de processos subsequentes, podendo ser utilizado em sinergismos com demais óleos essenciais ou compostos majoritários que possuam mecanismos e alvos de ação diferenciados, como inativação de enzimas ou agrupamento com proteínas específicas no interior da célula. Neste campo, resultados satisfatórios foram observados na combinação de linalool com metil chavicol em ratios variados (RADULOVIC et al., 2013; HERMAN; TAMBOR; HERMAN, 2015).

#### 4.8.5 Citronela

Ó óleo essencial de citronela é amplamente conhecido por seu efeito repelente de pragas como mosquitos, pernilongos entre outros insetos, portanto é amplamente utilizado pela indústria farmacêutica como repelente (SCHRERER, 2009). Os principais componentes do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* são, principalmente, Citronelal (29,6%), 2,6-octadienal, 2,7-dimetil (11%), cis-2,6-dimetil-2,6-octadieno (6,9%) e ácido propanoico (6,9%). Se mostrou efetivo contra cepas de *E. coli*, com CIM 0,244 $\mu$ g/ml para ATCC 25922 e 0,488 $\mu$ g/ml para cepas isoladas a partir de *Lates calcarifer* e *Macrobrachium rosenbergii*. Para *Salmonella* spp,

foi observado CIM de 0,244µg/ml para cepa isolada a partir de *Lates calcarifere* e CIM de 0,488µg/ml para cepas isoladas a partir de *Macrobrachium rosenbergii* (WEI; WEE, 2013).

#### 4.8.6 Óleo Essencial de *Eucalyptus globulus* - Eucalipto

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae* e é um dos mais importantes e mais amplamente cultivados a nível mundial. Trata-se de uma árvore alta, de folhagens verdes e nativa da Austrália e Tasmânia. A espécie *E. globulus* é a principal fornecedora de óleo essencial, que possui elevada demanda no mercado devido às suas propriedades e aplicações, como em anestésicos, antissépticos e desinfetantes (RAHO, BENALI; 2012).

Com base em análises de cromatografia gasosa, os componentes majoritários no óleo essencial de *E. globulus* em fase líquida são 1,8-cineol (45,4%), limoneno (17,8%), p-cimeno (9,5%),  $\gamma$ -terpineno (8,8%),  $\alpha$ -pineno (4,2%) e  $\alpha$ -terpineol (3,4%). Quando analisado quanto à sua atividade antimicrobiana por meio de metodologia de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente a cepas de *S. aureus* e *E. coli*, apresentou resultados satisfatórios, com valor de CIM e CBM de 2,25mg/ml e 4,5mg/ml para *S. aureus* e 4,5mg/ml e 9mg/ml para *E. coli*, respectivamente (TYAGI; MALIK, 2011).

##### 4.8.6.1 Eucaliptol

Consiste em um derivado do óleo essencial de eucalipto, majoritariamente, com características relativas a monoterpenos e ciclohexanol. Comumente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica com a função de flavorizante em produtos como enxaguante bucal e como repelente de insetos, também pode ser utilizado como solvente e possui atividades antimicrobianas (PUBCHEM, 2019e). Em estudo conduzido por Zengin e Baysal (2014), foi observada uma extensão considerável da fase lag ou de adaptação dos micro-organismos *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 e *S. aureus* quando expostos ao eucaliptol sob as concentrações de 0,7%, 0,6% e 1 %, respectivamente. Comumente presente nos óleos essenciais de uma vasta variedade de espécies vegetais, o eucaliptol possui características que incluem a presença de oxigênio funcional em sua estrutura, identificado por ser responsável pelo aumento na atividade antimicrobiana de terpenóides (LV et al., 2011).

#### 4.8.7 Óleo Essencial de *Eucalyptus citriodora* - Eucalipto

A espécie de *E. citriodora* é comumente utilizada para fins medicinais e farmacêuticos, como em medicamentos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos para sintomas de infecções respiratórias. O extrato das folhas de eucalipto foi aprovado como um aditivo alimentício natural, na categoria de antioxidantes, na “Lista de Aditivos Alimentícios Existentes no Japão” (TYAGI; MALIK, 2011b). Dentre os principais componentes do óleo essencial de *E. citriodora*, temos o citronelal (90,07%), citronelol (4,32%) e o  $\beta$ -cariofileno (1,46%). Quanto à sua atividade antimicrobiana, demonstrou ser mais efetivo quando comparado ao óleo essencial de *E. globulus* frente às cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e obteve igual desempenho frente às cepas de *E. coli* multirresistentes aos antibióticos, devido à combinação entre citronelal e citronelol, presentes no óleo, o que o tornam mais ativo (MULYANINGSIH et al., 2011).

#### 4.8.8 Óleo Essencial de *Mentha piperita* - Hortelã-pimenta

A Hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) é pertencente à família *Lamiaceae*, e seu gênero é amplamente conhecido por seu valor aromático e medicinal. Existem cerca de 25 a 30 espécies, cultivadas em regiões de clima temperado a tropical como América, Europa, China e Brasil. No ano de 2007, o mercado mundial para o óleo essencial de hortelã se encontrava na faixa das dezesseis mil toneladas, devido à suas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e na produção de cosméticos (SAHARKHIZ et al., 2012). Possui propriedade antiviral, analgésica, antifúngica, antioxidante e impede a formação de biofilmes. Seus principais componentes são o mentol (53,28%), acetato de mentila (15,10%), mentofurano (11,18%), neomentol (2,79%) e a mentona (2,45%). Quanto a atividade antimicrobiana, mostrou-se efetivo contra *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* (CIM 1,13mg/ml) (TYAGI; MALIK, 2011a).

##### 4.8.8.1 Mentol

Consiste em um composto orgânico, com características alcoólicas, obtido sinteticamente a partir dos óleos essenciais de hortelã ou hortelã-pimenta. Amplamente utilizado como flavorizante pela indústria alimentícia para fortificar o sabor de menta de produtos, e quando aplicado em demais produtos farmacêuticos apresenta também propriedades

analgésicas e anestésicas em decorrência de sua característica que combate irritações da pele e mucosas (PUBCHEM, 2019d). Em estudo conduzido por Galucci et al. (2009), foi observado que, quando testado frente aos micro-organismos relacionados à DTA's *S. aureus*, *E. coli* e *B. cereus*, o composto majoritário mentol não obteve atividade antimicrobiana satisfatória quando isolado, contudo, quando aplicado em conjunto com geraniol, apresentou atividade sinérgica contra os micro-organismos supracitados da categoria Gram-positivos (*S. aureus* e *B. cereus*), e atividade sinérgica quando em conjunto com timol e frente à *B. cereus*. Em estudo similar, no qual foi testada a atividade antimicrobiana do mentol frente à seis cepas de *S. aureus*, incluindo cinco cepas resistentes à meticilina (MRSA), foi observado CIM de 1mg/ml para o composto isoladamente, e sinergismo quando analisado em conjunto com o antimicrobiano convencional mupirocina (KIFER; MUŽINIĆ; KLARIĆ, 2016).

#### **4.8.8.2 Mentona**

Composto utilizado amplamente na aplicação de produtos de origem farmacêutica por suas propriedades aromáticas. Quando analisado em busca de determinação de sua atividade antimicrobiana frente a 19 micro-organismos, apresentou, por meio de método de microdiluição em placa, os valores de 2,77-5,55ppm para inibição de *S. aureus* e de 5,55-11,11 ppm para *E. coli* (OUMZIL et al., 2002).

#### **4.8.9 Óleo Essencial de *Piper nigrum* - Pimenta preta**

A pimenta-preta (*Piper nigrum*) é pertencente à família *Piperaceae*. É amplamente consumida e utilizada em alimentos, devido as suas características aromáticas e flavorizantes. É tradicionalmente utilizada no tratamento da malária na Índia, e da epilepsia na China. Possui atividade anti-inflamatória. Seu principal componente, a piperina, ainda apresentou atividade como analgésico, hepatoprotetivo e antioxidante, utilizado no tratamento do mal de Alzheimer (ZARAI et al., 2013). O óleo essencial de pimenta preta possui, como principais componentes, o limoneno (23,8%),  $\delta$ -3-careno (21,97%),  $\alpha$ -pineno (12,89%),  $\beta$ -cariofileno (11,34) entre outros (ANDRADE et al., 2013).

Em estudo realizado por Zacarão e Pilleti (2013), no qual foi avaliada a atividade antimicrobiana de óleos essenciais adicionados em cortes de frango temperados, foi observado que para o óleo essencial de pimenta preta ocorreu redução do crescimento de *S. aureus* a um

nível de 95% para a concentração de 0,02ml/ml. Em concentrações menores, foi possível observar redução de até 30% no crescimento de *E. coli*.

#### **4.8.10 Óleo Essencial de *Pogostemon cablin* - Patchouli**

O *Pogostemon cablin* (Patchouli) é pertencente à família *Lamiaceae*. É uma erva perene, utilizada principalmente na indústria de cosméticos e perfumaria devido à sua propriedade de fixação do aroma (KARIMI, 2014). Os principais componentes do óleo essencial de patchouli são o patchoulol (25,21),  $\delta$ -guaiano (11,49), gurjuneno- $\alpha$  (11,26), seicheleno (9,61%),  $\alpha$ -guaiano (9,56%) entre outros (ANDRADE et al., 2013). Por método de Concentração inibitória mínima, mostrou-se efetivo contra bactérias gram positivas como *S. aureus* (0,395 – 0,510mg/ml) e *B. cereus* (0,08 a 0,1mg/ml) e contra gram negativas *E. coli* (0,4 mg/ml), *Salmonella* (0,95 mg/ml) e *P. aeruginosa* (1,25 mg/ml) (HUSSAIN et al., 2011).

### **4.9 EMBALAGENS ATIVAS**

O conceito de embalagem ativa pode ser definido como um modo em que o produto, a embalagem e o ambiente interagem de maneira a manter a qualidade, promover segurança e, dessa maneira, prolongar a vida de prateleira do alimento (PRASAD; KOCHHAR, 2014). Além da necessidade primordial das embalagens oferecerem proteção mecânica, físico-química e conterem o produto, também necessitam, atualmente, apresentar sustentabilidade do ponto de vista ambiental, sendo necessário o desenvolvimento de produtos biodegradáveis como embalagens compostas por biopolímeros à base de gelatina e quitosana. Esta matriz polimérica é considerada biodegradável, e forma filmes flexíveis, de aplicação possível em alimentos (GOMEZ-ESTACA et al., 2010).

#### **4.9.1 Embalagens antimicrobianas**

O desenvolvimento de embalagens ativas antimicrobianas possui grande interesse prático, e consiste no controle da contaminação microbiológica dos alimentos por meio da liberação de compostos sintéticos, naturais ou biológicos, que migram do polímero em que foram adicionados para a superfície do alimento, onde geralmente são iniciados os processos de deterioração dos produtos como uma consequência da manipulação e preparação. A

utilização de embalagens ativas antimicrobianas são uma resposta à demanda dos consumidores por produtos mais frescos, próximos ao natural, com boa qualidade nutricional, com redução dos tratamentos agressivos e da utilização de conservantes ou aditivos químicos, e melhoria para os produtores quanto à logística e redução de perdas devido ao aumento de vida de prateleira dos produtos (GAVARA, 2015). Os compostos antimicrobianos adicionados a embalagens possuem função similar à de conservantes adicionados no próprio produto, uma vez que também atuam na fase lag ou de adaptação dos micro-organismos, estendendo-a, com modo de ação diferenciado, uma vez que atua na superfície do produto, onde geralmente se iniciam os processos de deterioração (RAMOS et al., 2012). Outra característica que favorece esta abordagem quando comparada à adição direta de conservantes nos produtos alimentícios consiste no fato de que quanto mais fresco o produto, menores as concentrações de compostos transferidos para a superfície do mesmo, fazendo com que a ingestão de aditivos seja inferior por meio desta abordagem quando comparado às aplicações tradicionais.

#### **4.9.2 Antimicrobianos sintéticos e naturais**

Os antimicrobianos utilizados no auxílio da conservação de alimentos podem ser nomeados como tradicionais após atenderem uma série de condições, como terem sido utilizados por muitos anos, por aprovação por diversos países e órgãos regulamentadores como antimicrobianos que possam ser utilizados em alimentos e quando são produzidos por processos sintéticos, embora muitos dos compostos produzidos sinteticamente estejam também presentes na natureza, como o nitrito que inicialmente era considerado uma contaminação de sais utilizados no processo de salga de carnes, ácido acético presente no vinagre, ácido benzoico proveniente de cranberries entre outros (DAVIDSON; SCHMIDT; TAYLOR, 2013). Inclui também outros grupos de compostos disponíveis para aplicação comercial, como compostos inorgânicos e metais a exemplo de micro e nanopartículas de prata (AgNP), triclosan, derivados de amônia entre outros (BASTARRACHEA; DHAWAN; SABLANI, 2011; MUÑOZ-BONILLA; FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2012).

Compostos naturais como a quitosana têm apresentado ótimo potencial como um agente antimicrobiano em embalagens frente a uma vasta variedade de micro-organismos, bem como compostos secundários do metabolismo de espécies vegetais como óleos essenciais, bacteriocinas como a nisina e lisozima têm sido estudados com o objetivo de substituir total ou parcialmente os conservantes químicos. Este tipo de ação é incentivado por parte dos

consumidores, que se sentem atraídos pela imagem de produtos mais saudáveis. Os estudos também são extensos para a atividade de micro-organismos benéficos como as bactérias lácticas e seus produtos metabólicos, como por exemplo as bacteriocinas, que consistem em um grupo heterogêneo de proteínas que possuem atividade antimicrobiana e propriedades variáveis, dependendo de peso, origem genética e características bioquímicas (ZHOU; XU; LIU, 2010). São compostos catiônicos, hidrofóbicos, anfifílicos e sua atividade antimicrobiana é dada principalmente contra bactérias gram-positivas. A nisina, um polipeptídeo produzido por *Lactococcus lactis*, é comumente utilizada em revestimentos comestíveis e embalagens de alimentos devido ao seu desempenho na inibição do crescimento de bactérias gram-positivas como *L. monocytogenes* e à possibilidade de aplicação em polímeros baseados em colágeno com ação continuada frente à micro-organismos patogênicos e deteriorantes mesmo após tratamento térmico e estocagem sob refrigeração por períodos prolongados, e pode ser utilizada isolada ou em combinação com outros compostos como sorbato de potássio, com o objetivo de retardar o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em produtos cárneos, por exemplo (REALINI; MARCOS, 2014).

### 4.9.3 Biopolímeros

Atualmente, os materiais plásticos de origem biológica são produzidos com base em biopolímeros, ou polímeros de fontes renováveis, que vêm atraindo atenção como um método que visa a produção de materiais com apelo ambiental por duas frentes de ação: pela utilização de rejeitos e materiais que seriam descartados pela indústria alimentícia e também na frente que destaca a biodegradabilidade e redução do impacto ambiental causado pelo descarte posterior das embalagens. Estes polímeros podem ser classificados como: diretamente extraídos de biomassa, como por exemplo os polímeros formados por polissacarídeos (amido e quitosana) e proteínas (gelatina e proteína do soro do leite ou de soja); polímeros sintéticos constituídos de monômeros derivados de biomassa ou óleo (polivinil álcool – PVOH ou etileno vinil álcool – EVOH) e polímeros produzidos por naturalmente ou por micro-organismos geneticamente modificados (celulose bacteriológica). Estes tipos de materiais podem ser utilizados para aplicação em monocamada ou na formação de polímeros multicamadas para o acondicionamento de alimentos. Os materiais extraídos de fontes de biomassa, como proteínas e polissacarídeos, possuem excelente potencial de barreira para gases e aromas. Por outro lado,

dentre os principais obstáculos para a utilização deste tipo de matriz estão a dificuldade de processamento em equipamentos convencionais, alta sensibilidade à água e vapor de água em decorrência de sua característica hidrofílica e a elevada rigidez inerente dos polímeros formados, necessitando da aplicação de agentes plastificantes para melhoria das características que envolvem a modificação das características físicas dos filmes desenvolvidos como a flexibilidade e elasticidade dos mesmos. Dentre os principais agentes plastificantes utilizados na composição destas matrizes, temos: glicerol, sorbitol e manitol. Contudo, a aplicação de agentes plastificantes hidrofílicos tende a elevar a permeabilidade dos polímeros ao vapor de água, portanto, o r tio entre agente plastificante e polímero   a chave para determina o das propriedades dos revestimentos/filmes comestíveis (COUPLAND et al., 2000). O consumo mundial para este tipo de material, no ano de 2010, era de cerca de 125.000 toneladas, com um valor de mercado de US\$454 milhões. Já para o mercado de polímeros de origem petroquímica, vemos um consumo de 250 milhões de toneladas, e cerca de 40% desta produ o   voltada para a produ o de embalagens (ROBERTSON, 2013). Algumas das abordagens mais citadas para a utiliza o destes materiais são a redu o do impacto ambiental causado pela utiliza o de polímeros convencionais, abundância, baixo custo e degradabilidade dos compostos aplicados (PELLISSARI et al., 2009), além do fato de muitos dos substratos utilizados, como gelatina extraída de bovinos ou peixes e proteínas do soro de leite serem subprodutos da indústria de alimentos, o que confere maior apelo ambiental para utiliza o de tais substâncias (GÓMEZ-ESTACA et al., 2010).

