



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

THAIS DANYELLE SANTOS ARAUJO

**NANOEMULSÃO DE GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale*) E ÓLEO
ESSENCIAL DE MANJERICÃO-CRAVO (*Ocimum gratissimum*) NA INIBIÇÃO DE
MELANOSE E QUALIDADE DE CAMARÃO BRANCO DO PACIFICO (*Litopenaeus
vannamei*)**

FORTALEZA

2021

THAIS DANYELLE SANTOS ARAUJO

NANOEMULSÃO DE GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale*) E ÓLEO
ESSENCIAL DE MANJERICÃO-CRAVO (*Ocimum gratissimum*) NA INIBIÇÃO DE
MELANOSE E QUALIDADE DE CAMARÃO BRANCO DO PACIFICO (*Litopenaeus
vannamei*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza

Coorientadora: Prof^a Dra. Durcilene Alves da Silva

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A692n Araujo, Thais Danyelle Santos.
Nanoemulsão de goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) e óleo essencial de manjeriço-cravo (*Ocimum gratissimum*) na inibição de melanose e qualidade de camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*) / Thais Danyelle Santos Araujo. – 2021.
112 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.
Coorientação: Prof. Dr. Durcilene Alves da Silva.
1. Antioxidante. 2. Antibacteriano. 3. Patógenos. 4. Nanotecnologia. I. Título.

CDD 639.2

THAIS DANYELLE SANTOS ARAUJO

NANOEMULSÃO DE GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale*) E ÓLEO
ESSENCIAL DE MANJERICÃO-CRAVO (*Ocimum gratissimum*) NA INIBIÇÃO DE
MELANOSE E QUALIDADE DE CAMARÃO BRANCO DO PACIFICO (*Litopenaeus
vannamei*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Pesca, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutora em
Engenharia de Pesca. Área de Concentração:
Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 07/12/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª Dra. Durcilene Alves da Silva (Coorientadora)
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

Profª. Dra. Rosa Helena Rebouças
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

Dra. Fabiola Helena dos Santos Fogaça
Embrapa Agroindústria de Alimentos (Embrapa)

Dra. Juliana Rabelo de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha pequena guerreira e amada filha,
Melissa Iara.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser minha fortaleza e me manter firme durante essa jornada, e a espiritualidade de força maior por me guiarem e me manterem de pé.

Aos meus pais Lucilene Araujo e Moises Araujo por todo apoio, incentivo, ajuda e cuidado para com minha pequena.

À minha filha Melissa Iara pela compreensão, embora tão pequena e por me dar forças e ao meu esposo David Leite pelo apoio nessa etapa final e por ser exemplo de determinação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bartolomeu de Souza por ser esse profissional e ser humano inspirador, obrigada por enxergar além, por todo incentivo, ensinamentos, compreensão e pela confiança.

À minha coorientadora Prof^a Dra Durcilene Alves pela acolhida, pelo apoio, ensinamentos e confiança.

À Embrapa em nome da Dra Fábíola Fogaça, Dra Alitiane Lemos, Dra Karina Castro, Dr. Kirley Canuto e Dra Rita, Sr. Batista e Sr. Francisco (Neném) por todo auxílio e apoio técnico.

À banca examinadora pelas valorosas contribuições.

À prof^a Rosa Helena pelos ensinamentos e apoio.

Aos amigos da pós-graduação (Alyne Rodrigues, Lorena Leite, Thiago Bastos, Gabriel Facundo...), e aos amigos que reencontrei na UFC (Pedro Florêncio e Eduardo Lira) por tornarem essa trajetória mais leve.

Aos professores do PPG Engenharia de Pesca por todos os conhecimentos compartilhados.

À Alyne Araújo, Fábio Ribeiro, João Marcos da Costa, Taiane Maria, Antônia Carla, Jhones Dias pelas contribuições e auxílio sempre que solicitado.

