

## MICROENCAPSULAÇÃO DE ENTEROCINA E OLEO DE OREGANO EM LEITELHO

Recebido em: 03/01/2023

Aceito em: 03/02/2023

DOI: 10.25110/arqsaude.v27i1.20239151

Veridiana de Almeida Flores de Oliveira <sup>1</sup>

Luciana Furlaneto Maia <sup>2</sup>

**RESUMO:** A pesquisa busca técnicas alternativas para expansão da vida de prateleira dos alimentos, isto tem impulsionado estudos sobre a utilização de conservantes naturais, tais como as bacteriocinas e óleos essenciais, que são considerados agentes antimicrobianos naturais. No entanto estes antimicrobianos naturais, não são adicionados diretamente em produtos alimentícios, devido a alterações sensoriais e em suas características físico e química. Com avanço tecnológico da microencapsulação, tem sido um potencial em fornecer sistemas que garantem estabilidade para os antimicrobianos naturais desta forma podendo compor a matriz de alimentos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi microencapsular a enterocina produzida por *Enterococcus durans* MF5 e óleo de orégano usando leite. Para a microencapsulação, foram realizados três tratamentos: T1 controle leite, T2 leite/enterocina (LE), e T3 leite/enterocina/óleo (LEO). O material foi submetido ao processo de *spray dryer* e foram realizados ensaios para determinar a atividade antimicrobiana do material encapsulado contra as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovi*. O rendimento da microencapsulação foi de 13,01% e 11,63% para LE e LEO, respectivamente. Os resultados apresentados nos microencapsulados LE e LEO mostraram inibição contra todas as bactérias teste, foi constatado que a microencapsulação de enterocina e óleo de orégano mantiveram seu poder antimicrobiano. A efetividade da microencapsulação foi realizada por (FTIR), onde picos de intensidade entre as amostras na região 1000 a 930  $\text{cm}^{-1}$  e 1800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  foram observadas. Os resultados apontam para mudança no perfil químico das amostras encapsuladas, corroborando com a hipótese que o leite apresentou papel encapsulante da bacteriocina e óleo de orégano. Portanto a microencapsulação aumenta a eficácia antimicrobiana dos antimicrobianos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bacteriocina; *Enterococcus durans*; Manteiga; *Origanum vulgare*; Spray Dryer.

### MICROENCAPSULATION OF THE ENTEROCIN AND ESSENTIAL OIL OREGANO IN BUTTERMILK

**ABSTRACT:** The research seeks alternative techniques for expanding the shelf life of foods, this has driven studies on the use of natural preservatives, such as bacteriocins and essential oils, which are considered natural antimicrobial agents. However, these natural antimicrobials are not directly added to food products due to sensory changes and their physical and chemical characteristics. With technological advancement of microencapsulation, it has been a potential to provide systems that ensure stability for natural antimicrobials in this way can compose the food matrix. Therefore, this study has an objective

<sup>1</sup> Graduada em Superior em Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal (UTFPR).

E-mail: [veridiana.1988@alunos.utfpr.edu.br](mailto:veridiana.1988@alunos.utfpr.edu.br)

<sup>2</sup> Doutora em Biologia Celular e Molecular, Universidade Tecnológica Federal (UTFPR).

E-mail: [lucianamaia@utfpr.edu.br](mailto:lucianamaia@utfpr.edu.br)

microencapsulated the enterocin and essential oil, used buttermilk as a encapsulating material where, T1 Buttermilk Control, T2 buttermilk/enterocin (LE), e T3 Buttermilk/enterocin/oil (LEO). The product has been submitted to spray drier process, were conducted trials to determine antimicrobial activity. Was observed with mass yield 13,01% e 11,63% para LE e LEO. These results the microencapsulate indicate then LE e LEO there was inihibiton against bacteria tests. Was observed that the microencapsulated between enterocin and essential oil oregano maintained antimicrobial power. The effectiveness of the microencapsulated was performed by Fourier transform infrared (FTIR) analysis, where a sample in the region 1000 to 930  $\text{cm}^{-1}$  and 1800 to 1500  $\text{cm}^{-1}$  was observed. Therefore microencapsulation increases antimicrobial efficacy of antimicrobials.

**KEYWORDS:** Bacteriocin; *Enterococcus durans*; Buttermilk; *Origanum vulgare*; Spray Dryer.

### MICROENCAPSULACIÓN DE ENTEROCINA Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO EN SUERO DE LECHE

**RESUMEN:** La investigación busca técnicas alternativas para ampliar la vida útil de los alimentos, esto ha impulsado estudios sobre el uso de conservantes naturales, como las bacteriocinas y los aceites esenciales, que se consideran agentes antimicrobianos naturales. Sin embargo, estos antimicrobianos naturales no se añaden directamente a los productos alimentarios debido a los cambios sensoriales y a sus características físicas y químicas. Con el avance tecnológico de la microencapsulación, ha sido un potencial para proporcionar sistemas que garanticen la estabilidad de los antimicrobianos naturales de esta manera puede componer la matriz alimentaria. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo microencapsular la enterocina y el aceite esencial, utilizando suero de leche como material encapsulante donde, T1 Suero de leche Control, T2 Suero de leche/enterocina (LE), e T3 Suero de leche/enterocina/aceite (LEO). El producto ha sido sometido al proceso de secado por pulverización, se realizaron ensayos para determinar la actividad antimicrobiana. Se observó con rendimiento de masa 13,01% e 11,63% para LE e LEO. Estos resultados indican que el microencapsulado LE e LEO fue inhibido contra las pruebas bacterianas. Se observó que el microencapsulado entre enterocina y aceite esencial de orégano mantuvo el poder antimicrobiano. La eficacia del microencapsulado fue realizada por análisis de infrarrojo transformado de Fourier (FTIR), donde fue observada una muestra en la región de 1000 a 930  $\text{cm}^{-1}$  y de 1800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Por lo tanto, la microencapsulación aumenta la eficacia antimicrobiana de los antimicrobianos.