Dentro desta categoria encontram-se também filmes comestíveis, que podem ser consumidos juntamente com os alimentos e podem ser formulados com base em polímeros proteicos, a base de polissacarídeos ou compostos (formulados a base de proteínas, polissacarídeos e lipídeos). Dentro desta variedade de fontes de matrizes poliméricas e suas combina es, os polissacarídeos possuem elevada barreira contra óleos e lipídeos, enquanto sua barreira   vapor de água não   satisfatória. Para polímeros produzidos   base de proteínas, as propriedades observadas são em geral melhores que aquelas obtidas por filmes derivados de polissacarídeos. Já os lipídeos incorporados, que possuem características hidrofóbicas, proporcionam uma melhora na barreira ao vapor de água e umidade quando aplicados, contudo, em decorrência de possíveis problemas relacionados às características organolépticas e textura dos filmes sua aplica o deve ser dosada apropriadamente (VIEIRA et al., 2011). Desta maneira e por meio desta abordagem, os polímeros produzidos são capazes de melhorar as características nutricionais dos alimentos, além da possibilidade de libera o de compostos antimicrobianos

incorporados à matriz polimérica, que deve ocorrer de maneira a manter doses efetivas do aditivo durante o período de estocagem. A efetividade dos biopolímeros antimicrobianos depende da natureza e tipo de hidrocolóide utilizado como matriz polimérica além de características provenientes do tipo de antimicrobiano utilizado, das taxas de retenção e liberação dos compostos, além dos micro-organismos que são alvo desta abordagem (FERNÁNDEZ-PAN et al., 2015). Em estudo conduzido por Emiroğlu et al. (2010), filmes comestíveis produzidos a base de proteína de soja adicionados dos óleos essenciais de tomilho e orégano revelaram obter boa atividade antimicrobiana contra cepas de *E. coli* e *S. aureus* e, quando utilizados para acondicionamento de bifes de carne moída, apresentou redução nas contagens de coliformes e *Pseudomonas* spp. durante o tempo de estocagem.

#### 4.9.4 Gelatina

A gelatina pode ser definida como um composto proteico advindo da mistura de peptídeos e proteínas obtidos a partir da hidrólise parcial do colágeno, que consiste na principal proteína fibrosa que constitui os ossos, pele, cartilagens e tecidos conjuntivos de animais, e suas propriedades podem ser influenciadas por uma seleção de fatores intrínsecos como a fonte, espécie e idade do animal, bem como o tipo do colágeno a partir do qual é produzida. A qualidade da gelatina para aplicações particulares depende amplamente de suas propriedades reológicas, que vão além das propriedades físico-químicas e incluem sua composição, solubilidade, transparência, aroma, sabor, cor, força do gel e estabilidade térmica (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

Nos últimos anos, além das aplicações comuns da gelatina baseadas nas suas características viscoelásticas e formadoras de gel, vêm ganhando espaço e um aumento significativo, especialmente na indústria alimentícia, sua utilização em produtos como por exemplo emulsificantes, estabilizantes, agentes micro-encapsulantes e embalagens ou revestimentos biodegradáveis e comestíveis, principalmente pela tendência à substituição de compostos sintéticos por naturais, utilização de resíduos da indústria e biodegradabilidade no descarte (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

#### 4.9.5 Quitosana

A quitosana é um polímero natural obtido a partir da desacetilação da quitina, que consiste em um dos principais componentes dos exoesqueletos e cascas de uma gama variada de crustáceos como camarões, lagostas e caranguejos, e apresenta solubilidade facilitada em soluções aquosas com o pH levemente ácido, com apresentação de carga superficial positiva nestas condições. Quando comparada a outros polissacarídeos, apresenta funções vantajosas e diferenciadas, como biodegradabilidade, atoxicidade e biocompatibilidade (BENBETTAÏEB et al., 2014). A atividade antimicrobiana conferida à quitosana engloba de maneira geral dois principais mecanismos: a) ligação eletrostática entre a membrana celular microbiana e as moléculas de quitosana, o que dificulta a absorção de nutrientes por parte da célula microbiana e acarreta consequentemente em sua inatividade, e b) permeabilidade das células microbianas, que acarreta na absorção de moléculas de quitosana e posterior inatividade das células (KALIA; AVÉROUS, 2011).

É um dos polissacarídeos mais investigados para desenvolvimento de embalagens antimicrobianas para aplicação em alimentos em decorrência da capacidade de formação de filmes transparentes com propriedades tecnológicas como boa barreira para gases, além de sua atividade antimicrobiana e antifúngica inerente e a possibilidade de utilização como carreadora de compostos bioativos como óleos essenciais, nisina e ácidos orgânicos (FERNÁNDEZ-PAN et al., 2015).

A quitosana comercial está disponível atualmente em três versões, diferenciadas pelo peso molecular: alto (400kDa), médio (180kDa) e baixo (41kDa), aproximadamente. A diferenciação deste composto baseado em seu peso molecular possui efeito direto em suas propriedades formadoras de filme e antimicrobianas. Quando aplicada em sua versão que dispõe de maior peso molecular em formulação de filmes comestíveis adicionados de carvacrol, por exemplo, foi observada maior viscosidade da FFS (Film Forming Solution), a formação de maiores gotículas de carvacrol e maior taxa de liberação do composto, apontando para a modulação da velocidade de liberação de compostos a partir da utilização de quitosana de pesos moleculares inferiores com o objetivo de obter uma menor taxa de transferência de compostos bioativos e manutenção dos níveis de aditivos durante toda a vida de prateleira do produto (FERNÁNDEZ-PAN et al., 2015).

#### **4.9.6 Emulsificantes - Lecitina de soja**

Ao constatar que um dos fatores limitantes mais importantes no desenvolvimento de biopolímeros baseados em matrizes poliméricas derivadas de polissacarídeos e proteínas se dá na insatisfatória barreira à umidade e vapor de água em decorrência das propriedades hidrofílicas destes derivados e também dos agentes plastificantes utilizados (como glicerol e sorbitol), algumas abordagens diferenciadas para melhoria das características dos filmes formados têm sido desenvolvidas, como adição de lipídeos e formação de emulsões a partir de adição conjunta com compostos surfactantes. Os compostos surfactantes constituem uma classe de substâncias que possuem características anfifílicas, que reduzem a tensão superficial entre a fase aquosa e oleosa da emulsão, e possuem atividade detergente e emulsificante. Em biopolímeros proteicos, ainda, interagem com a porção polar e hidrofóbica de proteínas simultaneamente. Dentre os surfactantes naturais mais utilizados para esta aplicação, a lecitina apresenta elevada eficiência como estabilizante das emulsões nas FFS (ANDREUCCETTI et al., 2011).

A lecitina de soja é proveniente do processo de degomagem do óleo extraído, que consiste na remoção dos fosfatídeos, também conhecidos neste caso como fosfatidil-colina. Apesar de outros óleos de origem vegetal possuírem também gomas, a soja segue como maior fonte comercial de lecitina em decorrência da elevada concentração destes compostos no óleo em questão, além da produção em larga escala, que reduz custos e facilita a obtenção dos mesmos. A lecitina de soja comercial é constituída majoritariamente por fosfatidil colina (16%), fosfatidil etanolamina (14%) e fosfatidil inositol (10%) (ERICKSON, 1995).

#### **4.9.7 Agentes plastificantes**

Segundo o conselho da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry), os agentes plastificantes podem ser definidos como materiais ou substâncias que podem ser incorporados em outros materiais (como plásticos ou elastômeros) afim de melhorar suas propriedades como flexibilidade e extensibilidade, a partir da redução das tensões à deformação, densidade, viscosidade, dureza e carga elétrica inerentes aos polímeros. Desta maneira, os agentes plastificantes podem ser caracterizados por compostos não voláteis e de baixo peso molecular, utilizados como aditivos pela indústria produtora de polímeros por suas propriedades. O processo de secagem das

estruturas que conformam os biopolímeros produzem em geral filmes com elevada força e coesão, que frequentemente podem acarretar na produção de materiais pouco flexíveis e quebradiços. A adição de agentes plastificantes é estimulada então com o objetivo de promover uma melhora nas características dos polímeros desenvolvidos, uma vez que leva a uma redução nas forças intermoleculares ao longo das cadeias poliméricas, o que auxilia na flexibilidade dos filmes formados e mobilidade das cadeias, além de evitar o encolhimento dos filmes durante os processos de estocagem e manipulação (VIEIRA et al., 2011).

Neste âmbito, a seleção do agente plastificante para uma formulação ou sistema, bem como a concentração a ser utilizada, é baseada na compatibilidade, características desejáveis aos polímeros, permanência do agente plastificante e a quantidade necessária para o efeito desejado (MOHSIN; HOSSIN; HAIK, 2011). Quando aplicados em filmes provenientes de biopolímeros, os agentes plastificantes podem ainda ser classificados como hidrofóbicos, que possuem a característica de reduzir os espaços entre as redes poliméricas e assim reduzem a absorção de água, e hidrofílicos ou solúveis em água, que se adicionados em excesso podem acarretar na difusão da água das formulações. Com base nas características dos agentes plastificantes, é importante que sejam utilizados em quantidades adequadas uma vez que seu tipo e concentração na FFS afetam intensamente a formação dos filmes e suas características (VIEIRA et al., 2011).

#### **4.9.8 Glicerol**

O glicerol, também nomeado quimicamente como 1,2,3-propanetriol, constitui uma matéria-prima de elevada importância industrial na produção de químicos de elevado valor agregado em decorrência de suas principais características que englobam atoxicidade, biodegradabilidade, sustentabilidade e por se tratar de um composto comestível. Pode ser obtido por diversas vias, como a fermentação da glicose, hidrogenólise do sorbitol ou como um co-produto da indústria de óleo vegetal, tendo em vista que a cada tonelada de biodiesel produzido, cerca de 100kg de glicerol são obtidos. Esta via de obtenção, em específico e com a elevação na demanda dos últimos anos, proporcionou uma redução nos preços e ampliou a disponibilidade deste composto, o transformando em um dos químicos mais promissores do mercado (SIVIAIAH et al., 2012).

Quando aplicado aos biopolímeros proteicos produzidos à base de proteína de trigo, as formulações contendo glicerol apresentaram melhor efeito do agente plastificante, incluindo

menor solubilidade, maior elasticidade e flexibilidade (AGUIRRE; BORNEO; LEÓN, 2013). Quando aplicado nas formulações de biopolímeros nos quais a matriz polimérica é proveniente de polissacarídeos como o PVOH, promoveu a flexibilidade e maleabilidade dos filmes quando comparado com aqueles adicionados de sorbitol, contudo, com a desvantagem de permitir maior taxa de transmissão de vapor de água através dos filmes desenvolvidos (OOI et al., 2012).

#### **4.9.9 Sorbitol**

O sorbitol consiste em um álcool derivado de açúcares, comumente utilizado em decorrência de seu baixo custo e atualmente na lista dos químicos mais importantes em decorrência de sua extração a partir de biomassa. Pode ser aplicado amplamente em alimentos, medicamentos, cosméticos produtos de higiene pessoal e é um dos precursores do ácido ascórbico pela indústria farmacêutica, que consome cerca de 15% do sorbitol produzido a nível mundial. As vantagens na sua utilização partem dos princípios de abundância, distribuição ampla e por se tratar de uma matéria-prima renovável. É um produto que pode ser obtido a partir de uma série de vias como hidrólise enzimática em conjunto com hidrogenação a partir da dextrose obtida por fontes como trigo e milho (ZHANG et al., 2013).

Quando aplicado à biopolímeros produzidos à base de proteínas de trigo, os filmes formados apresentaram maior solubilidade, menor permeabilidade ao vapor de água, maior rigidez e fragilidade quando comparados aos filmes adicionados de glicerol. Uma das hipóteses levantadas refere-se ao efeito anti-plastificante do composto nas condições e em conjunto com a matriz polimérica analisada (AGUIRRE; BORNEO; LEÓN, 2013). Quando aplicado a matrizes poliméricas cuja origem são polissacarídeos como o PVOH, apresentou as mesmas características aos filmes formados, com menor permeabilidade ao vapor de água, contudo menor flexibilidade dos filmes desenvolvidos (OOI et al., 2012).

#### **4.9.10 Lipídeos**

Lipídeos podem ser caracterizados como compostos orgânicos e apolares, com propriedades hidrofóbicas em decorrência do elevado peso molecular destes compostos. Podem ser divididos entre óleos, que se apresentam em estado líquido à temperatura ambiente e gorduras, que possuem ponto de fusão acima de 40°C. Óleos essenciais, por exemplo, possuem também grupos fenólicos que são fundamentais para a atividade antimicrobiana expressa para

determinadas espécies. Quando adicionados a biopolímeros a base de quitosana, por exemplo, melhoram as características antimicrobianas e auxiliam também nas propriedades físicas dos filmes como melhoria na barreira ao vapor de água e flexibilidade. Geralmente, esta abordagem é efetiva contra micro-organismos Gram-positivos, contudo em alguns casos como para o óleo essencial de tomilho, pôde ser observada atividade antimicrobiana satisfatória tanto para micro-organismos Gram-positivos como Gram-negativos. Contudo, para aplicação de filmes produzidos a base de quitosana no processo de embalagem de alimentos, a melhoria das propriedades de barreira ao vapor de água a partir do aumento da hidrofobicidade com a manutenção das características antimicrobianas deste composto vêm sendo um desafio, uma vez que o processo de desacetilação nos grupos amina aumentam a solubilidade da quitosana em solventes orgânicos a partir do favorecimento de interações apolares. Contudo, se o efeito antimicrobiano proveniente da quitosana é desejado nos filmes formados, os grupos amina devem estar livres (KALIA; AVÉROUS, 2011).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Óleos essenciais

As amostras de óleos essenciais utilizados no presente estudo foram adquiridas por meio de: doações advindas das empresas Givaudan do Brasil Ltda. (*C. citratus*, *M. piperita*, *P. nigrum*, *R. officinalis*, *E. globulus*) e Lifessence Ltda. (*P. cablin*); e comercialmente advindos da empresa Bioessência (*E. citriodora*, *C. martinii*, *C. nardus*, *V. zizanioides*).

### 5.2 Composição química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais analisados foi obtida por meio de metodologia de Micro-Extração em Fase Sólida em conjunto com Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (HS-SPME / GC-MS). Para a preparação das amostras, os óleos essenciais comerciais foram diluídos (1: 1000 / v: v) em solução aquosa de etanol (1: 1 / v: v) e homogeneizados. A identificação de compostos orgânicos voláteis por HS-SPME / GC-MS foi realizada de acordo com Simas et al. (2017) com modificações. Uma alíquota de 5 µL da solução previamente preparada foi adicionada a um círculo de papel de filtro com 5,0 mm de diâmetro e o papel de filtro foi colocado em um frasco âmbar de 100 mL. O frasco foi selado com auxílio de uma tampa de rosca contendo um septo revestido de Teflon para microextração de headspace de Compostos Orgânicos Voláteis (Volatile Organic Compounds, ou VOCs). Utilizou-se uma fibra de divinilbenzeno / carboxeno / polidimetilsiloxano (DVB / CAR / PDMS) para análise das amostras. As extrações de SPME foram realizadas de acordo com as seguintes condições: tempo de equilíbrio de 10 min; tempo de extração de 20 min e temperatura de extração de 23 °C. A dessorção foi realizada no injetor do GC em modo sem divisão por 1min a 250 °C. As extrações foram realizadas em triplicata para cada amostra. Os VOCs dessorvidos foram separados em um sistema de cromatografia a gás Agilent 7890A (Agilent Technologies) equipado com uma coluna HP-5MS (30m × 0.250mm × 0.25µm) e MSD inerte 5975C com detector de eixo triplo, usando hélio como gás de arraste. Para o programa da rampa de temperatura foram utilizados os parâmetros: 60°C (0 min), 60-240°C a 3°C / min. A temperatura da fonte iônica foi de 230°C e a temperatura da interface foi regulada para 230°C. O MS foi varrido no intervalo de 45-650 a 70eV. O tempo total de corrida foi de 60min. Os compostos foram identificados utilizando a base de dados NIST 14.0 e o Índice de Retenção

Linear (LRI) calculado com uma série de n-alcenos (C7-C40). As quantidades relativas dos componentes foram calculadas com base nas áreas de pico do GC sem fatores de correção.