Ao Edmar Moreira, Eryka Andrade, Ayslan Batista, Bruno Iles, Raí Emanuel, Gisele Araujo, Leiz Veras... e a todos do Biotec pelo convívio e ensinamentos.

À todos os colegas do Latepe que colaboraram direta ou indiretamente.

À Sidely Gil, Luiz Gonzaga, Thiago Fernandes, Andreeane Vasconcelos e Daniela Nadvorny por todo auxílio.

À Saissa Teixeira e sua mãe Deusa Teixeira pela ajuda durante os períodos mais tempestivos e Fernanda Azevedo pela torcida e apoio, Thamires Pontes e Suzane Gonçalves pela torcida e irmandade.

Aos meus familiares, minhas avós Cesarina Santos e Neusa Araujo (*in memoriam*), tios, tias e primos por toda torcida, em especial a Tia Risoneide Martins.

Aos meus irmão de fé, em especial a minha madrinha Geralda Brasilino por seu cuidado, zelo e conselhos.

À Marcia Cardoso e Joaquim Cardoso pelo apoio e incentivo.

Aos amigos que deixei na EEEP Guilherme Teles Gouveia para seguir esse sonho Shirley Batista, Ary Batista, Silvana Modesto, Thiago Jota, Lucimar Leal (*in memoriam*) Daniele Farias, Marcos Deames, Desirré Frota...

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) pelo apoio financeiro por meio do projeto BRS-Aqua.

À todos que direta e indiretamente contribuíram para a chegada desse dia, meu muito obrigada!

“O destino embaralha as cartas, e nós jogamos.”
(SHOPENHAUER, 1892, p.523)

RESUMO

O camarão é um alimento com alto valor nutricional, consumido em diversas partes do mundo. Entretanto, apresenta rápida degradação com surgimento da melanose que leva a rejeição do produto e grandes perdas para a piscicultura. A nanotecnologia tem-se mostrado promissora para o desenvolvimento de carreadores de compostos naturais em alimentos. Diante disto, buscou-se o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado utilizando compostos naturais para a inibição do surgimento da melanose e preservação da qualidade de camarões refrigerados. Neste estudo, nanoemulsões de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum* e goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) (GC) foram produzidas usando técnicas de baixa e alta energia. Os principais constituintes do OE foram determinados por Cromatografia e espectrometria de massas. O diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão, o potencial zeta e a eficiência de encapsulação (EE%) foram utilizados para a avaliação da estabilidade da nanoemulsão durante o armazenamento. A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e Microscopia de Força Atômica (AFM) foram utilizados para a determinação da distribuição de tamanhos das micelas e análise morfológica das mesmas, respectivamente. Métodos computacionais de dinâmica molecular determinaram a interação entre os constituintes do sistema na formação da nanoemulsão. Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) para as espécies patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*. A AFM evidenciou a interação entre a nanoemulsão e a superfície celular de *S. enterica*. A atividade antioxidante foi avaliada contra os radicais ABTS e DPPH. O OE e a nanoemulsão com GC foram utilizados para manter o frescor e qualidade em *Litopenaneus vannamei* armazenados por 16 dias a $4 \pm 0,5$ °C. Os parâmetros avaliados consistiram no aparecimento de melanose, crescimento de bactérias psicotróficas, pH, Nitrogênio das Bases Voláteis Totais (N-BVT) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (SRATB). O OE apresentou o eugenol e o eucaliptol como constituintes majoritários. As nanoemulsões apresentaram diâmetro médio de 108 - 180 nm e EE% de 88,81 - 94,19%. As nanoemulsões apresentaram melhores resultados de CIM e CBM em relação ao OE para *S. aureus* e *E. coli*, contudo, para a *S. enterica* somente a ação bactericida foi potencializada. A ação antioxidante das nanoemulsões também apresentaram melhores resultados em relação ao OE. Observou-se que é possível a utilização de método auto-emulsificação, capaz de manter o teor de OE estável no sistema, melhorando e preservando sua atividade antibacteriana e antioxidante. Os camarões tratados com a nanoemulsão apresentaram maior inibição da melanose do que os tratados com OE e sem tratamento (controle), o pH