**PALABRAS CLAVE:** Bacteriocina; *Enterococcus durans*; Suero de Leche; *Origanum vulgare*; Spray Dryer.

## 1. INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é um ponto crítico, tanto para os consumidores como para a indústria de alimentos, uma vez que se espera evitar, reduza ou eliminar riscos nos diversos níveis da cadeia alimentar permitindo fornecer e distribuir alimentos com qualidade para satisfazer demandas do consumidor. Os aditivos químicos têm sido amplamente utilizados com objetivo de prevenção a deterioração de alimentos por bactérias patogênicas, mas sua segurança e impacto na saúde humana estão em discussão

devido a aspectos indesejáveis como carcinogenicidade, toxicidade e teratogenicidade. Portanto, fica evidente que há uma demanda contínua por alimentos frescos seguros, minimamente processados e prontos para o consumo que não possuem conservantes químicos artificiais (FRATIANNI *et al.*, 2013) Há uma tendência atual no uso de compostos antimicrobianos naturais de plantas como óleos essenciais e microrganismos como a enterocina. A adição diretamente desses compostos naturais em alimentos é o método mais comum. Entretanto, a adição direta de alguns agentes ativos pode contribuir para alterações sensoriais dos alimentos e a biodisponibilidade desses compostos pode ser reduzida pelas possíveis interações com os ingredientes alimentares. A vista disso, a estabilidade de compostos antes da adição aos produtos alimentícios é importante para a obtenção de produtos que confirmam vida de prateleira prolongada sem alterações em suas propriedades sensoriais, o que pode ser alcançado pela aplicação do processo de microencapsulação (SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017).

O uso empírico de microrganismos e/ou seus produtos para a conservação de alimentos tem sido prática comum na história da humanidade (ROCHA, 2019). Dentre os produtos biológicos destacam-se os peptídeos com propriedades antimicrobianas, que são produzidos por muitos organismos vivos desde procariotos até eucariotos superiores (OGAKI, M.; FURLANETO; FURLANETO-MAIA, 2015).

As Bactérias do Ácido Lático são conhecidas pelo potencial em produzir compostos antimicrobianos, amplamente aplicados na indústria de alimentos, tais como bacteriocinas. Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos ativos contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, diferindo dos antibióticos em modo de ação e síntese (GARCI;GUERRERO-LEGARRETA;REGALADO,2008).Enterocinas são bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* sp afetam primariamente a membrana citoplasmática através da atração eletrostática, causando a liberação de íons, ácido nucleico intracelular e proteínas, levando à lise celular (VIDHYALAKSHMI, 2009).

A técnica de microencapsulação de bacteriocinas tem sido uma das abordagens para manter a eficiência dos peptídeos em matriz alimentar. Este processo consiste na imobilização de substâncias no interior de uma matriz encapsulante, formando uma cápsula que deverá ser capaz de manter a sua integridade em ambientes adversos como temperatura, umidade, pressão osmótica, tensão mecânica, atividade enzimática, componentes químicos e alterações de pH (MADZIVA; KAILASAPATHY; PHILLIPS, 2005).

Leitelho é a fração líquida obtida da produção de manteiga. É considerado como um subproduto na indústria de laticínios. No entanto, quando é processado por

concentração e spray dryer, é utilizado como ingrediente em formulações de alimentos como substituto parcial de sólidos lácteos. Em emulsões alimentícias, o teor de proteínas e fosfolipídios do leite possui um papel tecnofuncional como agente estabilizante devido às suas propriedades tensoativas, que adsorvidas na interface óleo-água criam uma camada viscoelástica impedindo a coalescência. (DEWETTINCK, *et al.*, 2008).

O leite possui um potencial ingrediente para encapsulamento em emulsões atomizadas semelhante à proteína do leite, e como um sistema de entrega de compostos bioativos, como óleos ômega-3 ricos em ácidos graxos. (SANGUANSRI *et al.*, 2015). Nesse sentido, o leite é um produto comercial que possui grande valor para múltiplas aplicações na indústria de alimentos. Por isso, existe um aumento recente pelo interesse de sua utilização, pois ele é um potencial substituto do leite, podendo diminuir o custo da produção, melhorar propriedades funcionais e ainda aumentar o valor nutritivo de produtos (TEIXEIRA *et al.*, 2020).