### 5.3 Cepas utilizadas

As cepas utilizadas para o estudo foram isoladas de contaminação ambiental ou advindas dos insumos e/ou produto final de laticínios produtores de queijo Minas frescal, inseridos no estado de São Paulo, num raio de 200 km de distância da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), onde as análises foram realizadas. Foram utilizadas três cepas de *S. aureus* e *E. coli* provenientes de dois projetos de mestrado realizados no Laboratório de Toxinas Microbianas da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e três cepas de *L. innocua* provenientes de um projeto de iniciação científica realizado anteriormente no Laboratório de Higiene e Laticínios, Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP). Para *Salmonella* spp., foi utilizada uma cepa isolada de leite adquirida do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) Botucatu. As cepas utilizadas neste projeto estão inscritas no SisGen sob o código processual A0C2929.

### 5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para o atual estudo, visamos a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os óleos essenciais de Alecrim, Vetiver, Citronela, Capim-limão, Palmarosa, Eucalipto, Hortelã-pimenta, Pimenta-preta e Patchouli frente às três cepas de bactérias das espécies *S. aureus* e *E. coli* e uma cepa de *Salmonella* spp. isoladas a partir de contaminação ambiental, do produto ou de insumos de laticínios. Para as cepas de *L. innocua*, os valores de CIM para os mesmos óleos essenciais foram determinados durante o projeto de iniciação científica relacionado. Inicialmente, para ativação das cepas a serem utilizadas, foi realizado repique a partir dos tubos contendo cultura sólida em meio de manutenção (Ágar Nutriente) para caldo Brain Heart Infusion - BHI (*S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella*) ou TSB adicionado de 0,6% de Extrato de levedura (*Listeria* spp.). Posteriormente, os tubos foram submetidos à incubação a 37°C/24h para *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella*, e 30°C/24h para *Listeria* spp. Por fim, as cepas

ativadas foram padronizadas com base escala de McFarland e diluídas com auxílio de tubos contendo solução salina 0,85% previamente esterilizada até a carga microbiana de  $10^5$  UFC/ml. Posteriormente, foram distribuídos na primeira coluna de uma placa de 96 poços, 360  $\mu$ l de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) adicionado de 0,5% de Tween 80 mais 40  $\mu$ l do óleo essencial ou solução estoque do antibiótico comercial Oxacilina (Sigma Aldrich, São Paulo - SP), atingindo uma concentração final de 10% de Óleo essencial (OE) no primeiro poço ou 0,5mg/ml de Oxacilina. Nos poços das colunas seguintes, foram distribuídos 200 $\mu$ l de caldo TSB adicionado de 0,5% de Tween 80. Após a homogeneização do conteúdo dos poços da primeira coluna, foi realizada diluição seriada em razão de 2, ao transferir 200  $\mu$ l de mistura do primeiro poço da linha para o segundo e assim sucessivamente. Por fim, foram inoculados 2 $\mu$ l da suspensão microbiana obtida, atingindo carga microbiana final de  $1 \times 10^3$  UFC/ml por poço. Seguiu-se incubação à temperatura de 37°C por 24 h. Após incubação, foram adicionados 50  $\mu$ l de solução de resazurina (Inlab, Diadema – SP) com concentração 0,01% e aguardados cerca de 5 a 10 minutos para ocorrência de reação colorimétrica e avaliação da inibição de crescimento de micro-organismos (PERAZZO, 2012). O poço com menor concentração do composto analisado que permaneceu com coloração azul, ou seja, no qual não ocorreu crescimento microbiano foi considerado o CIM (Concentração Inibitória Mínima).

### **5.5 Análise de Concentração Bactericida Mínima (MBC)**

Para realização da análise de Concentração Bactericida Mínima, foram retirados 10  $\mu$ l do CIM e de 3 poços anteriores, portanto mais concentrados, e depositados por técnica de microgota (ROMEIRO et al., 2013) em placas de ágar nutriente (Oxoid, Hampshire – England). Seguiu-se incubação à temperatura de 37°C/24h. Ao fim da incubação, seções nas quais foi possível observar crescimento indicam atividade bacteriostática do óleo essencial em questão na concentração analisada. Seções nas quais não ocorreu o crescimento microbiano indicam atividade bactericida. O poço com menor concentração na qual ocorreu efeito bactericida é considerado Concentração Bactericida Mínima (CBM) (KNEZEVIC et al., 2016).

### **5.6 Desenvolvimento de biopolímero ativo**

Foram desenvolvidos polímeros ativos contendo os dois óleos essenciais mais efetivos na inibição dos micro-organismos analisados, segundo metodologia descrita por Gomez-Estaca

(2010), com modificações. Inicialmente foram solubilizados 1,5g de gelatina (Gelco gelatinas do Brasil Ltda., Curitiba – PR) em 17,5 ml de água destilada e 0,1g de quitosana de alto peso molecular (Sigma Aldrich, São Paulo – SP) em solução de ácido acético 1,5% (Synth, Diadema – SP). Após homogeneização da mistura de gelatina e quitosana, foram adicionados 0,24g de glicerol (Synth, Diadema – SP) e 0,24g de sorbitol (Fluka Biochemica, Suíça). Posteriormente, a solução foi submetida a aquecimento sob a temperatura de 40 °C com agitação em velocidade média durante 15 minutos para garantir uma boa homogeneização. Foi então adicionado 0,8ml do óleo essencial selecionado (Givaudan, São Paulo – SP) e 0,2g de lecitina de soja (Solae, São Paulo - SP). Por fim, a mistura foi submetida a agitação em Ultraturrax IKA T-25 (IKA® Works, Inc., Wilmington – EUA) na posição 5 por 1 minuto, despejada e dispersa sobre placas de petri de vidro nas dimensões 90 mm x 15mm previamente estéreis e revestidas de filme de PVC estéril para facilitar o desprendimento do biopolímero, e submetida à secagem sob temperatura de 40°C pelo período aproximado de 4 h a 6 h aproximadamente, até obtenção de polímeros de fácil desprendimento e espessura uniforme. Para observação das características microscópicas dos polímeros desenvolvidos, foi utilizado Microscópio Óptico Jenaval SICCT 9961, Carl Zeiss - Germain.

## 5.7 Atividade antimicrobiana dos filmes desenvolvidos

Os filmes desenvolvidos foram cortados em discos de 1cm<sup>2</sup> (1,1cm de diâmetro) e armazenados sob refrigeração até realização de análises posteriores, que foram realizadas dentro do período de 24 h após o fim da secagem. Para determinação da atividade antimicrobiana dos polímeros desenvolvidos, foi realizada análise de disco-difusão, de acordo com metodologia descrita por Gómez-estaca et al. (2010) com modificações, na qual suspensões das culturas analisadas foram inicialmente ativadas através de repique para caldo de cultura favorável para cada micro-organismo: BHI (Acumedia ® Indaiatuba - SP) para *S. aureus*, TSB-YE(BD™, São Paulo - SP) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (BD™, São Paulo - SP) para *L. innocua*, seguido de incubação, padronizadas a partir de comparação de turbidez com solução padrão equivalente a densidade óptica 0,5 na escala de McFarland, correspondente à concentração de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Para este teste, exclusivamente, foi utilizada também uma cepa de *L. monocytogenes* selvagem confirmada por meio de PCR (Polymerase Chain Reaction). O objetivo de sua utilização foi a avaliação do efeito do biopolímero desenvolvido frente ao micro-organismo que causa efetivamente a DTA correspondente, bem como avaliar se houve

similaridade de comportamento entre as duas espécies analisadas, o que possibilitaria a utilização de cepa que apresenta menor risco ao manipulador (*L. innocua*) nos testes seguintes, porém com resultados que representassem ambas as espécies. Posteriormente, as suspensões padronizadas foram inoculadas na superfície, com auxílio de *swabs* estéreis, em placas de petri descartáveis contendo Ágar Mueller Hinton (KASVI, São Paulo – SP) previamente preparado, esterilizado e solidificado. Em sequência, foram depositados sobre a superfície das placas previamente inoculadas, os discos dos filmes desenvolvidos. As placas foram incubadas a 37°C/24h. Após incubação, foi realizada a medição do diâmetro dos halos formados em torno dos discos e foi selecionado o polímero com maior eficiência na inibição dos micro-organismos estudados para prosseguimento das análises.

## **5.8 Estudo da viabilidade da redução de concentração de OE**

Motivado pela possibilidade de redução de custos e de transferência de compostos que conferem cor e sabor, podendo alterar de maneira indesejada as características dos produtos a serem analisados posteriormente, foi realizado estudo da viabilidade da redução da concentração de óleo essencial utilizado na formulação do biopolímero ativo desenvolvido previamente. Com este objetivo, foram produzidas cinco formulações de polímeros adicionados do óleo essencial mais efetivo na inibição dos micro-organismos estudados nas proporções de 23% p/p em relação ao peso de sólidos da FFS (concentração original na formulação padrão-F1), 15% (F2), 10% (F3), 5% (F4) e uma formulação sem adição de óleo essencial como tratamento controle (F5). Posteriormente, os polímeros produzidos foram também cortados em discos de 1 cm<sup>2</sup> e prosseguiu-se para análise da determinação da atividade antimicrobiana das formulações desenvolvidas por meio de metodologia de disco-difusão descrita por Gómez-estaca et al. (2010), com alterações, conforme já descrito anteriormente. Os halos formados foram então medidos com régua milimétrica e submetidos à análise estatística para determinação de existência de diferença significativa ou não entre os tratamentos desenvolvidos.

## 5.9 Microbiologia Preditiva

### 5.9.1 Formulação queijo minas frescal

A formulação e produção dos queijos Minas frescais foi realizada conforme fluxograma abaixo, baseado nos procedimentos descritos por Pingitore et al. (2012), com modificações. Inicialmente, foi realizada a pasteurização do leite por meio do método HTST à temperatura de 72-78°C/15-20 segundos (JORDAN; HUNT; HOORFAR, 2012; LI et al, 2018). Posteriormente, a temperatura foi baixada para 35 °C e foram adicionados ao leite pasteurizado 2,5 ml de solução de cloreto de cálcio 10% (p/v) por litro de leite e coalho conforme instrução do fabricante (0,8 ml dissolvido previamente em 20 ml de água destilada), os quais foram homogeneizados e posteriormente deixados em repouso durante aproximadamente 30 minutos para formação do coágulo. Posteriormente, o coágulo foi cortado em cubos de cerca de 3 cm de aresta com o auxílio de espátulas metálicas e submetido a agitação alternada para auxiliar no processo de expulsão do soro e melhoria da firmeza aos grãos, à temperatura de 30°C/30min. Por fim, foi realizada a dessoragem, que consiste na separação do soro da massa, que foi salgada com 2% (p/p) de NaCl na própria massa e por fim processada de acordo com o tratamento (adicionada de inóculo ou não), prensada, embalada (controle ou teste do filme ativo) e armazenada sob refrigeração para realização de análises posteriores conforme mostrado na Figura 1.

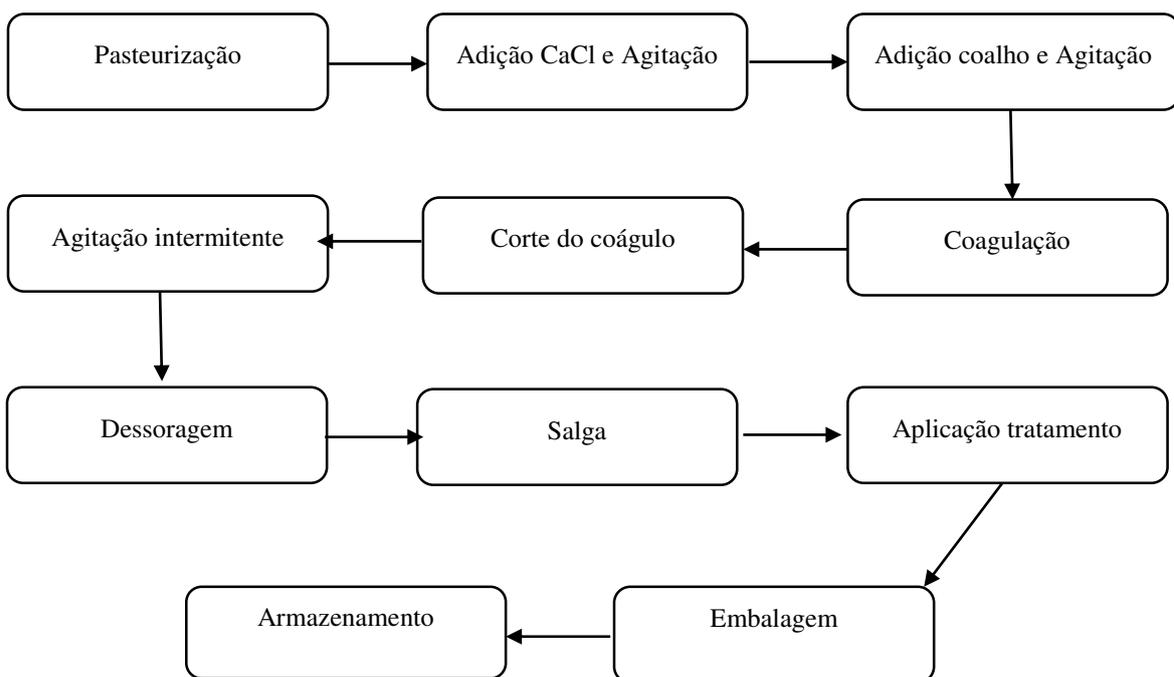


Figura 1: Fluxograma do processo produtivo de queijo Minas frescal. Fonte: Arquivo pessoal.

### 5.9.2 Cepas e preparo de inóculo

Para o preparo das suspensões microbianas que foram inoculadas nos queijos formulados, foi aplicada metodologia proposta por Sant'Ana, Franco e Schaffner (2012), com alterações. Uma alçada da cepa desejada foi transferida para tubo contendo 9 ml de caldo BHI (*S. aureus*) ou TSA-YE adicionado de 0,6% de extrato de levedura (*L. innocua*) e submetida a incubação à temperatura de 37°C/24h. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e, posteriormente, o conteúdo dos tubos após incubação foi submetido a centrifugação a 15.000 RPM, à temperatura máxima de 4°C por 10 minutos. Os pellets obtidos foram então lavados com 9 ml de água peptonada 0,1% estéril e submetidos a centrifugação novamente. Este procedimento foi repetido por duas vezes, seguido de re-suspensão das células em 9 ml de água peptonada 0,1%. A suspensão obtida foi então padronizada com auxílio de solução padrão na escala McFarland correspondente à densidade óptica 0,5, equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em tubos contendo água peptonada 0,1% previamente esterilizada até a obtenção de suspensão de concentração de  $1 \times 10^5$  UFC/ml. A partir da suspensão obtida, foram inoculados individualmente, com objetivo de melhorar a distribuição e reduzir a variabilidade, 150 µL de suspensão em 15g de queijo minas frescal formulado, obtendo assim concentração final de  $1 \times 10^3$  UFC/g de alimento. A massa, então inoculada logo após a dessoragem, portando durante o processamento, foi então submetida ao processo de mistura com auxílio de um bastão de vidro para prevenir a formação de clusters e promover a homogeneidade na distribuição de células microbianas por toda a matriz alimentar, prensada e embalada em filme de PVC estéril ou PVC estéril em conjunto com o filme ativo desenvolvido e armazenadas na temperatura de 7 °C pelo período de até 30 dias para *L. innocua* e até 25 dias para *S. aureus*, a depender das características indicativas do comportamento observado para cada um dos tratamentos aplicados (população microbiana e fase na curva de crescimento). Para esterilização do filme de PVC foram utilizados, em fluxo laminar previamente esterilizado, a aplicação de solução aquosa de álcool na concentração de 70% em conjunto com posterior exposição à luz UV durante o período de 15 min.