apresentou aumento gradativo e sem diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, a análise de bactérias psicotróficas, N-BVT e SRATB, apresentaram melhores resultados para o OE e a nanoemulsão, não diferindo entre si ($p > 0,05$), demonstrando que ambos podem atuar na prevenção da oxidação lipídica, melhorando os parâmetros físico-químicos e proporcionando maior vida útil em relação a camarões *in natura* sem tratamento. Portanto, a nanoemulsão apresenta-se promissora devido ao seu melhor desempenho contra bactérias patogênicas vinculadas ao consumo de pescado, contribuindo para a segurança deste alimento.

Palavras-chave: antioxidante; antibacteriano; patógenos; nanotecnologia.

ABSTRACT

Shrimp is a food with high nutritional value, consumed in different parts of the world. However, it degrades rapidly with the emergence of melanosis, which leads to rejection of the product and great losses for meat production. Nanotechnology has shown promise for the development of carriers of natural compounds in foods. Therefore, we sought to develop a nanostructured system using natural compounds to inhibit the emergence of melanosis and preserve the quality of refrigerated shrimp. In this study, essential oil (EO) nanoemulsions from *Ocimum gratissimum* and cashew gum (*Anacardium occidentale*) (CG) were produced using low and high energy techniques. The main constituents of EO were determined by chromatography and mass spectrometry. The hydrodynamic diameter, polydispersion index, zeta potential and encapsulation efficiency (EE%) were used to evaluate the stability of the nanoemulsion during storage. Nanoparticle tracking analysis (NTA) and Atomic Force Microscopy (AFM) were used to determine the size distribution of micelles and their morphological analysis, respectively. Computational methods of molecular dynamics determined the interaction between the constituents of the system in the formation of the nanoemulsion. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined for the pathogenic species *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. AFM showed the interaction between the nanoemulsion and the cell surface of *S. enterica*. Antioxidant activity was evaluated against ABTS and DPPH radicals. EO and nanoemulsion with CG were used to maintain freshness and quality in *Litopenaeus vannamei* stored for 16 days at 4 ± 0.5 °C. The parameters evaluated consisted of the appearance of melanosis, growth of psychrotrophic bacteria, pH, Total Volatile Base Nitrogen (T-BVN) and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). The EO presented eugenol and eucalyptol as major constituents. The nanoemulsions had an average diameter of 108 - 180 nm and EE% of 88.81 - 94.19%. Nanoemulsions showed better MIC and MBC results compared to EO for *S. aureus* and *E. coli*, however, for *S. enterica* only the bactericidal action was enhanced. The antioxidant action of nanoemulsions also showed better results compared to EO. It was observed that it is possible to use a self-emulsification method, capable of keeping the EO content stable in the system, improving and preserving its antibacterial and antioxidant activity. Shrimp treated with nanoemulsion showed greater inhibition of melanosis than those treated with EO and without treatment (control). The pH showed a gradual increase and no difference ($p > 0.05$) between treatments. The analysis of psychrotrophic bacteria, T-BVN and TBARS, showed better results for EO and nanoemulsion, not differing from each other ($p > 0.05$). This demonstrates that both

can act to prevent lipid oxidation, improving physicochemical parameters and providing longer shelf life in relation to untreated shrimp. Therefore, the nanoemulsion is promising due to its better performance against pathogenic bacteria linked to fish consumption, contributing to the safety of this food.