A indústria alimentícia tem utilizado óleo essencial de forma ampla a nível industrial. Para superar a limitação dos óleos essenciais serem altamente voláteis e reativos, a microencapsulação tornou-se um dos métodos que possibilitam reter e controlar esses compostos. (SOUZA *et al.*, 2009). Possuem propriedades antimicrobianas o que é uma interessante alternativa ao uso de aditivos químicos. Alguns óleos possuem propriedades antioxidantes, com estudos atuais evidenciou-se que óleo essencial de orégano é capazes de inibir 50% da eliminação do radical 2,2-difenilpicrilil-hidrazil (DPPH) (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

O óleo essencial de orégano é utilizado globalmente. É extraído de *Origanum vulgare* L. e formado basicamente por carvacrol e timol (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Tanto o carvacrol quanto o timol são monoterpenos com um único anel fenólico é formado pela ligação de duas moléculas de isopreno com três substituintes de grupos funcionais (MEMAR *et al.*, 2017). Sua estrutura química, fornece propriedades antibacterianas e antioxidantes (SAKKAS & PAPADOPOULOU, 2017; SHARIFI-RAD *et al.*, 2021).

Em razão de suas propriedades conservantes, antioxidantes, antimicrobianas e terapêuticas do óleo essencial de orégano, está emergente para aplicações biotecnológicas. Contudo, a estabilidade e a bioatividade pode ser comprometida pela sua natureza volátil e hidrofóbica natural e por fatores externos, incluindo luz, calor ou oxigênio. Portanto, microencapsulação estão sendo empregadas com objetivo de conferir a proteção do óleo de orégano contra agressões externas e potencializar seu uso. A

encapsulação do óleo de orégano é uma forma empregada para aumentar sua estabilidade, bioatividade e diminuir sua volatilidade. (QUERO *et al.*, 2021).

A microencapsulação é uma tecnologia que se baseia em revestir partículas sólidas, líquidas ou gasosas por meio de um agente encapsulante que atua como uma forma de barreira, isolando o material do núcleo do meio externo (DIMA *et al.*, 2015). As microcápsulas em sua maioria possuem um diâmetro na faixa de 1 a 1.000  $\mu\text{m}$  (HOGENBOM *et al.*, 2021). Devido ao interesse da indústria de alimentos na microencapsulação de ativos, alguns protocolos de microencapsulação foram desenvolvidos, estes são divididos em três categorias que incluem processo físico e químico e mecânico (LENGYEL *et al.*, 2019). A escolha de um material de parede apropriado para o processo de microencapsulação por spray-drying depende do uso final do produto e tem um efeito essencial na obtenção de pós microencapsulados estáveis (SHAIKH *et al.*, 2005). Não há relatos na literatura sobre a microencapsulação de bacteriocinas com este substrato, nem sua associação com óleo de orégano.

Para constatar a interação molecular entre misturas, aplica-se a técnica de espectroscopia no infravermelho é uma técnica aplicada na química, visando o controle de qualidade e para determinar estruturas moleculares de diversos produtos. A FTIR é útil, para analisar os grupos funcionais presentes em uma amostra. Essa observação analisa cuidadosamente as bandas de absorção características de cada grupo funcional do produto (LOPES *et al.*, 2004)

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi microencapsular enterocina e óleo de orégano em matriz leiteiro examinando a eficácia das misturas a fim de comprovar sua atividade antimicrobiana contra bactérias indicadoras *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovi*. Nossa abordagem inclui misturas de antimicrobianos naturais avaliando seu efeito sinérgico contra as bactérias alvo e a interação molecular entre os constituintes.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Material

A matriz encapsulante leiteiro (marca Now Foods Leiteiro) e o óleo de *Origanum vulgare* (orégano) prensado a frio (marca Relva Verde) foram adquiridos no comércio local. Todos os reagentes utilizados neste experimento são de propriedade do laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (Lamba), UTFPR – LD.

## 2.2 Linhagens Bacterianas e Condições de Cultivo

Foi utilizado o isolado *E. durans* MF5 produtor de enterocina, previamente caracterizado por Tosoni (2019). As bactérias indicadoras *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovi*. As culturas encontram-se estocadas em freezer e foram reativadas em 5 mL de caldo MRS para *E. durans* MF5 e caldo BHI para as demais bactérias. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas.

Tabela 1. Cepas bacterianas usadas neste estudo

Microrganismo	Designação da Cepa
<i>Enterococcus durans</i>	MF5
<i>Listeria monocytogenes</i>	2048
<i>Listeria innocua</i>	29212
<i>Listeria ivanovi</i>	2050

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

## 2.3 Obtenção e Concentração de Enterocina

O sobrenadante Livre de Células (CFS), contendo enterocina, foi obtido conforme metodologia descrita por OGAKI et al (2015). Para isso, *E. durans* MF5 foi crescido em 600 ml caldo MRS e incubados a 37 °C sob agitação de 150 rpm por 24 h. O cultivo foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. O pH do sobrenadante foi ajustado para 6,5 com NaOH 1N, para inibir a ação do ácido láctico.

O extrato livre de células foi submetido a purificação pelo método de precipitação por sulfato de amônio, onde foram adicionados sob agitação as concentrações do sal até atingir a saturação de 50% e 80% deste sal. Após 24 h de refrigeração, procedeu-se a centrifugação a 10000 rpm a 4°C/15 minutos (ROCHA et al., 2019).