### 5.9.3 Distribuição de pontos

A coleta de pontos foi esquematizada com base em modelo preditivo produzido com auxílio do programa Combase predictor, disponibilizado pelo United States Department of Agriculture

(USDA) (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2017). Para tanto, foram aplicados ao modelo as características de Atividade de água, pH, teor de NaCl e temperatura correspondentes às encontradas em queijos Minas frescais e às condições de estocagem utilizadas. Um total de 15 pontos foram distribuídos entre as fases lag, log e estacionária dos micro-organismos em questão.

#### **5.9.4 Determinação da população microbiana**

Para realização das contagens, 10g de queijo minas frescal foram pesados, homogeneizados e diluídos em 90 ml de água peptonada 0,1% estéril. Seguiu-se agitação por aproximadamente 5 min com objetivo de melhor homogeneização dos grânulos. Foram realizadas então diluições seriadas de até  $10^{-6}$  em tubos contendo 9 ml de água peptonada 0,1% e posteriormente foram inoculados em placas de meio específico para cada micro-organismo analisado – Baird Parker Ágar (Acumedia®, Indaiatuba - SP) para *S. aureus* e Palcam Ágar (Acumedia®, Indaiatuba - SP) adicionado de suplemento seletivo conforme instruções do fabricante (Merck®, São Paulo – SP) para *L. innocua* - 0,1 ml de suspensão por método de superfície conforme metodologia proposta por Al-holy et al. (2006), com modificações. Posteriormente, a alíquota foi distribuída pela superfície da placa com auxílio de alça de Drigalsky estéril e submetida a incubação a 37°C/48-72h para *S. aureus* e 30°C/24-48h para *L. innocua*. Por fim, foram realizadas contagens e os resultados expressos em UFC/g. Este procedimento foi realizado em duplicata.

#### **5.9.5 Análise dos dados**

Para análise dos dados, foi utilizado o software DMfit versão 1.0, com objetivo de realizar os ajustes necessários ao desenvolvimento do modelo matemático descritivo do comportamento dos micro-organismos analisados.

#### **5.10 Análise da vida de prateleira**

Realizado conforme metodologia proposta por Sangaletti et. al. (2009), a partir de análises microbiológicas nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 após a fabricação dos queijos Minas tipo

frescal, para contagem de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos e bactérias lácticas, além dos micro-organismos inicialmente analisados que se apresentaram susceptíveis ao biopolímero desenvolvido (*S. aureus* e *Listeria* spp.). As análises foram realizadas em queijos acondicionados nas embalagens ativas desenvolvidas em conjunto com uma amostra acondicionada em filme de PVC estéril para comparativo com tratamento controle.

### **5.11 Análises estatísticas**

Foram realizadas com auxílio de programa Sisvar 5.6 para análise de ANOVA de dois fatores e teste tukey com 0,05% de significância para determinação de similaridade ou diferença significativa entre os resultados obtidos quando aplicado para comparação de múltiplos tratamentos. Para determinação simples de existência de diferença significativa ou não entre apenas dois tratamentos foi utilizado o teste T.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Composição Química dos Óleos Essenciais

Os resultados da análise dos óleos essenciais por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (HS-SPME / GC-MS), relativo à identificação e quantificação dos compostos majoritários de cada amostra estão expressos na Tabela 1, em porcentagem. As quantidades relativas dos componentes foram calculadas com base nas áreas de pico do GC sem fatores de correção e as médias e os desvios padrões foram calculados com base nas triplicatas realizadas.

**Tabela 1: Composição química e porcentagem de compostos majoritários dos óleos essenciais analisados. Continua.**

Óleo essencial Espécie	Composto	Quantidade relativa (%) (Média±DP)
<i>Cymbopogon citratus</i>	$\alpha$ -Citral	41,8±1,4
	$\beta$ -Citral	27,3±0,7
	(S)-cis-Verbenol	7,5±0,3
	cis-Verbenol	3,6±0,2
	Acetato de terpinil	3,4±0,4
<i>Mentha piperita</i>	Levomentol	33,9±3,3
	I-Mentona	33,6±3,4
	P-Mentona	21,3±0,3
	Acetato de isomentol	3,3±0,3
<i>Piper nigrum</i>	Isopulegol	1,8±0,8
	Cariofileno	39,8±12,7
	D-Limoneno	15,1±7,8
	$\alpha$ -Copaeno	4,7±1,6
	3-Careno	4,6±2,7
<i>Rosmarinus officinalis</i>	$\beta$ -Eudesmene	4,5±1,4
	Eucaliptol	51,0±1,7
	(+)-2-Bornanona	23,4±2,4
	Cariofileno	6,3±0,7
	Endo-Borneol	4,9±1,4
<i>Eucalyptus globulus</i>	L-Acetato de Bornila	3,0±0,6
	Eucaliptol	92,0±4,3
	$\gamma$ -Terpineno	2,6±0,9

**Tabela 1: Composição química e porcentagem (%) de compostos majoritários dos óleos essenciais analisados. Continuação.**

<i>Eucalyptus citriodora</i>	Citronelal	62,0±2,0
	Isopulegol	17,0±0,5
	Citronelol	4,0±1,7
	Eucaliptol	3,3±0,9
<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronelal	55,8±2,7
	Isopulegol	9,2±3,6
	β-Elemene	5,1±1,4
	D-Limoneno	3,5±1,4
<i>Cymbopogon martinii</i>	Citronelol	3,4±0,5
	Geraniol	30,9±5,8
	Acetato de geranil	18,9±0,9
	β-Linalool	12,1±1,9
	β-Mirceno	10,0±1,9
	Cariofileno	7,9±0,6
	α-Citral	3,1±0,1
<i>Chrysopogon zizanioides</i>	β-Citral	0,9±0,07
	12-Oxatetraciclo[4.3.1.1(2,5).1(4,10)]dodecano,11-isopropilideno	6,0±0,6
	(+/-)-Cadineno	6,5±0,8
	Tujopseno-I3	5,8±0,6
	Triciclo[6.3.0.0(1,5)]undec-2-an-ona, 5,9-dimetil	5,0±1,1
<i>Pogostemon cablin</i>	Valencene	4,5±0,5
	α-Guaieno	38,5±0,5
	α-Bulneseno	20,0±3,0
	α-Patchouleno	11,0±1,5
	β-Patchouleno	7,5±1,4
	γ-Patchouleno	5,5±0,2

Com base nos dados obtidos (Tabela 1), é possível afirmar que, para a espécie *C. citratus* os resultados apontam para teores similares dos compostos majoritários geranial (41,8±1,4%) e neral (27,3±0,7%), quando comparados aos teores encontrados na bibliografia utilizada na fundamentação do presente estudo, que consistem em: 48,1% de geranial e 34,6% de neral (BASSOLÉ et al., 2011).

Já para a espécie *C. martinii*, embora os compostos majoritários sejam compatíveis com aqueles observados em estudos anteriores (TSAI et al., 2011; ANDRADE et al., 2013; HERMAN; TAMBOR; HERMAN, 2015) foi detectada uma elevada variabilidade entre os teores de compostos identificados: para geraniol, foram observados teores entre 52,49 e 57,49% anteriormente, enquanto as análises atuais apresentaram 30,9±5,8%. Para o acetato de geranil,

foi constatada maior similaridade na porcentagem de compostos: 12,01-13,56% observado anteriormente enquanto  $18,9 \pm 0,9\%$  no presente estudo. Já para o composto linalool, foi detectado um percentual cerca de 10 vezes acima do obtido em estudos anteriores, com 1,15-1,71% observado anteriormente, e  $12,1 \pm 1,9\%$  para o mesmo composto no atual estudo. Vale ressaltar que o Linalool se trata de um composto com reconhecida atividade antimicrobiana, sendo utilizado inclusive em sinergismos com outros óleos essenciais e mesmo com antibióticos para potencialização dos efeitos antimicrobianos dos mesmos (TSAI et al., 2011; ANDRADE et al., 2013; HERMAN; TAMBOR; HERMAN, 2015). A variação nos valores de CIM entre estudos diferentes se deve a uma infinidade de condições que alteram, por exemplo, a composição dos óleos essenciais analisados, como cultivo, condições meteorológicas, método de extração do óleo essencial entre outras.

Para o óleo essencial de *Piper nigrum*, ou pimenta-preta, foi observado no presente estudo a detecção de teores de cariofileno quase quatro vezes superiores quando comparado aos valores obtidos em estudo anterior utilizado como embasamento teórico para realização do mesmo, bem como um teor cerca de 30% inferior para o composto limoneno (ANDRADE et al., 2013). O cariofileno é amplamente conhecido como um composto com atividade antimicrobiana em decorrência de sua atividade antioxidante, com CIM isolado de cerca de  $3 \mu\text{M}$  quando analisado frente a *S. aureus*, além de possuir atividade comprovada contra células advindas de câncer colorretal em humanos, tornando este composto um promissor quimioterápico (DAHAM et al., 2015). Contudo, apesar de este composto ter sido detectado em teores bastante significativos na amostra de óleo essencial analisada, o mesmo não obteve atividade antimicrobiana satisfatória quando aplicado frente aos micro-organismos e cepas utilizadas.

## 6.2 Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais

A análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM) determina a menor concentração de agente antimicrobiano necessária para inibição do crescimento dos micro-organismos analisados. Para melhoria na determinação do CIM, reagentes corantes têm sido utilizados, com o objetivo de facilitar a leitura dos testes de microdiluição e discernir quanto ao crescimento nos poços. O reagente Alamar Blue, cujo princípio ativo é a resazurina, é um efetivo indicador de crescimento, podendo ser utilizado para esta finalidade (CLSI, 2012; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Os resultados da análise de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

analisados estão expressos conforme observado na Tabela 2, descritos em mg/mL. Os resultados para *L. innocua* são provenientes de um projeto de iniciação científica realizado em conjunto com este estudo no Laboratório de Higiene e Laticínios, Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP).

**Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima em mg/mL de óleos essenciais contra patógenos isolados da cadeia produtiva de laticínios.**

	<i>S.s aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>L. innocua</i>
<i>C. citratus</i>	1,13±1,25 <sup>a</sup>	1,23±0,30 <sup>a</sup>	3,23±2,11 <sup>a</sup>	0,70±0,39 <sup>a</sup>
<i>M. piperita</i>	1,94±0,84 <sup>a</sup>	3,42±1,73 <sup>a</sup>	1,86±0,80 <sup>a</sup>	1,87±0,82 <sup>a</sup>
<i>P. nigrum</i>	35,81±39,11 <sup>c</sup>	60,69±32,36 <sup>b</sup>	21,85±0 <sup>b</sup>	28,59±34,43 <sup>b</sup>
<i>R. officinalis</i>	3,86±3,34 <sup>ab</sup>	8,16±2,97 <sup>a</sup>	4,70±1,63 <sup>a</sup>	5,70±4,86 <sup>a</sup>
<i>E. globulus</i>	3,11±2,55 <sup>ab</sup>	8,20±2,99 <sup>a</sup>	5,68±0 <sup>a</sup>	-
<i>E. citriodora</i>	3,96±3,53 <sup>ab</sup>	67,89±29,77 <sup>b</sup>	18,18±6,29 <sup>b</sup>	2,95±1,97 <sup>a</sup>
<i>C. nardus</i>	1,61±1,76 <sup>a</sup>	39,18±36,54 <sup>b</sup>	3,61±1,56 <sup>a</sup>	1,04±0,34 <sup>a</sup>
<i>C. martinii</i>	1,15±0,94 <sup>a</sup>	1,36±2,35x10 <sup>-16 a</sup>	0,51±0,29 <sup>a</sup>	0,82±0,73 <sup>a</sup>
<i>V. zizanioides</i>	26,27±29,71 <sup>bc</sup>	38,45±11,53 <sup>b</sup>	19,22±6,66 <sup>b</sup>	6,02±4,91 <sup>a</sup>
<i>P. cablin</i>	>94±0 <sup>d</sup>	>94±0 <sup>c</sup>	>94±0 <sup>c</sup>	2,97±2,02 <sup>a</sup>

**Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa por meio de teste Tukey com 0,05% de significância entre linhas ou tratamentos (óleos essenciais) aplicados.**

Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que os óleos essenciais mais efetivos na inibição de *S. aureus* foram os provenientes das espécies *C. citratus* (Capim-limão), com CIM de 1,13±1,25mg/ml e *C. martinii* (Palma rosa), com CIM de 1,16±0,95mg/ml. Para *E. coli*, os mais eficientes foram os provenientes das espécies *C. citratus* (Capim-limão), com CIM de 1,23±0,30mg/ml, e *C. martinii* (Palma rosa), com CIM de 1,36±0mg/ml. Para *Salmonella spp.*, os mais efetivos foram *C. martinii* (Palma rosa) e *M. piperita* (Hortelã pimenta) com CIM 0,51±0,29mg/ml e 1,86±0,81mg/ml, respectivamente. Já para *L. innocua*, os óleos essenciais mais efetivos em sua inibição foram os provenientes das espécies *C. citratus* (Capim-limão) e *C. martinii* (Palma rosa), com CIM de 0,70±0,39 mg/ml e 0,82±0,73mg/ml, respectivamente. Portanto, foram selecionados os óleos de *C. citratus* e *C. martinii* para prosseguimento do estudo. Os resultados obtidos demonstraram valores inferiores aos encontrados em estudos anteriores para Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *C. citratus*, indicando uma melhor atividade antimicrobiana das amostras analisadas (BASSOLÉ et al., 2011; ANDRADE et al., 2013). Sabe-se também que muitos dos óleos

essenciais que contém este composto apresentam atividade antimicrobiana (CHOI et al., 2010), contudo seu mecanismo de ação neste tipo de atividade, bem como resultados que comprovem sua atividade antimicrobiana isolada permanecem sem elucidação. Neste sentido, indica-se a possibilidade de confirmação da teoria na qual é abordada a relação entre os compostos majoritários e minoritários dos óleos essenciais, nos quais estes compostos minoritários atuariam como reguladores e coadjuvantes na ação antimicrobiana, geralmente atribuída aos compostos majoritários, possibilitando sua potencialização e observação de atividade mais eficaz quando ocorre a análise dos óleos essenciais na íntegra em vez de compostos isolados (YAP et al., 2014).

Em adição, a aplicação de compostos majoritários de comprovada atividade antimicrobiana em conjunto com óleos essenciais na íntegra, ou mesmo em conjunto com antimicrobianos convencionais como antibióticos vêm se mostrando uma alternativa no combate a micro-organismos multirresistentes. Este fenômeno se deve à aplicação de uma abordagem que permite o ataque a sítios múltiplos nas células microbianas através da combinação de compostos diversos, com mecanismos de ação diversos atuando em sinergismo, o que acaba por potencializar os efeitos observados isoladamente e permitem a observação de atividade antimicrobiana mais eficaz, maior dificuldade de desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos micro-organismos, além de outros efeitos, como por exemplo a incapacidade de formação de biofilmes (RADULOVIC et al., 2013; HERMAN; TAMBOR; HERMAN, 2015).

Já para o óleo essencial de *C. martinii*, foram encontrados CIM similares para o micro-organismo *E. coli* (CIM 1,54 – 2,09mg/ml observados nos estudos anteriores) e  $1,36 \pm 2,35 \times 10^{-16}$  observado no presente estudo. Já para *S. aureus*, foi observado CIM superior ( $1,15 \pm 0,94$  mg/ml), portanto consiste um indicativo de menor atividade antimicrobiana quando comparado aos valores observados em estudos anteriores (CIM 0,1-1,04mg/ml) (OUSSALAH et al., 2007; TSAI et al., 2011; ANDRADE et al., 2013), contudo ainda mostrou-se um composto dotado de atividade antimicrobiana satisfatória. Quando analisado frente a *Salmonella* spp., o óleo essencial em questão mostrou-se um eficiente agente antimicrobiano ( $0,51 \pm 0,29$ mg/ml), embora também tenham sido observados no presente estudo valores acima daqueles observados em estudo anterior, indicativo de atividade antimicrobiana aquém da relatada anteriormente (OUSSALAH et al., 2007). Inclusive, o estudo anteriormente realizado reportou a presença de geraniol como composto majoritário quase exclusivo no óleo essencial analisado na ocasião (80%). Os dados observados suportam a hipótese de que o simples aumento no teor de um

composto minoritário isolado como o linalool não garante uma atividade antimicrobiana superior, sendo provável o fato de que a atividade antimicrobiana observada no óleo essencial em questão está mais intimamente relacionada com os teores de geraniol observados em sua composição, uma vez que quanto maior o teor do composto em questão, menores os valores de CIM, indicativos de uma atividade antimicrobiana superior.