Keywords: antioxidant; anti-bacterial; pathogens; nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Desenvolvimento da melanose.....	24
Figura 2 –	Fotografia de camarão branco do Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) (A) fresco e (B) armazenado refrigerado (escurecimento do exoesqueleto).....	25
Figura 3 –	O papel principal dos agentes redutores, como os agentes sulfítantes, na inibição do escurecimento enzimático para reduzir os precursores do pigmento (quinonas) a difenóis incolores e menos reativos.....	26
Figura 4 –	<i>Ocimum gratissimum</i>	30
Figura 5 –	(A) Exsudato do cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i>) (B) goma do cajueiro.....	34
Figura 6 –	Fragmento estrutural de goma do cajueiro.....	35
Figura 7 –	Método de Inversão de Fase para formulação de nanoemulsão.....	40
Figura 8 –	Esquema da hidrodestilação do óleo essencial em aparelho tipo Clevenger.....	46
Figura 9 –	Fluxograma de obtenção da goma do cajueiro.....	48
Figura 10 –	Fluxograma da formulação das nanoemulsões.....	49
Figura 11 –	Cromatograma GC-MS do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> . Os números sobre os picos são referentes aos compostos da Tabela 2.....	58
Figura 12 –	Cromatograma GC-FID do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> . Os números sobre os picos são referentes aos compostos da Tabela 3.....	60
Figura 13 –	Espectro de RMN de ¹ H (A) e ¹³ C (B) da goma do cajueiro em D ₂ O.....	61
Figura 14 –	Fotografia das nanoemulsões formuladas.....	62
Figura 15 –	Distribuição granulométrica das nanoemulsões por espalhamento dinâmico de luz (DLS) com 1 e 37 dias de armazenamento. (A) NaGC e (B) NbGC.....	65
Figura 16 –	Distribuição do diâmetro hidrodinâmico do NaGC obtido por medidas de NTA. As amostras foram diluídas na proporção 1/50.000 e analisadas na célula de fluxo a 2 µL/min com a captura de cinco vídeos de 1 min de duração cada.....	66
Figura 17 –	Espectros FTIR das nanoemulsões e seus precursores. Óleo essencial (OE), nanoemulsão formulada com goma do cajueiro e óleo essencial de	