## 2.4 Preparo das Soluções

Três formulações foram obtidas nas concentrações citadas da Tabela 1 em condições assépticas, após total homogeneização usando equipamento Dispensor Ultra Turrax (T18-IKA) 10.000 rpm por 5 min, realizou-se a secagem por aspensão em *spray dryer* (LabMq MSD1.0). As soluções foram pulverizadas para secagem e microencapsulação conforme os parâmetros: 150 °C na temperatura de entrada; temperatura de saída 110 °C; pressão de ar 1,95 kgf/cm<sup>2</sup> e taxa de fluxo 0,8 L/h. Para o controle negativo foi utilizado apenas o leiteiro nas mesmas condições de secagem. O pó obtido (microcápsulas) foi coletado da base do ciclone, para melhor conservação e redução de possíveis danos oxidativo foi armazenado em frascos estéreis hermeticamente fechados e mantidos a 4°C.

## 2.5 Encapsulação da Enterocina

A encapsulação da enterocina foi realizada seguindo o protocolo descrito por Ramalho (2020), com modificações. A concentração de leiteiro (matriz encapsulante) e enterocina estão descritas na Tabela 1.

Tabela 2. Concentrações da matriz encapsulante (leiteiro), enterocina e óleo de orégano utilizado neste estudo.

Componentes (g ou mL)	Controle	Leiteiro/enterocina (LE)	Leiteiro/enterocina/óleo ((LEO))
Leiteiro	25	25	25
Enterocina	-	6,5	6,5
Óleo (orégano)	-	-	6,5
Água	65	68,5	62

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

## 2.6 Microencapsulação da Enterocina e Óleo de Orégano

Com objetivo de verificar a melhor eficiência da enterocina contra patógenos alimentares, foi incorporado ao processo de microencapsulação óleo de orégano. Para tanto, procedeu-se o processo de microencapsulação com os mesmos parâmetros descritos anteriormente, utilizando os componentes descritos na Tabela 1.

## 2.7 Rendimento do Processo

O rendimento do processo ( $\eta\%$ ) compreende a quantidade em massa de material recolhido após a secagem por aspersão, com referência à massa de não solvente na correspondente solução (alimentação) utilizada no preparo (XIAO *et al.*, 2011). Para tanto, foi utilizada a equação 1.

$$\eta(\%) = \frac{\text{massa de material seco coletado}}{\text{massa (encapsulante+enterocina) na alimentação}} \times 100 \quad (1)$$

## 2.8 Atividade Antagônica da Enterocina Sobre os Isolados Alvo

O teste da atividade antimicrobiana da enterocina concentrada e encapsulada seguiu protocolo descrito por Ramalho (2020). Assim, 25 mL de meio BHI semi-sólido 0,8%, contendo as bactérias alvo (*Listeria* sp) na concentração de  $1,5 \times 10^8$  células/mL foram transferidos para placas de Petri.

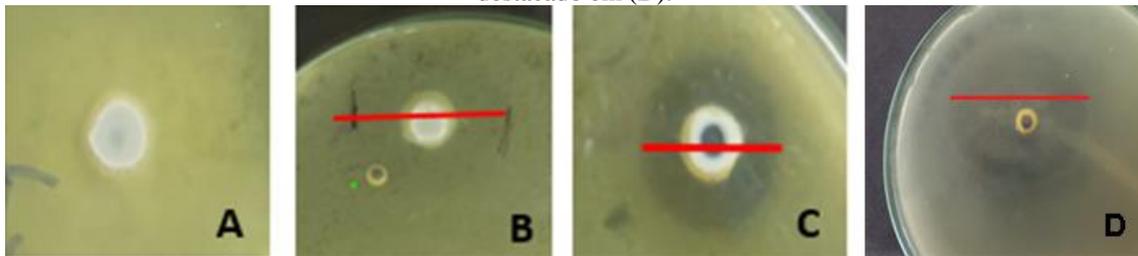
Após a solidificação, foram realizados poços de 5 mm no meio. As duas formulações de enterocina microencapsulada (LE e LEO) foram diluídas em água estéril em

concentrações de 5 % p/v, sendo transferidos para cada poço 30 µL desta solução. A enterocina não encapsulada foi testada nas mesmas concentrações.

As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 20 min, para permitir a difusão do sobrenadante no ágar e posteriormente incubada a 37 °C por 24 h.

A presença de halo ao redor do poço foi indicativa de atividade antagônica da enterocina, encapsulada ou não (Figura 2).

Figura 2. Halo de inibição de *Listeria monocytogenes* pelos microencapsulados Leiteinho-Enterocina (B); Leiteinho-Enterocina-Óleo (C); controle contendo apenas leiteinho está destacado em (A) e Óleo de orégano destacado em (D).



## 2.9 Atividade antimicrobiana

Os materiais encapsulados descritos na (Tabela 1) apresentaram atividade antimicrobiana, exceto o controle que contém apenas leiteinho (A). Os testes mostram a zona de inibição com diâmetros descritos na (Tabela 3) para bactéria alvo cepa 2050, para demais cepas os resultados foram similares.

Tabela 3. Zona de inibição (cm) de atividade antimicrobiana dos encapsulados com *Listeria monocytogenes*.