Para o óleo essencial de *Piper nigrum*, apesar de ter sido detectada a presença de compostos com atividade antimicrobiana comprovada como cariofileno, a atividade antimicrobiana observada não foi satisfatória, nem similar a atividade observada anteriormente (ANDRADE et al., 2013; ZACARÃO, PILLETI, 2013).

Para o óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides*, foi observado uma composição extremamente vasta na variedade de compostos, com 42 identificados no total. Estima-se que, em decorrência da elevada variedade e reduzido teor de cada composto, mesmo com a presença de compostos com atividade antimicrobiana comprovada, seria observada uma reduzida atividade em decorrência de sua baixa concentração, fato este que foi confirmado pelos testes de Concentração Inibitória Mínima realizados, uma vez que não foi observada atividade antimicrobiana satisfatória para o óleo essencial em questão.

Em estudo realizado anteriormente por Yang et al. (2013), foi observado que a atividade antimicrobiana do patchoulol é superior à atividade antimicrobiana do óleo essencial de patchouli na íntegra, indicativo de que este composto seja um dos principais compostos com esta atividade para o óleo em questão. Portanto, para *P. cablin*, a ausência de atividade antimicrobiana frente a 75% dos micro-organismos analisados, resultados que diferiram significativamente dos resultados anteriormente observados em estudo conduzido por Hussain et al. (2011), pode possuir correlação com o fato de que o principal constituinte do óleo essencial em questão, o patchoulol, não foi detectado na composição da amostra utilizada para realização deste estudo, o que pode justificar a atividade antimicrobiana inexistente frente à maioria dos micro-organismos analisados (HUSSAIN et al., 2011).

Em alguns resultados é possível observar um desvio padrão elevado, que se deve principalmente pela heterogeneidade de comportamento entre cepas selvagens, mesmo quando isoladas de locais similares, bem como por questão analítica, uma vez que a metodologia de Concentração Inibitória Mínima por microdiluição em placa de 96 poços prevê a diluição em razão de dois entre um poço e o seguinte, gerando maior variabilidade principalmente entre os poços correspondentes às maiores concentrações aplicadas.

Para as análises de Concentração Bactericida Mínima, os resultados obtidos demonstram que os óleos essenciais mais efetivos na inibição de *S. aureus* são aqueles provenientes das espécies *C. citratus*, com CBM variando entre 0,693 a 22,2 mg/ml e *C. martinii*, com CBM variando entre 2,73 e 5,46 mg/ml. Para *E. coli*, o óleo essencial proveniente de *C. martinii* se mostrou mais efetivo, com CBM variando entre 1,36 e 10,92 mg/ml. Para *Salmonella* spp., o óleo essencial mais efetivo foi o proveniente da espécie *C. citratus*, com CBM variando entre 1,39 e 5,55 mg/ml. Por fim, para cepas de *L. innocua*, os óleos essenciais mais efetivos quanto à sua atividade bactericida foram os provenientes das espécies *C. citratus*, com valores de CBM entre 1,39 e 5,56 mg/ml e *C. martinii*, com valores de CBM variando entre 1,36 e 2,72 mg/ml.

### 6.3. Formulação do filme ativo

Após a secagem, pôde-se observar que foram obtidos filmes de aproximadamente 1 mm de espessura, translúcidos, flexíveis, porém pouco elásticos, de coloração variante de amarelo a branco conforme o óleo essencial utilizado em sua produção, com aspecto esponjoso e forte aroma do óleo essencial utilizado conforme ilustra a Figura 2.



Figura 2: Biopolímero desenvolvido adicionado do OE de *C. citratus*.

### 6.3 Atividade Antimicrobiana do Filme ativo

Os resultados para a análise de atividade antimicrobiana do filme ativo desenvolvido, referente aos halos formados nas placas estão expressos na Tabela 3 abaixo em milímetros. Para

os micro-organismos *Salmonella* spp. e *E. coli* não foram observados halos de inibição, indicando atividade antimicrobiana fraca ou inexistente por parte dos filmes desenvolvidos. Este acontecimento pode ser justificado pelo fato de que, nas bactérias Gram-negativas como, por exemplo, *E. coli* e *Salmonella* spp., sua membrana externa é dotada de uma camada de lipopolisacarídeos, e esta conformação confere uma penetração mais lenta de antimicrobianos, de maneira geral. A penetração destes compostos pode se dar por três formas diferentes: difusão pelas porinas, difusão na bicamada fosfolipídica ou self promoted uptake. Quando a penetração ocorre por meio das porinas, canais hidrofílicos são formados, facilitando a penetração de antimicrobianos hidrofílicos (BAPTISTA, 2013), ou, como é o caso deste estudo, de óleos essenciais quando emulsionados em solução aquosa, o que justifica a observação de baixos valores de Concentração Inibitória Mínima para estes micro-organismos, contudo sem inibição dos mesmos quando testados frente ao filme formulado.

**Tabela 3: Halos formados em milímetros (mm).**

Micro-organismo	Óleo essencial	MÉDIA	Desvio Padrão
<i>S. aureus</i>	<i>C. citratus</i>	33,33	4,93
	<i>C. martinii</i>	20,00	1,00
<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. citratus</i>	39,33	5,03
	<i>C. martinii</i>	20,67	1,53
<i>L. innocua</i>	<i>C. citratus</i>	37,67	5,51
	<i>C. martinii</i>	20,67	1,15

As médias gerais dos dois tratamentos foram submetidas à análise estatística por meio da utilização do software Sisvar versão 5.6, com aplicação dos testes de anova de dois fatores e teste T a 0,05% de significância. Os resultados estão expressos na Tabela 3 e Tabela 4.

**Tabela 4: Análise estatística comparativa entre os tratamentos aplicados. Valores expressos em mm.**

Tratamentos	Média/ Desvio padrão	Teste t 0,05%
<i>Cymbopogon citratus</i>	36,77±5,21	B
<i>Cymbopogon martinii</i>	20,44±1,13	A

**Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante por meio de teste T com 0,05% de significância.**

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que, estatisticamente, houve maior efetividade por parte do biopolímero adicionado de óleo essencial de *C. citratus* quando comparado a *C. martinii*, uma vez que os halos formados são significativamente maiores tanto quando aplicado frente a *S. aureus* quanto para as duas espécies de *Listeria* spp. Em adição, foi

aplicado teste estatístico (teste T) para verificação de similaridade ou diferença significativa dos resultados obtidos entre as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*, para ambos os óleos essenciais aplicados. Desta maneira, não foi detectada diferença significativa entre os resultados observados para as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua* para um mesmo tratamento ou óleo essencial, indicativo de atividade antimicrobiana similar do biopolímero desenvolvido frente à ambas as espécies. Baseado nesta similaridade, e visando uma maior segurança do manipulador para as etapas posteriores deste estudo, foi possível a escolha de utilização de cepas de *L. innocua* para prosseguimento com os experimentos, com o indicativo de que serão observados comportamentos similares para ambas as espécies.

#### 6.4 Estudo da viabilidade da redução de concentração de óleo essencial

Para os testes que compuseram o estudo da viabilidade de redução da concentração de óleo essencial nos polímeros desenvolvidos, foram observados os resultados listados na Tabela 5. As medições dos halos foram realizadas em milímetros e os resultados expressos por meio de Média  $\pm$  Desvio Padrão. Para análise estatística, foram aplicados os testes de Anova de dois fatores em conjunto com Teste Tuckey com nível de 0,05% de significância e letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos ou colunas.

**Tabela 5: Atividade antimicrobiana de filmes ativos reduzidos em teor de OE. Halos de inibição medidos em mm.**

Micro-organismo	23%	15%	10%	5%	Controle
<i>S. aureus</i>	31,0 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
<i>L. innocua</i>	34,3 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	23,7 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	37,7 $\pm$ 5,5 <sup>a</sup>	20,0 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>

**Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante por meio de teste de Tuckey com 0,05 % de significância entre colunas ou tratamentos.**

Baseado nos resultados observados, foi possível constatar que houve diferença significativa entre os tratamentos F1 e F2, com melhor desempenho para o tratamento F1, contendo 23% p/p de óleo essencial proveniente da espécie *C. citratus* na formulação do filme ativo. Esta reação foi observado para todas as espécies de micro-organismos testadas frente ao biopolímero desenvolvido. Contudo, não houveram diferenças significativas entre os tratamentos F5 (controle), F4 (5% OE p/p) e F3 (10% OE p/p), nos quais não ocorreu a formação de halo em torno dos discos aplicados, indicando baixa ou inexistente atividade antimicrobiana dos filmes desenvolvidos sob as condições analisadas. Uma das hipóteses levantadas para

justificar a observação dos dados obtidos é de que, por se tratar da aplicação de um antimicrobiano natural e proveniente de uma variedade de compostos majoritários que podem possuir atividade antimicrobiana ou não individualmente, aliados a elevada concentração da suspensão microbiana aplicada na superfície das placas, podem ter levado a uma expressão fenotípica da atividade antimicrobiana aquém daquela que seria observada no caso de um sistema contendo o alimento inoculado com uma concentração de micro-organismos inferior. Em resposta a esta observação, foram efetuados mais testes visando a redução da concentração das suspensões dos micro-organismos analisados (UFC/ml) a partir de realização de diluições seriadas da suspensão padronizada com auxílio de tubos contendo 9 ml de água peptonada 0,1% estéril anteriormente à inoculação com auxílio de *swab* estéril. Contudo, nos resultados obtidos foi observado crescimento de colônias isoladas em vez de crescimento uniforme e característico necessário a aplicação da metodologia, ocasionando regiões dotadas de falhas e impossibilitando a leitura precisa dos halos formados. Em adição, foi observado que, baseado nos resultados obtidos e para a abordagem utilizada, apesar de a quitosana ser utilizada como antimicrobiano natural, quando aplicada aos filmes desenvolvidos e mesmo nas maiores concentrações (nos tratamentos em que houve a simples redução dos teores de óleos essenciais e conseqüente aumento da concentração dos demais componentes), não foi observada atividade antimicrobiana por meio da metodologia e condições aplicadas à realização dos testes. Uma das abordagens que justificaria a observação dos resultados obtidos consiste na interação entre os grupos amina presentes nas moléculas da quitosana utilizada na formulação dos filmes e a porção apolar das moléculas da lecitina de soja, aplicadas como emulsificantes e estabilizantes nas emulsões das FFS (KALIA; AVÉROUS, 2011). De maneira a elucidar as interações entre os compostos mencionados, bem como o efeito do peso molecular da quitosana utilizada na atividade antimicrobiana frente aos patógenos em questão, sugere-se para próximos estudos a análise de atividade antimicrobiana de solução de quitosana e desenvolvimento de filme ativo similar à formulação controle, contudo com quitosanas de pesos moleculares diversos, adicionada de lecitina de soja ou não, afim de avaliar a influência deste componente na ação antimicrobiana das moléculas de quitosana da formulação.

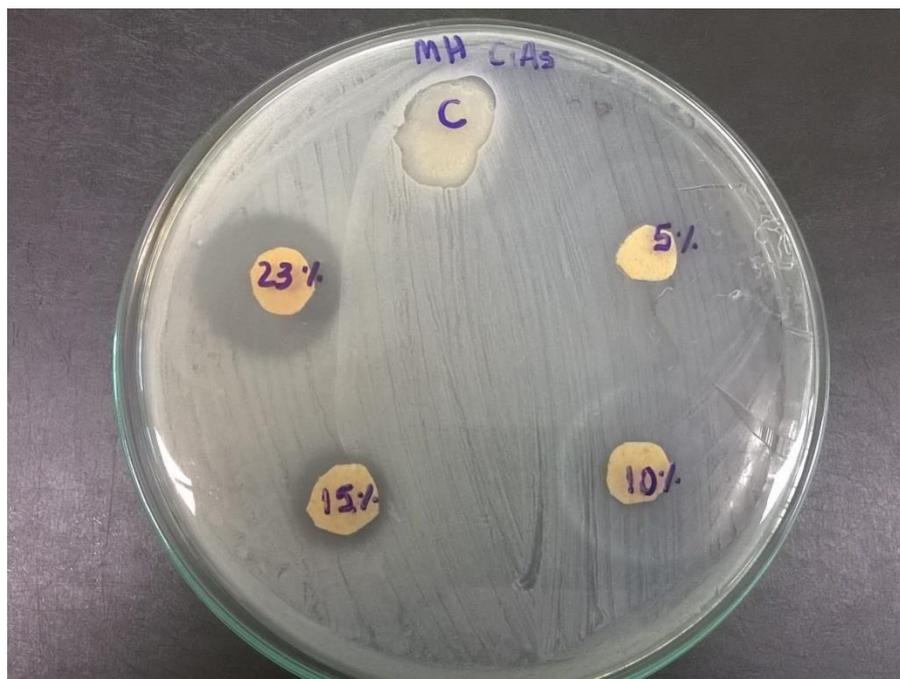


Figura 3: Atividade antimicrobiana dos filmes desenvolvidos frente à *S. aureus*.

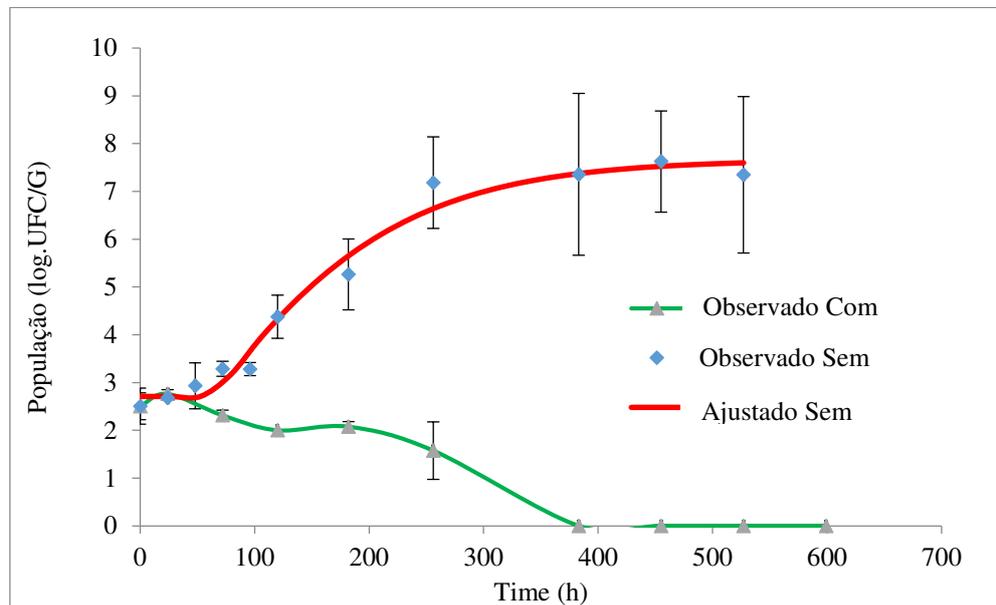
Tendo em vista a redução consistente na atividade antimicrobiana entre os filmes produzidos F1(23%) e F2 (15%), que pode ser constatada pela redução visível dos halos de inibição observados na Figura 3, e, visando uma maior taxa de sucesso nos experimentos seguintes, foi selecionado o filme produzido no tratamento F1 (23%) para prosseguimento com as análises posteriores. Esta decisão se deu uma vez que, embora a concentração de micro-organismos nos estudos seguintes seja inferior à utilizada neste teste, não haviam precedentes e consequentemente previsões quanto à correlação entre a interação dos micro-organismos com a matriz alimentar a ser estudada em conjunto com a liberação e migração gradativa do óleo essencial e seus compostos majoritários dos polímeros desenvolvidos para as amostras analisadas de queijo Minas frescal.

## 6.5 Microbiologia Preditiva

### 6.5.1 *Staphylococcus aureus*

Na Figura 4, apresentada abaixo, estão expressos os resultados para as análises realizadas com base na formulação de modelos primários de Microbiologia preditiva para representação gráfica do comportamento do micro-organismo *S. aureus* mediante as condições

de estocagem de queijo Minas frescal nos tratamentos Controle e acondicionado no biopolímero desenvolvido adicionado de óleo essencial de *C. citratus* (Capim-limão).