	<i>Ocimum gratissimum</i> pelos métodos de baixa (NaGC) e alta (NbGC) energia, goma do cajueiro (GC).....	67
Figura 18 –	Imagens AFM de NaGC: imagem 3D Height - 15 x 15 µm (A); Imagem de fase 2D - 15 x 15 µm (B); Imagem de fase 2D - 3 x 3 µm (C) e gráfico de distribuição do diâmetro de partícula (D). Imagens com resolução de 512 x 512 pixels.....	69
Figura 19 –	Sistemas simulados por dinâmica molecular; sistemas iniciais (tempo zero) (A) sem e (B) com goma do cajueiro; sistemas finais (C) sem e (D) com goma do cajueiro.....	70
Figura 20 –	Imagens AFM de <i>S. enterica</i> : Controle (bactéria não tratada) - imagem 3D (A); concentração sub-CIM - imagem 3D (B); controle (bactérias não tratadas) - imagem 2D (C); concentração sub-CIM - imagem 2D (D); (E) indica o histograma de rugosidade da superfície da célula bacteriana não tratada e (F) indica o histograma de rugosidade da superfície da célula bacteriana tratada na concentração sub-CIM. Imagens com resolução de 512 x 512 pixels.....	75
Figura 21 –	(A) A pontuação e (B) a evolução da melanose em camarões brancos do Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) tratados com emulsão controle com óleo essencial (<i>Ocimum gratissimum</i>) (ECOIE) e nanoemulsão durante 16 dias de armazenamento a 4 ± 0,5°C.....	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Análise da estabilidade das nanoemulsões durante 37 dias de armazenamento. (A) Diâmetro hidrodinâmico; (B) Índice de polidispersidade; (C) potencial Zeta; (D) Eficiência de encapsulamento....	63
Gráfico 2 –	Gráfico da rugosidade média de <i>S. enterica</i> : não tratada (controle) e tratada com NaGC (SubCIM).....	76
Gráfico 3 –	Gráfico 3 - Atividade antioxidante das nanoemulsões e do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> contra o radical ABTS (%)......	78
Gráfico 4 –	Atividade antioxidante da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> (NaGC) com 1 e 37 dias após a síntese contra o radical ABTS (%)......	78
Gráfico 5 –	Contagem de bactérias psicrotóricas (log UFC/g de músculo) de camarão branco do Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) durante 16 dias de armazenamento a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. As barras representam o desvio padrão.....	83
Gráfico 6 –	Determinação de pH do camarão branco do Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) durante 16 dias de armazenamento a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	85
Gráfico 7 –	Gráfico 7 – Análise do nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT) do camarão branco do Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) durante 16 dias de armazenamento a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	87
Gráfico 8 –	Análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) do camarão branco do Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) durante 16 dias de armazenamento a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nanoemulsões desenvolvidas e seus efeitos na preservação de pescado....	42
Tabela 2 – Composição química do óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> obtido pela extração de plantas do Estado do Piauí e analisado por GC-MS.....	59
Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> do Estado do Ceará e analisado por GC-FID.....	60
Tabela 4 – Valores de CIM e CBM das nanoemulsões e óleo essencial de <i>O. gratissimum</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella entérica</i>	72
Tabela 5 – IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹) e índice de atividade antioxidante frente radical DPPH.....	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVO	21
2.1	Geral	21
2.2	Específicos	21
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
3.1	Carcinicultura	22
3.1.1	<i>Melanose</i>	23
3.2	Óleos Essenciais	28
3.2.1	<i>Ocimum gratissimum</i>	29
3.3	Goma do Cajueiro	37
3.4	Nanotecnologia	32
3.4.1	<i>Nanoemulsão</i>	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Materiais	45
4.2	Obtenção do óleo essencial	45
4.3	Caracterização do óleo essencial	46
4.3.1	<i>Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS)</i>	46
4.3.2	<i>Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (GC-FID)</i>	47
4.4	Obtenção da Goma do Cajueiro (GC)	47
4.4.1	<i>Caracterização da GC por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	47
4.5	Formulação da nanoemulsão	48
4.6	Caracterização das nanoemulsões	51
4.6.1	<i>Determinação Diâmetro, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta</i>	49
4.6.2	<i>Eficiência de incorporação do óleo na nanoemulsão</i>	49
4.6.3	<i>Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)</i>	50
4.6.4	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	51
4.6.5	<i>Microscopia de Força Atômica</i>	51
4.7	Estudo computacional	51
4.8	Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos	52
4.9	Avaliação da atividade antioxidante	53
4.9.1	<i>ABTS</i>	53
4.9.2	<i>DPPH</i>	53

4.10	Preparo dos tratamento nos camarões	54
4.11	Avaliação da Melanose	54
4.12	Análise microbiológica	55
4.13	Análises físico-químicas dos camarões	55
4.13.1	<i>Determinação do pH</i>	56
4.13.2	<i>Análise do nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)</i>	56
4.13.3	<i>Análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)</i>	56
4.14	Análises estatísticas	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	Análise do óleo essencial	58
5.2	Caracterização da Goma do Cajueiro (GC)	61
5.3	Caracterização das nanoemulsões	62
5.3.1	<i>Estabilidade temporal: diametro hidrodinâmico, indice de polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulamento</i>	62
5.3.2	<i>Análise de Infravermelho (FTIR)</i>	67
5.3.3	<i>Morfologia das micelas da nanoemulsão</i>	68
5.4	Estudo computacional	70
5.5	Atividade antibacteriana	71
5.6	Atividade antioxidante	77
5.7	Avaliação da melanose	80
5.8	Análise microbiológica dos camarões	82
5.9	Análises físico-químicas dos camarões	85
5.9.1	<i>pH</i>	85
5.9.2	<i>Nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)</i>	87
5.9.3	<i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)</i>	89
6	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO	114

1 INTRODUÇÃO

A demanda global por alimentos seguros e saudáveis com redução no uso de conservantes sintéticos está aumentando continuamente. Com a crescente conscientização e conhecimento do consumidor, novas tecnologias na produção e processamento de alimentos que apresentem menor impacto negativo no valor nutricional e na qualidade geral dos alimentos têm atraído muita atenção (GUO *et al.*, 2020; LIAO *et al.*, 2021). Os dois fatores mais importantes que afetam a aceitação dos alimentos pelos consumidores são a qualidade e a segurança. A qualidade inclui características organolépticas como aparência, odor, sabor e textura. A aparência é a primeira característica que os consumidores observam em seu julgamento de qualidade (SHARIFIMEHR; SOLTANIZADEH; HOSSEIN GOLI, 2019). A segurança está relacionada, principalmente, ao controle de patógenos de origem alimentar (RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2017).