Amostras	<i>Listeria monocytogenes</i> (cm)
A	0
B	2,5
C	2,5

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Os resultados dos testes de poço de difusão para o óleo de orégano em ambas a cepas apresentaram halos notórios medindo respectivamente 25cm, 3,5cm e 2,5cm nas cepas 2048, 2050 e 29212.

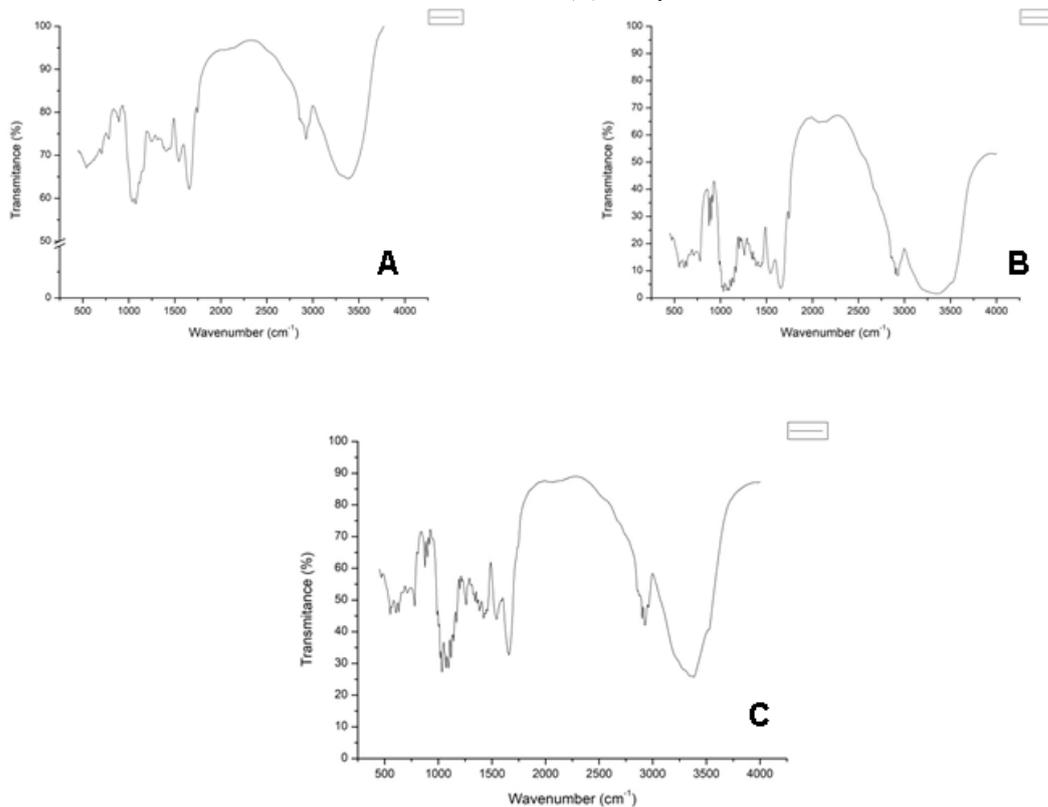
Tabela 4. Zona de inibição (cm) de atividade antimicrobiana de óleo essencial de orégano isolado.

Cepas	Zona de inibição (cm)
2048	2,5
2050	3,5

## 2.10 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na faixa de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  (figura 3). O Espectrofotômetro Infravermelho utilizado foi (Spectrum Two), modelo *Perkin Elmer* em modo transmitância. As amostras descritas na (Tabela 1) foram maceradas em pistilho, até sua homogeneização na presença de KBr, após prensado em plastilhador formando pastilhas com tamanho médio de 1mm. Os espectros foram processados com *software Origin*.

Figura 3. Espectro de FTIR de amostra leiteiro isolado (A) e Leiteiro-Enterocina (B); Leiteiro-Enterocina-Óleo (C) encapsulados.



## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A enterocina produzida por *E. durans* MF5 foi anteriormente caracterizada sendo confirmado seu caráter proteico e termoestável, pertencendo á bacteriocina de classe II (TOSONI, 2019). Diversos estudos demonstraram a eficiência da enterocina MF5 contra os principais patógenos alimentares, incluindo a *Listeria* sp (ROCHA *et al.*, 2020).

O rendimento do processo de microencapsulação foi de 13,01 % e 11,63% para LE e LEO, respectivamente.

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos no teste de poço de difusão. Observa-se que não houve a formação do halo de inibição no poço controle, contendo apenas solução de leiteiro, comprovando que o leiteiro isolado não apresenta atividade antimicrobiana (Figura 2A).

Entretanto os resultados apresentados no microencapsulado LE e LEO mostrou notoriamente a presença de halo de inibição de *L. monocytogenes* (Figura 2B e C). Houve a formação de halo de inibição no tratamento LEO, provando um efeito sinérgico entre a enterocina e óleo de orégano (Figura 2C). Os mesmos resultados foram obtidos com os isolados *L. innocua* e *L. ivanovii*. Para comprovar o efeito sinérgico da enterocina com óleo de orégano, foi realizado o teste de poço de difusão com óleo de orégano isolado (Figura 2D) observa-se a presença de maior halo translúcido de inibição, corroborando com a hipótese de um efeito sinérgico entre os constituintes.