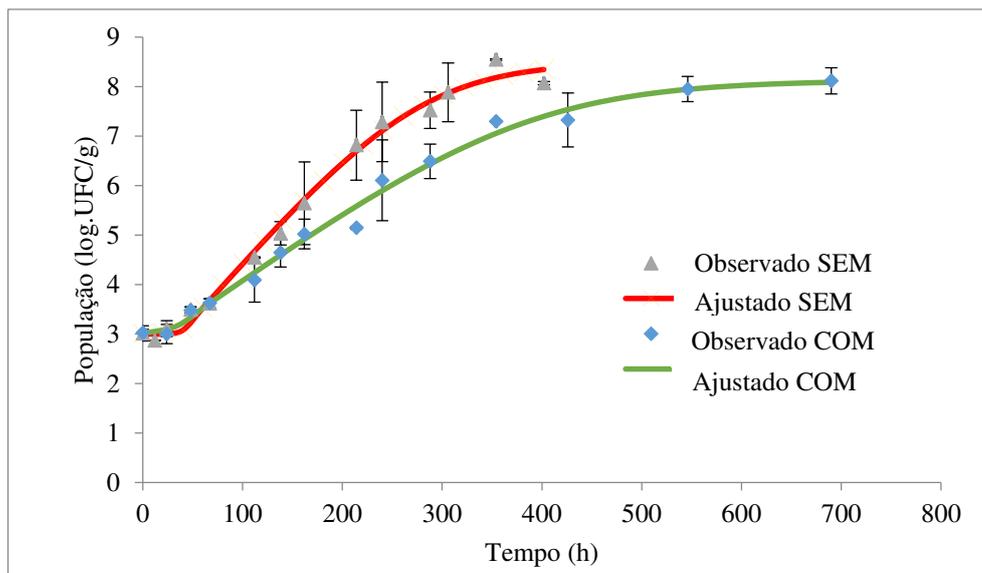
**Figura 4: Representação gráfica do comportamento de *S. aureus* em queijo Minas frescal: Tratamento Padrão (●); Com Biopolímero(▲).**

Baseado nas representações gráficas proporcionadas pela metodologia em questão e sem outras ferramentas à princípio, é possível observar e confirmar a atividade antimicrobiana do biopolímero desenvolvido frente a *S. aureus*, uma vez que, após cerca de 250 h (entre 10 e 11 dias aproximadamente) ocorreu a injúria do micro-organismo em questão a ponto de o mesmo se encontrar inativo ou abaixo dos limites de detecção para a metodologia utilizada como ilustra a Figura 4. Os resultados observados para o presente estudo indicaram uma efetividade superior dos filmes desenvolvidos quando comparados a biopolímeros similares, porém desenvolvidos com uma variedade de outros óleos essenciais (EMIROĞLU et al., 2010). Dentre os mecanismos que podem estar relacionados com a elevada efetividade do polímero desenvolvido e analisado frente a *S. aureus*, consta principalmente a característica intrínseca do tipo de quitosana utilizada na produção dos biopolímeros em questão. Isto se deve ao fenômeno de que, quando utilizada uma variedade de quitosana com elevado peso molecular na produção de biopolímeros como uma forma de auxiliar na formação da rede polimérica por meio de aumento da viscosidade da FFS, gotículas de óleo essencial de maiores proporções são contidas na rede formada, levando a uma liberação mais rápida do óleo essencial para a superfície do produto quando comparados a biopolímeros produzidos com base em quitosana de baixo peso molecular

(FERNÁNDEZ-PAN et al., 2015). Em adição, a variação considerável observada pode ser decorrente não somente da variabilidade comum de comportamento da cepa entre experimentos diferentes, como também pode estar associada à composição dos leites utilizados e queijos formulados, variações na disponibilidade de nutrientes e também a possibilidade de presença de resíduos de antibióticos no leite, a variar conforme o lote obtido para realização dos experimentos. Baseado nas observações realizadas, sugere-se a realização de estudos complementares para caracterização dos biopolímeros ativos desenvolvidos, incluso determinação dos índices de transferência dos compostos de interesse para a superfície dos alimentos, bem como determinação da velocidade ideal para transferência de compostos, de maneira a garantir a segurança do consumidor contra micro-organismos patogênicos, ao mesmo tempo realizar uma transferência mais lenta de maneira que não sejam consumidos teores dos agentes de interesse acima do necessário e de maneira que os níveis dos compostos utilizados na conservação do produto sejam liberados gradativamente durante toda a vida de prateleira do produto em questão.

### **6.5.2 *Listeria innocua***

Para a expressão dos dados obtidos para o micro-organismo em questão, segue conforme anteriormente esquematizado: Na Figura 5 estão representados por meio da produção de modelos primários de Microbiologia preditiva os comportamentos de *L. innocua* inoculada em queijo Minas frescal e armazenada conforme as condições análogas às adotadas pelo comércio, distribuição e armazenamento deste produto em domicílios de consumidores. Em uma das curvas produzidas, consta o crescimento da cepa quando a amostra inoculada foi acondicionada em filme de pvc estéril (tratamento Controle), e outra referente ao tratamento teste, no qual as amostras foram envoltas nos biopolímeros desenvolvidos, com uma camada de pvc estéril na segunda camada, e uma terceira camada de folha de alumínio para prevenção da oxidação e consequente perda de atividade dos biopolímeros desenvolvidos.



**Figura 5: Modelo primário de Microbiologia preditiva que representa graficamente o comportamento de *Listeria innocua* em queijo Minas frescal: Tratamento Padrão (▲); Com Biopolímeros(◆).**

Em adição, para auxiliar na discussão dos resultados obtidos, foi realizada análise estatística dos parâmetros obtidos a partir dos modelos matemáticos confeccionados. Estas análises foram realizadas a partir do teste T com nível de significância de 0,05%.

**Tabela 6: Resultados das análises estatísticas dos parâmetros obtidos nos modelos.**

	<i>L. innocua</i>		<i>S. aureus</i>	
	Controle	Teste	Controle	Teste
Lag (h)	38,1±3,7 <sup>a</sup>	27,2 ±10,4 <sup>a</sup>	52,9±22,4	0*
Taxa	0,024±0,0065 <sup>a</sup>	0,015±0,002 <sup>a</sup>	0,05±0,02	0*
Pop. Máx (UFC.g <sup>-1</sup> )	8,7±0,3 <sup>a</sup>	8,1±0,2 <sup>a</sup>	7,7±1,5	0*

**Letras diferentes entre tratamentos (linhas) para a mesma categoria indicam diferença estatisticamente significativa por meio do teste T com 0,05% de significância.**

Em decorrência da ausência de fatores como fase lag e taxa de crescimento no experimento no qual a embalagem ativa foi aplicada (coluna 4 - *S.aureus* – Teste), não foi possível realizar cálculo dos parâmetros gerados nos modelos primários de Microbiologia preditiva para *S. aureus* uma vez que não foi obtida uma curva de crescimento em decorrência da total inativação da cepa analisada entre os tempos 10 e 11 dias de estocagem. Com base nos resultados obtidos, foi possível afirmar que não houve um aumento na fase de latência ou lag

para o micro-organismo *L. innocua* após esta ser inoculada em queijo Minas frescal e estes serem acondicionados nos biopolímeros desenvolvidos com posterior armazenamento sob refrigeração (7°C). Contudo, baseado na Figura 5 e na Tabela 6, é possível observar uma redução de cerca de 30% na taxa de crescimento do micro-organismo em questão e sob as condições analisadas, o que indica uma desaceleração na multiplicação das células microbianas quando comparado ao tratamento controle. Contudo, quando aplicado o teste T para verificação de diferença ou similaridade estatística, foi apontado que não há diferença estatisticamente comprovada entre as taxas de crescimento analisadas. Desta maneira, não é possível afirmar que o biopolímero desenvolvido possui atividade antimicrobiana satisfatória frente a *L. innocua* sob as condições analisadas. A hipótese que melhor justifica a menor efetividade do polímero desenvolvido frente a *L. innocua* se dá na maior afinidade do micro-organismo em questão com a matriz utilizada para realização do teste, bem como sua característica psicrotrófica, o que permite um melhor desenvolvimento e multiplicação das células microbianas mesmo em baixas temperaturas, não caracterizando um obstáculo para o seu desenvolvimento. Quando comparado com o comportamento de *S. aureus* frente ao biopolímero desenvolvido, a atividade antimicrobiana observada demonstrou maior eficácia contra *S. aureus*, em decorrência da indicação de presença deste micro-organismo abaixo do limite de detecção para a metodologia utilizada após 10-11 dias de armazenamento, ou sua completa inibição. Em decorrência da impossibilidade de formulação de modelo matemático de Microbiologia preditiva que descreva o comportamento de *S. aureus* frente ao biopolímero desenvolvido e sob as condições analisadas, assim não puderam ser gerados valores referentes aos parâmetros: fase lag, taxa de crescimento e população máxima, que deveriam constar na Tabela 6. Além dos estresses já inerentes ao produto em questão e suas condições de estocagem, principalmente para o micro-organismo *S. aureus*, que possui características mesófilas e de baixo potencial de competição, as elevadas concentrações de geranial no óleo essencial proveniente da espécie *C. citratus* teriam agregado mais um obstáculo ao desenvolvimento e multiplicação do micro-organismo supracitado, com mecanismo de ação inicial e principal caracterizado por dano severo à membrana celular, com efeitos secundários como alteração do pH e ATP intracelular, resultando no colapso celular e conseqüente inibição do mesmo (SHI et al., 2016).

## 6.6 Análise de vida de prateleira

Estão expressos na Tabela 7, em  $\log.UFC.g^{-1}$ , os resultados obtidos nas contagens realizadas nos experimentos que visavam a analisar a influência do biopolímero desenvolvido na microbiota comumente encontrada em queijos Minas frescal, bem como avaliar a possibilidade de extensão da vida de prateleira dos produtos em questão.

**Tabela 7: Resultados referentes ao estudo de vida de prateleira.**

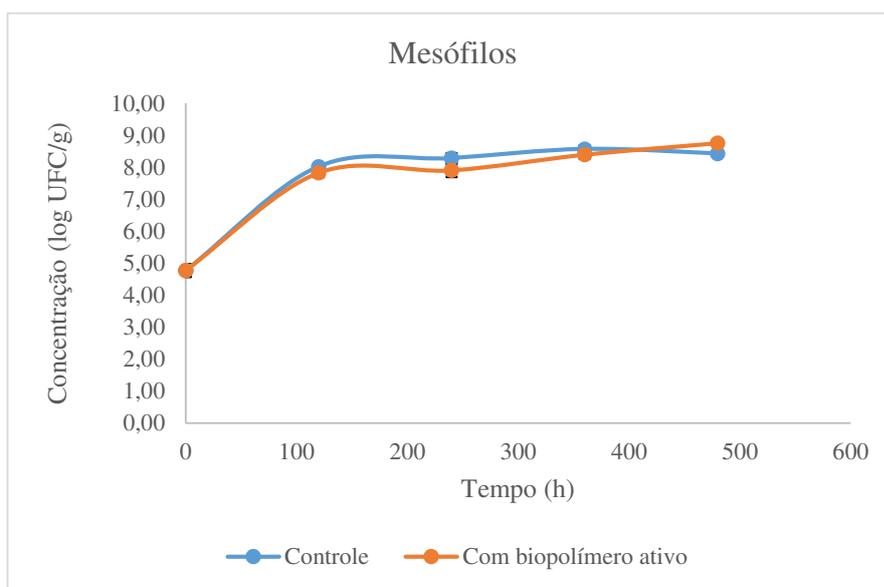
		Tempo (h) x Contagem ( $UFC.g^{-1}$ )				
		0	120	240	360	480
Mesófilos	Controle	4,77±0,19 <sup>a</sup>	8,02±0,05 <sup>b</sup>	8,28±0,16 <sup>b</sup>	8,56±0,10 <sup>a</sup>	8,42±0,03 <sup>b</sup>
	Teste	4,77±0,19 <sup>a</sup>	7,82±0,13 <sup>a</sup>	7,90±0,21 <sup>a</sup>	8,39±0,12 <sup>a</sup>	8,75±0,04 <sup>a</sup>
Psicrotróficos	Controle	4,63±0,16 <sup>a</sup>	8,00±0,02 <sup>b</sup>	8,30±0,14 <sup>b</sup>	8,41±0,12 <sup>a</sup>	8,85±0,00 <sup>a</sup>
	Teste	4,63±0,16 <sup>a</sup>	7,84±0,14 <sup>a</sup>	7,89±0,18 <sup>a</sup>	8,30±0,19 <sup>a</sup>	8,65±0,16 <sup>a</sup>
Bactérias Láticas	Controle	4,63±0,11 <sup>a</sup>	8,20±0,17 <sup>b</sup>	8,09±0,25 <sup>b</sup>	8,54±0,09 <sup>b</sup>	8,38±0,52 <sup>a</sup>
	Teste	4,63±0,11 <sup>a</sup>	7,93±0,05 <sup>a</sup>	7,67±0,08 <sup>a</sup>	8,28±0,09 <sup>a</sup>	8,58±0,24 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus spp</i>	Controle	5,32±0,04 <sup>a</sup>	8,38±0,18 <sup>a</sup>	8,60±0,11 <sup>b</sup>	8,69±0,14 <sup>b</sup>	0
	Teste	5,32±0,04 <sup>a</sup>	8,19±0,12 <sup>a</sup>	7,87±0,33 <sup>a</sup>	8,15±0,28 <sup>a</sup>	0

**Letras diferentes entre tratamentos (linhas) para a mesma categoria indicam diferença estatisticamente significativa por meio do teste T com 0,05% de significância.**

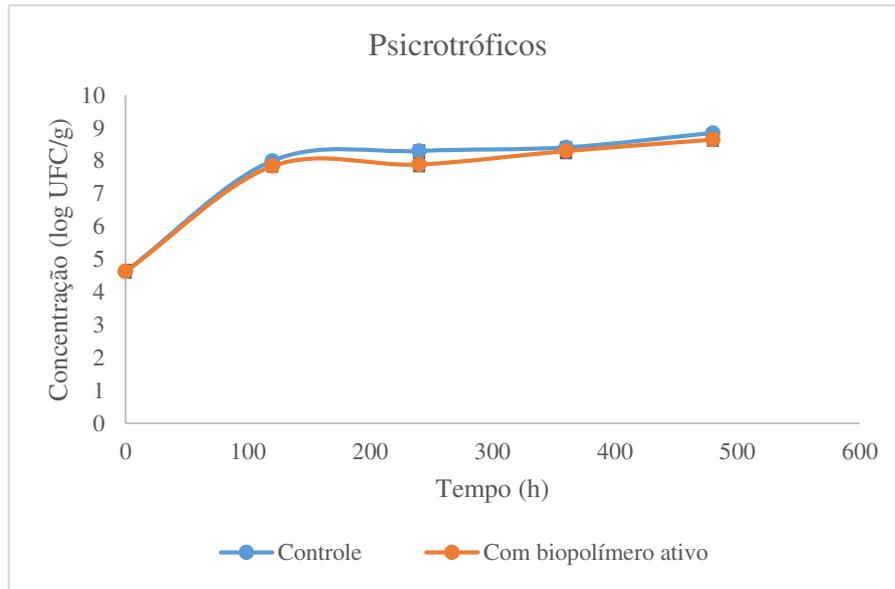
Para esta análise, os destaques constam, inicialmente, no fenômeno de que não foi observado, em nenhum dos pontos analisados ao longo da vida de prateleira dos queijos Minas frescal, a detecção de colônias fenotipicamente características para *Listeria spp*. Posteriormente, foi observada também a indicação de redução na taxa de multiplicação dos grupos de micro-organismos deteriorantes naturalmente presentes na matriz alimentar analisada. Este fenômeno foi caracterizado pela diferença estatisticamente significativa entre as contagens médias referentes aos pontos 120 h e 240 h, equivalentes a 5 e 10 dias de estocagem, entre o tratamento controle e a curva teste, para os grupos de micro-organismos: mesófilos, psicrotróficos e bactérias lácticas. Apesar de comprovado um leve retardamento na velocidade de desenvolvimento e multiplicação dos micro-organismos em questão, não foi possível verificar a capacidade de extensão do prazo de validade dos produtos em questão, uma vez que, com apenas 5 dias de armazenamento, as populações microbianas existentes no produto já haviam ultrapassado os níveis postulados de contaminação por micro-organismos deteriorantes (mesófilos, psicrotróficos e bactérias lácticas) necessários para percepção sensorial da deterioração de alimentos ( $1 \times 10^6$ , aproximadamente) (RAWAT, 2015), fenômeno este que também foi observado nas amostras analisadas já desde o 5º dia de armazenamento. Estes

fatores podem indicar baixa qualidade de matéria prima utilizada na produção dos queijos, possível ineficácia no processamento térmico ou ineficiência na cadeia fria durante o transporte e distribuição dos mesmos nos pontos de venda.