Ramalho (2019) descreveu a microencapsulação de enterocina MF5 em soro de leite, obtendo resultados relevantes de ação antimicrobiana contra espécies de *Listeria*, corroborando com estes dados apresentados. De fato, o uso de bacteriocinas é de particular interesse para a indústria de alimentos, pois contribui para garantir biologicamente a segurança microbiana dos produtos alimentícios e para aumentar sua vida útil em vez de aditivos químicos (JAOUANI *et al.*, 2015).

A ação mais comum das bacteriocinas é a destruição da membrana citoplasmática da célula alvo, levando ao extravasamento celular. A destruição da membrana é causada pela permeabilização por meio da formação de poros resultando em efluxo de íons, dissipação da força-protomotiva, hidrólise de ATP e eventual perda de viabilidade e lise celular (CARVALHO, 2015; ENNAHAR *et al.*, 2000).

Para formar os poros, as bacteriocinas precisam interagir com a membrana citoplasmática da célula-alvo. A primeira fase na formação de poros pela bacteriocina envolve as interações eletrostáticas entre a carga positiva e os resíduos polares da bacteriocina com os fosfolipídios aniônicos presentes na bicamada lipídica da membrana alvo. Já a segunda fase envolve mudanças irreversíveis e letais em cepas sensíveis à bacteriocina (OGAKI, M.; FURLANETO; FURLANETO-MAIA, 2015)

Entretanto, inter-relações entre peptídeos antimicrobianas e componentes da matriz alimentar, como proteínas, lipídios, íons e surfactantes, podem reduzir a ação antimicrobiana. Ainda, o pH do meio em que a enterocina se encontra, baixa solubilidade,

distribuição desigual no alimento e presença de proteases, podem interferir na ação do peptídeo e conseqüentemente sua eficácia (GÁLVEZ *et al.*, 2007). Portanto, é necessário o desenvolvimento de alternativas que permitam a proteção dessas enterocinas mantendo sua eficácia e segurança na matriz alimentar.

A técnica de microencapsulação de bacteriocinas tem sido uma das abordagens para manter a eficiência dos peptídeos em matriz alimentar. Este processo consiste na imobilização de substâncias no interior de uma matriz encapsulante, formando uma cápsula que deverá ser capaz de manter a sua integridade em ambientes adversos como temperatura, umidade, pressão osmótica, tensão mecânica, atividade enzimática, componentes químicos e alterações de pH (MADZIVA; KAILASAPATHY; PHILLIPS, 2005).

Alguns autores relataram que o processo de microencapsulação e o aquecimento pelo *spray dryer* podem causar desdobramento parcial das moléculas de peptídeo, levando a uma melhor exposição dos locais de ligação aumentando a atividade antimicrobiana (BEN AMARA *et al.*, 2017). ABID *et al.* (2019). Maia *et al.* (2018) também relataram o aumento da atividade antagônica de enterocina após tratamento a 100 °C.

O óleo essencial de *O. Vulgare*, conhecido como orégano, apresenta como principal composição fenóis, destacando carvacrol e timol. Esses compostos fenólicos exercem atividade antimicrobiana, lesando as membranas plasmáticas lipídicas, comprometendo a homeostase do pH e o equilíbrio de íons orgânicos, impedindo a divisão celular e causando desidratação nas células bacterianas Oliveira *et al.* (2008). Portanto fica evidente o potencial antimicrobiano do óleo de orégano como descrito na tabela 4, esses resultados corroboram com que foi reportado por Sousa *et al.* (2012) quando há interação da membrana citoplasmática da bactéria com carvacrol, ela tende a perder elétrons para o grupo de hidroxila presente no carvacrol, causando a destruição lipídica da membrana, levando a morte celular devido ao vazamento intracelular do microrganismo.

Durante a produção da manteiga, ocorre o rompimento dos glóbulos de gordura e, conseqüentemente, a liberação dos triglicerídeos e fosfolipídeos que ficam dispersos na fase aquosa, sendo este denominado de leitelho (COSTA; JIMENEZ; GIGANTE, 2009). Além de possuírem atividades biológicas e nutricionais, os fosfolipídeos apresentam funções tecnológicas, principalmente devido às suas características anfífilas, atuando, assim, como agentes emulsionantes e surfactantes (DEWETTINCK *et al.*, 2008).

O leitelho ainda é subaproveitado nas indústrias produtoras de manteiga e

apresenta uma DBO duas vezes superior à do soro, provocando maiores danos ao meio ambiente quando descartado de forma incorreta (SILVA *et al.*, 2010). Por apresentar grande potencial tanto 18 tecnológico e econômico para a indústria quanto de funcionalidade nutricional para os consumidores, a reutilização desse resíduo deve ser melhor explorada (PFRIMER, 2018). Em conjunto, os resultados deste estudo mostraram a viabilidade de microencapsulação de enterocina e óleo de orégano em leiteiro, visando potenciais aplicações industriais.

Para a determinação dos agentes antimicrobianos retidos nas amostras atomizadas utilizou-se a técnica de espectrometria infravermelho (FTIR) que permite verificar se o processo de microencapsulação foi eficiente. É possível observar que o espectro da amostra B, (figura 3) as bandas localizadas em 1580 a 1495  $\text{cm}^{-1}$ , são atribuídas ao grupo amina N-H, característico das estruturas de peptídeos. A enterocina produzida pelo *E. durans* MF5 não possui caracterização molecular, entretanto devido suas características termoestáveis é evidente que esta pertença as bacteriocinas da classe IIa, que compartilham uma sequência de aminoácidos e uma ligação dissulfeto conservada na parte N-terminal do peptídeo; porém, pode se diferenciar na região C-terminal (OLUK; KARACA, 2018). Observa-se que as bandas 1740 a 1670  $\text{cm}^{-1}$ , são características dos grupos COOH presentes no leiteiro.

Na amostra C, (figura 3) as bandas localizadas 1500 a 1450  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas às estruturas do carvacrol e timol, característicos do óleo de orégano, estes resultados corroboram com os achados de Cavalcante, (2018). As bandas localizadas entre 3000 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  referem-se aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H presentes no timol e carvacrol (CAVALCANTE, 2018). Apesar de sutis as diferenças dos espectros das amostras, são possíveis identificar picos de intensidade entre as amostras A e B e B e C na região 1000 a 930  $\text{cm}^{-1}$  e 1800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente o que corroboram para a eficiência da encapsulação.

#### 4. CONCLUSÕES

Os dados apresentados mostram a aplicação de antimicrobianos naturais encapsulados em leiteiro contra *L. monocytogenes*. A junção de antimicrobianos naturais como enterocina e óleo essencial de orégano compreende uma mistura eficaz de ativos naturais de atividade antimicrobiana que agem sinergicamente para inibir *L. monocytogenes*, como comprovado em testes realizados de poço de difusão neste estudo. Embora outros estudem e comprovem a eficácia da enterocina como agente

antimicrobiano para uso em alimentos, observa-se que a proposta de unir dois agentes de atividade antimicrobiana funciona bem para minimizar a possível resistência de patógenos á enterocina quando não associada ao óleo essencial. A enterocina e o óleo de orégano não perderam sua capacidade antagônica, mesmo após o processo de spray drier em que forma submetidos, mostra-se altamente eficazes contra a bactéria alvo neste estudo. A eficácia da microencapsulação foi comprovada pela técnica de FTIR que indicaram a interação entre a matriz e os encapsulados. É ciente que mais estudos devem ser feitos, entretanto acreditamos que as soluções microencapsuladas (LE e LEO) produzidas em nosso laboratório podem ser testadas como ingredientes alimentares para atuarem como conservantes biopreservativos em diversos alimentos onde se comprove sua eficácia contra patógenos alvos.

Além disso, o leiteiro como material encapsulante é uma proposta interessante uma vez que se trata de um subproduto proveniente do processo industrial da manteiga e suas propriedades incluem benefícios de alto valor nutricional, o que torna viável seu uso para o desenvolvimento de um novo produto, como é proposto neste estudo. Em perspectivas futuras o trabalho visa à aplicação em algumas matrizes alimentares para acompanhar o comportamento do microencapsulado e sua eficácia em alimentos e avaliando a padronização com objetivo de aumentar o rendimento do produto.

## REFERÊNCIAS

- ABID, Y. et al. Spray-drying microencapsulation of nisin by complexation with exopolysaccharides produced by probiotic *Bacillus tequilensis*-GM and *Leuconostoc citreum*-BMS. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. May, p. 25–30, 2019.
- AUGUSTIN M.A., BHAIL S., CHENG L.J., SHEN Z., OISETH S., SANGUANSRI L. Use of whole buttermilk for microencapsulation of omega-3 oils. **J. Funct. Foods**. 2015.
- CAVALCANTE, P, V, D. **Desenvolvimento e caracterização de filme ativo antimicrobiano de amido de araruta/quitosana incorporado com óleo essencial de *Thymus Vulgaris***. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- CARVALHO, M. J. **Isolamento e caracterização de bacteriocinas com potencial interesse na área alimentar**. 2015. Dissertação (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) - Escola Superior Agrária, Instituto politécnico de Viana do Castelo, Viana do Castelo, 2015. Disponível em: [http://repositorio.ipvc.pt/handle/20.500.11960/1510?locale=pt\\_PT](http://repositorio.ipvc.pt/handle/20.500.11960/1510?locale=pt_PT). Acesso em: 02 mar. 2022.
- CORCORAN, B. M. *et al.* Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 1024–1039, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15078519/>. Acesso em: 03 Mar. 2022.
- COSTA, M. R.; JIMENEZ R. F.; GIGANTE, M. L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 3, p. 507-514, 2009.
- DEWETTINCK, K.; ROMBAUT, R.; THIENPONT, N.; LE, T. T.; MESSENS, K.; VAN CAMP, J. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 436-457, 2008.
- DIMA C., DIMA S. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. **Curr. Opin. Food Sci.** v. 5, p. 29–35, 2015.
- FRATIANNI, F.; NAZZARO, F.; MARANDINO, A.; FUSCO, M.R.; COPPOLA, R.; FEO, V.D.; MARTINO, L.D. Biochemical composition, antimicrobial activities, and anti-quorum-sensing activities of ethanol and ethyl acetate extracts from *Hypericum con-natum* Lam. (Guttiferae). **J. Med. Food**. v. 16, p. 454–459, 2013. Acesso em: 03 Mar. 2022.
- FURTADO, D. N. et al. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis subsp. lactis* DF04Mi isolated from goat milk : Application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas-type goat cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 206, p. 201–206, 2015.
- GÁLVEZ, A; ABRIQUEL, H; LOPEZ, R,S; OMAR, N,B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **Int J Food Microbiol**. 2007.