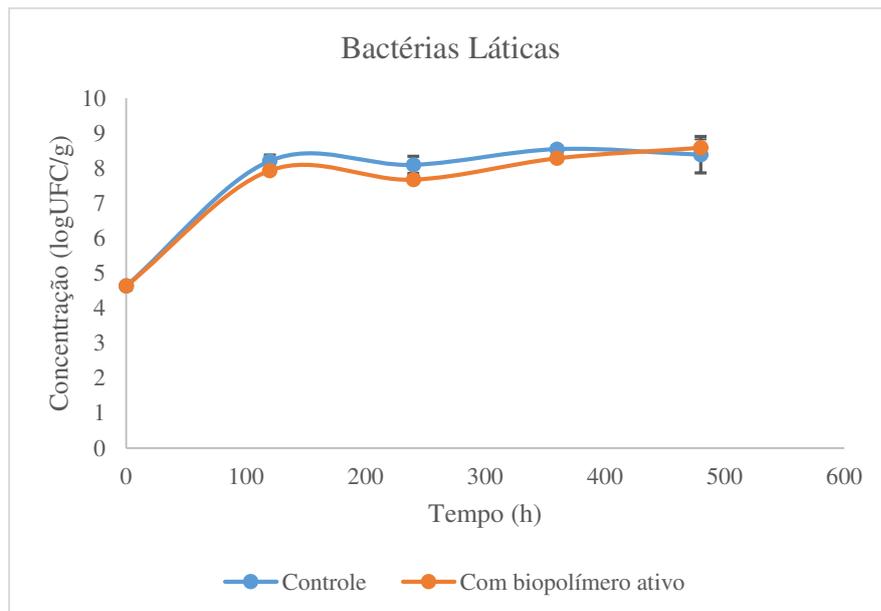
As Figuras 6, 7, 8 e 9 representam graficamente as contagens médias relativas aos pontos analisados, com utilização do recurso de barras de erros para representação gráfica dos desvios padrões. É possível observar, que embora estatisticamente diferentes nos pontos equivalentes aos dias 5 e 10 de armazenamento para os grupos mesófilo, psicrotrófico e de bactérias lácticas, as linhas de tendência que descrevem o comportamento dos grupos de micro-organismos analisados apresentam elevada similaridade, e uma variabilidade pouco significativa em cada ponto analisado individualmente, indicativo de estabilidade e reprodutibilidade nas análises realizadas. As representações gráficas foram construídas sobre o binômio população (expresso em log UFC/g) em função do tempo em horas. Para determinação de similaridade ou diferença estatisticamente comprovada foi utilizado o teste T.



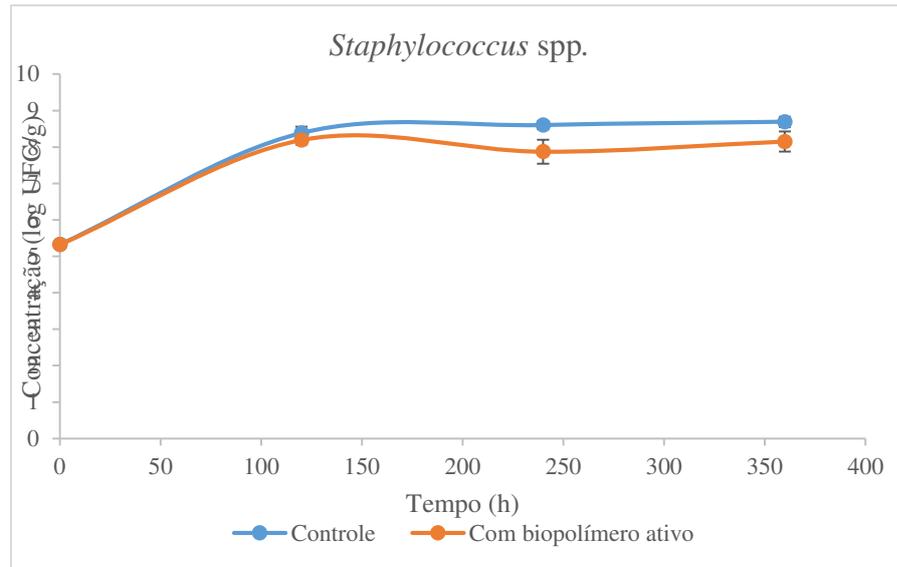
**Figura 6: Representação gráfica do comportamento dos Mesófilos totais em queijo Minas frescal acondicionados ou não nos biopolímeros desenvolvidos.**



**Figura 7: Representação gráfica do comportamento dos psicotróficos totais em queijo Minas frescal acondicionados ou não nos biopolímeros desenvolvidos.**



**Figura 8: Representação gráfica do comportamento das bactérias lácticas em queijo Minas frescal acondicionados ou não nos biopolímeros desenvolvidos.**



**Figura 9: Representação gráfica do comportamento de *Staphylococcus spp.* em queijo Minas frescal acondicionados ou não nos biopolímeros desenvolvidos.**

Embora estudos anteriores tenham obtido sucesso quanto ao desenvolvimento de filmes similares (EMIROĞLU et al., 2010; GOMÉZ-ESTACA, 2010; KUORWEL, 2011), não são tão comuns estudos nos quais estes polímeros são aplicados em alimentos específicos, com cepas isoladas de suas linhas de produção, tampouco uma avaliação do comportamento dos patógenos quanto sua interação com as matrizes alimentares nas quais estão inseridos e frente à liberação destes compostos. Com o estudo realizado, abre-se a perspectiva e possibilidade para desenvolvimento mais expressivo deste tipo de revestimento alimentício, pautado na redução de resíduos sólidos provenientes de petróleo e outras fontes não renováveis e agregação de compostos bioativos de elevado valor biológico que também possuem apelo natural no campo de aplicação como conservantes de alimentos.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos para o estudo em questão, foi possível observar que os óleos essenciais que expressaram menores médias de CIM, portanto com melhor atividade antimicrobiana foram aqueles provenientes das espécies *C. citratus*, *M. piperita*, *R. officinalis*, *E. globulus* e *C. martinii*, sem diferença estatisticamente comprovada entre os mesmos e ao serem levados em consideração todos os micro-organismos analisados. Contudo, quando se trata de incorporação dos óleos essenciais supracitados em matriz polimérica, o óleo essencial de *C. citratus* possui melhor atividade antimicrobiana quando comparado com o óleo essencial de *C. martinii*, e ambos somente possuem atividade antimicrobiana quando frente a micro-organismos Gram-positivos como é o caso de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Quanto aos micro-organismos Gram-negativos como *Salmonella* spp. e *E. coli*, podemos observar que a alteração no veículo de dispersão dos óleos essenciais possui extrema importância na penetração destes compostos através da membrana celular, uma vez que, quando dispersos em solução aquosa, adquirem caráter hidrofílico, sua absorção é facilitada e pode-se observar atividade antimicrobiana dos óleos analisados. Contudo, quando alterado para incorporação em matrizes poliméricas e, por se tratarem de compostos hidrofóbicos, os óleos essenciais perdem sua eficácia frente a este grupo de micro-organismos. Ao avaliarmos a aplicação do biopolímero desenvolvido em queijo tipo Minas frescal, observamos, em adição, a alteração de características organolépticas do produto de maneira indesejável, com alteração de cor e aroma. Desta maneira, sugerimos para estudos futuros o desenvolvimento de biopolímeros com sinergismo de óleos essenciais, em concentrações inferiores a aplicada neste estudo, bem como a aplicação de óleos essenciais que promovam características organolépticas interessantes à classe ou tipo de produto aplicado (exemplo: orégano, manjeriço). Quando analisado o comportamento dos micro-organismos estudados frente a aplicação do biopolímero desenvolvido na matriz alimentar, é possível observar que, em decorrência provavelmente de uma maior afinidade com a matriz alimentar bem como com as condições intrínsecas e extrínsecas de estocagem do alimento, ocorreu melhor adaptação do micro-organismo *L. innocua* aos biopolímeros desenvolvidos, uma vez que não houve diferença significativa entre os parâmetros analisados ao comparar o tratamento controle com aquele em que o filme foi aplicado, indicativo de que não ocorreu atividade antimicrobiana satisfatória. Já para *S. aureus*, foi observada elevada eficiência do tratamento aplicado, a partir da visualização de redução da população microbiana até abaixo do limite de quantificação para a metodologia analisada.

Quanto ao experimento relativo à vida de prateleira, é possível observar indicativos de uma leve desaceleração na taxa de crescimento para a classe de micro-organismos analisados, com diferença estatisticamente comprovada, contudo, não se pode afirmar que os biopolímeros desenvolvidos possuem atividade antimicrobiana satisfatória frente aos grupos de micro-organismos analisados para este último teste. De maneira a melhorar os resultados obtidos para experimentos futuros, sugere-se a utilização de leite cru ou recém pasteurizado, de maneira que as contagens iniciais de micro-organismos sejam inferiores às obtidas no presente estudo e possibilitem a quantificação das populações microbianas presentes inicialmente e o monitoramento da fase de latência das mesmas, bem como o efeito de antimicrobianos alternativos na mesma. Para estudos futuros, sugere-se maior investigação em torno dos temas relacionados com o sinergismo entre óleos essenciais analisados bem como determinação da atividade antimicrobiana de biopolímeros produzidos com os sinergismos observados, realização da caracterização das embalagens desenvolvidas, aplicação de teste sensorial, bem como aplicação do biopolímero desenvolvido em matrizes alimentares diversas, além de estudo do comportamento de novos micro-organismos, determinação da taxa de transferência de compostos e regulamento da mesma . Por fim, sugere-se o aperfeiçoamento do biopolímero desenvolvido para utilização em embalagens mais sofisticadas e mais viáveis do ponto de vista produtivo e econômico.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, Alicia; BORNEO, Rafael; LEÓN, Alberto E. Properties of triticale protein films and their relation to plasticizing–antiplasticizing effects of glycerol and sorbitol. *Industrial Crops And Products*, [s.l.], v. 50, p.297-303, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.043>.

ANDRADE, Bruna Fernanda Murbach Teles et al. Antimicrobial activity of essential oils. *Journal Of Essential Oil Research*, [s.l.], v. 26, n. 1, p.34-40, 29 nov. 2013. Informa UK Limited.

ANDREUCCETTI, Caroline et al. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. *Journal Of Food Engineering*, [s.l.], v. 103, n. 2, p.129-136, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.007>.

ARGUDÍN, María Ángeles; MENDOZA, María Carmen; RODICIO, María Rosario. Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins*, [s.l.], v. 2, n. 12, p.1751-1773, 5 jul. 2010. MDPI AG.

ARPUTHA, M.; SELVAMANI, P.; LATHA, S. In-Vitro antimicrobial evaluation of extracts, oil and fractionated geraniol of *Cymbopogon citratus*-an aromatic grass. *International Journal Of Environmental Sciences*, Trichirappalli, v. 3, n. 1, p.583-590, jul. 2012.

ARTIGA-ARTIGAS, María; ACEVEDO-FANI, Alejandra; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control*, [s.l.], v. 76, p.1-12, jun. 2017.

BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal Of Pharmaceutical Analysis*, Fez, v. 1, n. 6, p.71-79, jan. 2016.

BARANCELLI, Giovana V. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese Manufacturing Plants from the Northeast Region of São Paulo, Brazil. *Journal Of Food Protection*, [s.l.], v. 74, n. 5, p.816-819, maio 2011. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-10-489>.

BASSOLÉ, I.H.N. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, [s.l.], v. 18, n. 12, p.1070-1074, set. 2011.

BASTARRACHEA, Luis; DHAWAN, Sumeet; SABLANI, Shyam S.. Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging: A Review. *Food Engineering Reviews*, [s.l.], v. 3, n. 2, p.79-93, 15 mar. 2011. Springer Nature

BASTOS, Maria do Socorro Rocha et al. *Filme biodegradável de base celulósica incorporado de óleos essenciais*. Fortaleza: Embrapa, 2013. 4 p.

BBC NEWS. *Sanduíches causam intoxicação alimentar em 47 policiais na grã-bretanha*. 2010. Disponível em: <[https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2010/12/101209\\_sanduiche\\_policiais\\_is](https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2010/12/101209_sanduiche_policiais_is)>. Acesso em: 09 abr. 2019.

BENBETTAÏEB, Nasreddine et al. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin-chitosan blend films related to biopolymer interactions. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, [s.l.], v. 94, n. 12, p.2409-2419, 17 fev. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6570>

BRASIL. ANVISA. Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001. Diário Oficial da União, 2001.

BRASIL. MAPA. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. *Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos*. Diário Oficial da União. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil*. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2018

CHEN, W.; VILJOEN. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal Of Botany*, [s.l.], v. 76, n. 4, p.643-651, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>.

CHOI, In-young et al. Anti-ischemic and anti-inflammatory activity of (S)-cis-verbenol. *Free Radical Research*, [s.l.], v. 44, n. 5, p.541-551, jan. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10715761003667562>.

DAHAM, Saad et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, [s.l.], v. 20, n. 7, p.11808-11829, 26 jun. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules200711808>.

DAVIDSON, P. Michael; SCHMIDT, Shannon E.; TAYLOR, T. Matthew. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. *Food Microbiology*, [s.l.], p.765-801, jan. 2013. American Society of Microbiology.

DORES, Milene Therezinha das et al. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from the Serra da Canastra - MG, Brazil. *Food Science And Technology (campinas)*, [s.l.], v. 33, n. 2, p.271-275, jun. 2013. FapUNIFESP (SciELO).

DR. PETRI (Guanghzoul). *Application of chitosan as sizing agent*. 2019. Disponível em: <<http://www.drpetry.com.cn/EN/Pesearch.html>>. Acesso em: 23 maio 2019.

DUSSAULT, Dominic; VU, Khanh Dang; LACROIX, Monique. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds

against food pathogens and application in ham. *Meat Science*, [s.l.], v. 96, n. 1, p.514-520, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.015>.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. CENTERS FOR DISEASE CONTROL CDC. . *Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant Salmonella Heidelberg Infections Linked to Contact with Dairy Calves (Final Update)*. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS. *Modelo de Crescimento*. Disponível em: <[https://browser.combase.cc/ComBase\\_Predictor.aspx?model=1](https://browser.combase.cc/ComBase_Predictor.aspx?model=1)>. Acesso em: 20 dez. 2017.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Part 182 - Substances Generally Recognized as Safe. 2016. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>>. Acesso em: 13 mar. 2017.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Listeria (Listeriosis)*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html> Acesso em: 06 mar. 2018.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. . *Escherichia coli: Symptoms*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/ecoli-symptoms.html>>. Acesso em: 06 mar. 2018b.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. CENTERS FOR DISEASE CONTROL CDC. . *List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations*. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

EMIROĞLU, Zehra Karagöz et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, [s.l.], v. 86, n. 2, p.283-288, out. 2010

ERICKSON, D. R.. Degumming and Lecithin Production and Utilization. In: ERICKSON, D. R.. *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*. Illinois: Aocs, 1995. p. 174-184.

FLYNN, Dan et al. *Sharp rise in French Salmonella outbreak linked to raw milk cheese*. 2018. Disponível em: <<https://www.foodsafetynews.com/2018/12/sharp-rise-in-french-salmonella-outbreak-linked-to-raw-milk-cheese/>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

GALAN, Valter Bertini; PEREIRA, Jéssica da Costa. *As boas oportunidades no Minas Frescal*. 2017. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/panorama-mercado/as-boas-oportunidades-no-minas-frescal-106812n.aspx?r=1136377357>>. Acesso em: 02 mar. 2018.

GALLUCCI, M. N. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms: Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus. *Flavour And Fragrance Journal*, [s.l.], v. 24, n. 6, p.348-354, nov. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1948>.

GAVARA, Rafael. *Practical Guide to Antimicrobial Active Packaging*. Shawbury: Smithers Pira Technology Ltd, 2015. 278 p.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, [s.l.], v. 27, n. 7, p.889-896, out. 2010.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.c. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, [s.l.], v. 25, n. 8, p.1813-1827, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>.

GONÇALVES, Maria José et al. Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Industrial Crops And Products*, [s.l.], v. 35, n. 1, p.166-171, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.030>.

GUENTHER, Ernest. *The Essential Oils-Vol 1: History-Origin In Plants-Production-Analysis*. Read Books Ltd, 2013.

GUPTA, A. et al. Geranyl acetate synthesis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on electrospun polyacrylonitrile nanofiber membrane. *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 48, n. 1, p.124-132, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.028>.

HARTSEL, Joshua A. et al. Cannabis sativa and Hemp. *Nutraceuticals*, [s.l.], p.735-754, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802147-7.00053-x>.

HERMAN, Anna; TAMBOR, Krzysztof; HERMAN, Andrzej. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Current Microbiology*, [s.l.], v. 72, n. 2, p.165-172, 9 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-015-0933-4>

HOLMES, Alison H et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, [s.l.], v. 387, n. 10014, p.176-187, jan. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)00473-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(15)00473-0).

HONG KONG. CENTRE FOR FOOD SAFETY. *Listeria monocytogenes in Cheese Products*. 2014. Disponível em: <[http://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia\\_pub/multimedia\\_pub\\_fsf\\_94\\_01.html](http://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia_pub/multimedia_pub_fsf_94_01.html)>. Acesso em: 06 mar. 2018.

JAY, James M. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JORDAN, K.N.; HUNT, K.; HOORFAR, J. The continuing debate over increasing consumption of raw (unpasteurised) milk: is it safe?. *Case Studies In Food Safety And Authenticity*, [s.l.], p.215-221, 2012. Elsevier.

KIFER, Domagoj; MUŽINIĆ, Vedran; KLARIĆ, Maja Šegvić. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against

Staphylococcus aureus planktonic and biofilm growth. *The Journal Of Antibiotics*, [s.l.], v. 69, n. 9, p.689-696, 17 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2016.10>.

KIM, Y. S. et al. Investigation of the experience of foodborne illness and estimation of the incidence of foodborne disease in South Korea. *Food Control*, v. 47, p. 226–230, 2015.

KIRK, Martyn D. et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *Plos Medicine*, [s.l.], v. 12, n. 12, p.1-13, 3 dez. 2015. Public Library of Science (PLoS).

KNEZEVIC, Petar et al. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal Of Ethnopharmacology*, [s.l.], v. 178, p.125-136, fev. 2016.

KORENBLUM, Elisa et al. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. *Amb Express*, [s.l.], v. 3, n. 1, p.44-49, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-3-44>.

KUORWEL, Kuorwel K. et al. Antimicrobial Activity of Natural Agents Coated on Starch-Based Films against *Staphylococcus aureus*. *Journal Of Food Science*, [s.l.], v. 76, n. 8, p.531-537, 19 set. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02344.x>.

LV, Fei et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, [s.l.], v. 44, n. 9, p.3057-3064, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.030>.

MAGALHÃES, Cristian M. de; SANTOS, Marcos V. dos. *Fatores que alteram a estabilidade do leite*. 2017. Disponível em: <<https://cienciadoleite.com.br/noticia/3821/fatores-que-alteram-a-estabilidade-do-leite>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

MANU, David Kareem. *Antimicrobial activity of cinnamaldehyde or geraniol alone or combined with high pressure processing to destroy Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica in juices*. 2016. 161 f. Tese (Doutorado) - Curso de Food Science And Technology, Iowa State University, Ames, 2016.

MATASYOH, Josphat C. et al. Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *African Journal Of Food Science*, Egerton-20107, v. 5, n. 3, p.138-142, mar. 2011.

MEHLI, Lisbeth et al. The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. *International Dairy Journal*, [s.l.], v. 65, p.20-27, fev. 2017.

MENEZES, Maria Fernanda et al. Microbiota e conservação do leite. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, [s.l.], v. 18, n. 1, p.76-90, 5 jun. 2014. Universidad Federal de Santa Maria.

MILITELLO, M. et al. Chemical Composition and Antibacterial Potential of *Artemisia arborescens* L. Essential Oil. *Current Microbiology*, [s.l.], v. 62, n. 4, p.1274-1281, 25 dez. 2010.

MOHSIN, Mahmood; HOSSIN, Asiful; HAIK, Yousef. Thermomechanical properties of poly(vinyl alcohol) plasticized with varying ratios of sorbitol. *Materials Science And Engineering: A*, [s.l.], v. 528, n. 3, p.925-930, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msea.2010.09.100>.

MUÑOZ-BONILLA, Alexandra; FERNÁNDEZ-GARCÍA, Marta. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress In Polymer Science*, [s.l.], v. 37, n. 2, p.281-339, fev. 2012. Elsevier BV.

OOI, Zhong Xian et al. The Comparison Effect of Sorbitol and Glycerol as Plasticizing Agents on the Properties of Biodegradable Polyvinyl Alcohol/Rambutan Skin Waste Flour

Blends. *Polymer-plastics Technology And Engineering*, [s.l.], v. 51, n. 4, p.432-437, 15 fev. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03602559.2011.639827>.

OUMZIL, H. et al. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytotherapy Research*, [s.l.], v. 16, n. 8, p.727-731, 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1045>.

OUSSALAH, Mounia et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157. *Food Control*, [s.l.], v. 18, n. 5, p.414-420, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>.

PANETO, B.R. et al. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Ribeirão Preto, v. 59, n. 2, p.508-512, jan. 2007.

PELLISSARI, Franciele M. et al. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, [s.l.], v. 57, n. 16, p.7499-7504, 26 ago. 2009. American Chemical Society (ACS).

PERAZZO, Mf et al. Efeito Antimicrobiano do Óleo Essencial do *Cymbopogon citratus* Sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, [s.l.], v. 16, n. 4, p.553-558, 30 dez. 2012. APESB (Associação de Apoio a Pesquisa em Saúde Bucal).

PINGITORE, Esteban Vera et al. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiology*, [s.l.], v. 32, n. 1, p.38-47, out. 2012.

PINGLE, Shrihari Ashok; PAWAR, Varsha Ramchandra. Effect of heat on calcium from different milk samples from sangamner taluka, MAHARASHTRA. *International Science Journal*, Sangamner, Maharashtra, India1, v. 3, n. 1, p.11-14, jan. 2016.

POUILLOT, Régis et al. Infectious Dose of *Listeria monocytogenes* in Outbreak Linked to Ice Cream, United States, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, [s.l.], v. 22, n. 12, p.2113-2119, dez. 2016. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2212.160165>.

PRAJNA, Jha; RICHA, Jindal; DIPJYOTI, Chakraborty. HPLC Quantification of Phenolic Acids from *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash and Its Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Journal Of Pharmaceutics*, [s.l.], v. 2013, p.1-6, 2013. Hindawi Publishing Corporation.

PRASAD, Priyanka; KOCHHAR, Anita. Active Packaging in Food Industry: A Review. *Iosr Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology, Punjab*, v. 8, n. 5, p.1-7, maio 2014.

PUBCHEM. *Neral*. 2019. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cis-Citral#section=Top>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

PUBCHEM. *Myrcene*. 2019b. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/myrcene#section=Food-Additives-and-Ingredients>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

PUBCHEM. *Linalool*, 2019c. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalool>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

PUBCHEM. *Menthol*. 2019d. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/menthol>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

PUBCHEM. *Eucalyptol*. 2019e. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/eucalyptol>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

PUBCHEM. *Camphor*. 2019f. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/camphor>>. Acesso em: 21 mar. 2018.

QUEIROZ, Murilo Mariz et al. Hygienic-sanitary quality of Minas fresh cheese sold in the city of Botucatu, São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, [s.l.], v. 84, n. 1, p.1-1, 1 fev. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000292016>.

RADULOVIC, N.s. et al. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Current Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 20, n. 7, p.932-952, 1 mar. 2013. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986713805219136>.

RAMOS, Marina et al. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal Of Food Engineering*, [s.l.], v. 109, n. 3, p.513-519, abr. 2012.

RAHO, G. Bachir; BENALI, M. (Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*, Algeria, p.739-742, set. 2012.

RAUT, Jayant Shankar; KARUPPAYIL, Sankunny Mohan. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops And Products*, [s.l.], v. 62, p.250-264, dez. 2014.

RAWAT, Seema. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal Of Plant Science And Research*, Srinagar, v. 4, n. 5, p.47-56, jan. 2015.

REALINI, Carolina E.; MARCOS, Begonya. Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, [s.l.], v. 98, n. 3, p.404-419, nov. 2014. Elsevier BV.

ROBERTSON, Gordon L. *Food Packaging: Principles and Practice*. Boca Raton: Crc Press, 2013. 696 p.

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes And New Infections*, [s.l.], v. 6, p.22-29, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>.

ROCHA, Alda do Amaral. *Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros*. 2014. Disponível em: <[http://www.abiq.com.br/imprensa/namidia/Valor Economico - Fabio Scarcelli - Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros.pdf](http://www.abiq.com.br/imprensa/namidia/Valor_Economico_-_Fabio_Scarcelli_-_Mercado_de_queijos_cresce_no_país_e_atrai_estrangeiros.pdf)>. Acesso em: 01 mar. 2018.

ROMEIRO, Reginaldo da Silva. *Técnica de Microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão*. Viçosa, Mg: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia - Laboratório de Bacteriologia de Plantas, 2013. 7 p.

SAHARKHIZ, Mohammad Jamal et al. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita*. *Isrn Pharmaceutics*, [s.l.], v. 2012, p.1-6, 2012. Hindawi Publishing Corporation.

SANGALETTI, Naiane et al. Estudo da Vida útil de queijo Minas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 2, n. 29, p.262-269, abr. 2009. Trimestral.

SANT'ANA, Anderson S.; FRANCO, Bernadette D.g.m.; SCHAFFNER, Donald W. Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. *Food Microbiology*, [s.l.], v. 30, n. 1, p.267-273, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.11.003>.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. Bras. Plantas Med.*, [s.l.], v. 11, n. 4, p.442-449, 2009.

SKAF, Paulo et al. *Industrialização de Carne e Derivados*. São Paulo: Senai, 2017. 200 p.

SHI, Chao et al. Antimicrobial Activity and Possible Mechanism of Action of Citral against *Cronobacter sakazakii*. *Plos One*, [s.l.], v. 11, n. 7, p.1-1, 14 jul. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159006>.

SCHMIDT, Erich et al. Antimicrobial Testings and Gas Chromatographic Analyses of Aroma Chemicals. *Journal Of Essential Oil Bearing Plants*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.99-106, jan. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060x.2005.10643427>.

SILVA, Neusely da et al. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 624 p.

SILVA, Paulo Henrique Fonseca da. *Cálcio em queijos: aspectos químicos, nutricionais e tecnológicos*. Departamento de Nutrição Universidade Federal de Juiz de Fora. 2017. Disponível em: <<https://cienciadoleite.com.br/noticia/3955/calcio-em-queijos-aspectos-quimicos-nutricionais-e-tecnologicos>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

SILVEIRA, Sheila Mello da et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Cienc. Rural*, [s.l.], v. 42, n. 7, p.1300-1306, jul. 2012.

SIMAS, Daniel L.r. et al. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. *Industrial Crops And Products*, [s.l.], v. 98, p.108-115, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.026>.

SIVAIAH, M.v. et al. Recent developments in acid and base-catalyzed etherification of glycerol to polyglycerols. *Catalysis Today*, [s.l.], v. 198, n. 1, p.305-313, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2012.04.073>.

SOMOLINOS, M. et al. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal Of Applied Microbiology*, [s.l.], v. 108, n. 6, p.1928-1939, 20 out. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04597.x>.

SU, Xudong et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from foods and humans. *Food Control*, [s.l.], v. 70, p.96-102, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.020>.

TSAI, Mei-lin et al. Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, [s.l.], v. 75, n. 10, p.1977-1983, 23 out. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.110377>.

TYAGI, Amit Kumar; MALIK, Anushree (a). Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, [s.l.], v. 22, n. 11, p.1707-1714, nov. 2011.

TYAGI, Amit Kumar; MALIK, Anushree (b). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 126, n. 1, p.228-235, maio 2011. Elsevier BV.

WEI, Lee Seong; WEE, Wendy. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iranian Journal of Microbiology*, Terengganu, v. 5, n. 2, p.147-152, jun. 2013.

WOLUPECK, Hanna Lethycia et al. Evolução da qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado em Curitiba (PR) no intervalo de 10 anos (1999 e 2009). *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, Curitiba, v. 10, n. 3, p.243-252, jul/set 2012.

UNZELTE, Carolina. *Pesquisa alerta sobre riscos da listeriose em fatiados no varejo*. 2017. Disponível em: <<https://paineira.usp.br/aun/index.php/2017/05/24/pesquisa-alerta-sobre-riscos-da-listeriose-em-fatiados-no-varejo/>>. Acesso em: 05 mar. 2018.

VIEIRA, Melissa Gurgel Adeodato et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, [s.l.], v. 47, n. 3, p.254-263, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>.

YANG, X; WANG, H. Pathogenic *E. coli* (Introduction). In: BATT, Carl A.; TORTORELLO, Mary-lou. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2. ed. Polônia: Elsevier, 2014. p. 695-696.

YAP, Polly Soo Xi et al.,. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The Open Microbiology Journal*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.6-14, 7 fev. 2014. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1874285801408010006>.

ZACARÃO, Paula Choseck; PILETTI, Raquel. *Estudo da propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais de alho (*allium sativum*), pimenta do reino (*Piper nigrum*) e pimenta rosa (*Schinus molle*) para aplicação em cortes de frango temperados*. 2013. 1 v. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2013.

ZARAI, Zied et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *Lwt - Food Science And Technology*, [s.l.], v. 50, n. 2, p.634-641, mar. 2013.

ZENGIN, Hatice; BAYSAL, Ayse. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules*, [s.l.], v. 19, n. 11, p.17773-17798, 3 nov. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules191117773>.

ZHANG, Jun et al. Advances in the Catalytic Production and Utilization of Sorbitol. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, [s.l.], v. 52, n. 34, p.11799-11815, 14 ago. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ie4011854>.

ZHOU, G.h.; XU, X.l.; LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, [s.l.], v. 86, n. 1, p.119-128, set. 2010.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**TERMO DE SIGILO REFERENTE**

**ÀS INFORMAÇÕES CONSTANTES EM DEFESA DE TESES, DISSERTAÇÕES E  
MONOGRAFIAS**

**Título da Tese/Dissertação/Monografia:** Desenvolvimento e análise da estabilidade de biopolímero ativo adicionado de óleos essenciais como agentes antimicrobianos para acondicionamento de queijo Minas frescal.

**Aluno:** *Raiza lacuzio*    **Data:** 30/07/2019    **Orientador:** *Nathália Cristina Cirone Silva*

1. São tidas como “**Informações Confidenciais**” todas as informações relacionadas à Tese de Doutorado / Dissertação de Mestrado / Monografia de Graduação do **Sr(a). Raiza lacuzio**, cujo o título é “Desenvolvimento e análise da estabilidade de biopolímero ativo adicionado de óleos essenciais como agentes antimicrobianos para acondicionamento de queijo Minas frescal” no dia 30 de julho/2019 às 14:00 horas no mini-auditório expressas por qualquer meio seja oral, escrito ou eletrônico, constantes em documentos, planilhas, sistemas, fotografias, relatórios, disquetes, disco laser, desenhos, modelos, dados, especificações, relatórios, compilações, programas de computador, pedidos de patentes e patentes, produtos e processos e outros, a que venham a ser apresentadas ou de alguma forma disponibilizadas aos examinadores e demais presentes.

2. Os membros da banca examinadora e os presentes manterão sigilo, em relação às “**Informações Confidenciais**” mesmo que estas não contenham nem sejam acompanhadas de qualquer tipo de advertência de sigilo, devendo tal condição ser sempre presumida.

3. Os membros da banca examinadora e os presentes têm ciência e anuência que as informações confidenciais serão protegidas pelos meios legais e asseguram desde já que estas “**Informações Confidenciais**” a que tiverem acesso, não serão mecanicamente copiadas ou de qualquer outra forma reproduzidas, bem como não serão divulgadas, publicadas nem serão circuladas, sem a autorização do aluno, do orientador e da Agência de Inovação da Unicamp – INOVA.

4. O descumprimento dos itens ou condições previstas neste Termo sujeitará o signatário que incorrer na infração ao presente, à responsabilidade criminal e ou civil e conseqüente indenização.

5. Os membros da banca examinadora, abaixo assinados, manifestam sua total ciência e anuência com as condições estabelecidas neste termo.

**Prof<sup>a</sup>.**

Instituição:

RG

**Prof<sup>a</sup>.**

Instituição:

RG

**Prof<sup>a</sup>.**

Instituição:

RG

**Prof<sup>a</sup>.**

Instituição:

RG