GARCI, B. E.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; REGALADO, C. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, p. 670–680, 2008.

HOGENBOM J., JONES A., WANG H.V., PICKETT L.J., FARAONE N. Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin-essential oil inclusion complexes for tick repellent development. *Polymers*. 2021. Acesso em: 02 mar.

JAOUANI, I. et al. Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolate from Tunisia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 1089–1100, 2015.

LENGYEL M., KÁLLAI-SZABÓ N., ANTAL V., LAKI A.J., ANTAL I. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. **Sci. Pharm.** 2019. Acesso em: 02 mar.

LEROY, F.; FOULQUIÉ MORENO, M. R.; DE VUYST, L. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2–3, p. 235–240, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14596995/>. Acesso em: 02 Mar. 2022.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. ESQUEMA PARA INTERPRETAÇÃO DE ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MADZIVA, H.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. Alginate-pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 4, p. 343–351, 2005.

MEMAR MY, MOHAMMAD RAEI P., ALIZADEH N., AKBARI AGHDAM M., KAFIL HS. Carvacrol e timol: agentes antimicrobianos fortes contra isolados resistentes. **Rev. Med. Microbiol.** v. 28, p. 63-68, 2017. Acesso em: 07 Mar. 2022.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas, **Brazilian Journal of Food Technology**, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/RWbydrVtbsPYBCcvphpKrvS/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 07 Mar. 2022.

OLUK, C. A.; KARACA, O. B. The Current Approaches and Challenges of Biopreservation. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. (org.). Food Safety and Preservation. **Elsevier Inc.**, 2018. Cap. 18. p. 565–597.

OLIVEIRA, D.H.; FARIAS, A.M.; CLEFF, M.B.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A. **Caracterização química do óleo essencial de Origanum vulgare: análise da relação timol/carvacrol**. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17. Pelotas, 2008. Pelotas: UFPel.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 6, p. 465–499, 2003.

PFRIMER, R. T. **Desenvolvimento e avaliação de bebida láctea fermentada acrescida de leiteiro e saborizada com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)**. 2018. 91f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

QUERO, P, M, G; RUBIO, S; CANO, J; AGUILAR, M; LASA, BLANCA. Oregano Essential Oil Micro- and Nanoencapsulation With Bioactive Properties for Biotechnological and Biomedical Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 22, 2021.

RAMALHO, R. **Microencapsulação de enterocina em soro de leite visando aplicação contra patógenos alimentares**. 2020. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2020.

ROCHA, K. R. et al. Inhibitory effect of bacteriocins from enterococci on developing and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria innocua*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 1–11, 2019.

ROSS, R. P ; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: Past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**. v. 79, n. 1-2, p. 3-16, 2002.

RODRÍGUEZ, E. et al. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1–2, p. 7–15, 2000.

SAKKAS H., PAPADOPOULOU C. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de manjeriço, orégano e tomilho . **J. Microbiol. Biotecnologia**. v. 27 , p. 429-438, 2017. Acesso em: 02 mar.

SILVA, E. M. P.; MIQUELITO, R.; OLIVEIRA, M. R.; AMORIM, M. B. A.; PASSOS, F. J. V. Avaliação da alternativa de aproveitamento do leiteiro na padronização do creme em substituição a água. Juiz de Fora, Brasil. Juiz de Fora: **Anais do Congresso Nacional de Laticínios**. 2010.

SOUZA, VI; PARENTE, JF; MARQUES, JF; FORTE, MA; TAVARES, CJ Microencapsulação de Óleos Essenciais: **Uma Revisão**. **Polímeros** v. 4 p. 1730, 2009.

TEIXEIRA B., MARQUES A., RAMOS C., NENG N.R., NOGUEIRA J.M.F., SARAIVA J.A., NUNES M.L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Ind. Crops Prod.** p. 43:587–595, 2013.

TEIXEIRA, I. M. D. et al. Elaboração de bebida à base de leiteiro e análise sensorial de bebidas achocolatadas comerciais. **Brazilian Journal of Development**, 6(6), 42010-42022, 2020.

TIWARI, B.K.; VALDRAMIDIS, V.P.; O'DONNELL, C.P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P.J. Application of natural antimicrobials for food preservation. **J. Agric. Food Chem.** v. 57, p. 5987–6000, 2019.

TOSONI, N. F. **Potencial antibacteriano de enterocinas em células planctônicas e em biofilme de *Salmonella typhimurium* e sorotipos de *Escherichia coli***. 2019. Dissertação

(Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2019.

VIDHYALAKSHMI, R. B. et al. Encapsulation “The Future of Probiotics”-A Review. **Advances in Biological Research**, v. 3, p. 96–103, 2009.

XIAO, L. J. et al. Expression of yeast high mobility group protein HMO1 is regulated by TOR signaling. **Gene**, v. 489, n. 1, p. 55–62, 2011.