O pescado atrai cada vez mais a atenção dos consumidores por causa do seu valor nutritivo (proteínas e ácidos graxos de cadeia longa) (SHARIFIMEHR; SOLTANIZADEH; HOSSEIN GOLI, 2019). Os crustáceos, incluindo camarão, caranguejo e lagosta, estão entre os pescados mais comercializados, amplamente consumidos em todo o mundo devido ao seu valor nutritivo e sabor suave (SAE-LEAW; BENJAKUL, 2019). Entretanto, os crustáceos estão sujeitos ao aparecimento de melanose ou manchas escuras, que em camarões ocorre de forma rápida, e envolve perdas econômicas importantes para a indústria pesqueira. O aprimoramento dos métodos de controle deste escurecimento é uma chave importante para aumentar o valor do produto e minimizar as perdas pós-colheita, pois, seu aparecimento reduz drasticamente seu valor de mercado e sua aceitabilidade pelo consumidor (NIRMAL *et al.*, 2015; SHIEKH; BENJAKUL; SAE-LEAW, 2019).

Para evitar a melanose, atualmente, o inibidor mais empregado após a despesca do camarão é o metabissulfito de sódio, apesar de sua natureza prejudicial à saúde humana e baixa efetividade (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016; ANDRADE; LACERDA; VENTURA, 2015). Portanto, oferecer um camarão seguro e de alta qualidade, combinados ao desejo dos consumidores por produtos naturais isentos de conservantes químicos, representa um desafio tecnológico e, portanto, o desenvolvimento de novas ferramentas mais eficazes (HASSOUN; ÇOBAN, 2017).

O manjeriço cravo (*Ocimum gratissimum* L.) é uma erva perene e aromática, pertencente à família Lamiaceae, cujo óleo essencial é uma fonte rica de eugenol. Planta utilizada na preparação de chás e infusões e utilizada na medicina tradicional para tratar diversas

enfermidades, além de seu uso em alimentos (IBRAHIM *et al.*, 2020; KUMAR; LAL, 2021). Sabe-se que os óleos essenciais (OEs) vegetais atuam como aditivos naturais, como agentes antimicrobianos e antioxidantes (PATEL; GHOSH, 2020). Entretanto, os OEs podem apresentar baixa estabilidade e solubilidade, perda de atividade antioxidante, sabor e odor desagradáveis e são geralmente instáveis e facilmente degradáveis sob condições comuns de processamento e armazenamento. Investigações recentes indicaram que o processo de encapsulamento pode ajudar a superar tais limitações (SMAOUI *et al.*, 2021). Nanopartículas feitas de ingredientes de baixo custo com grau alimentício, seguindo um protocolo de fácil preparo e aplicações são possíveis para o uso em indústria de alimentos (LUO; WANG; ZHANG, 2020).

Os biopolímeros como polissacarídeos têm sido amplamente utilizados como materiais carreadores para proteger óleos essenciais de fatores ambientais e fisiológicos durante o encapsulamento (NAGARAJU *et al.*, 2021). A goma do cajueiro (GC), é um biopolímero obtido do exsudato de *Anacardium occidentale* Linn, planta de considerável valor econômico e medicinal (SILVA *et al.*, 2018). GC foi citada como uma possível alternativa para substituir a goma arábica na indústria alimentícia (PORTO; CRISTIANINI, 2014), por ser de fácil acesso e menor custo, além de apresentar diversos elementos físico-químicos importantes e com propriedades semelhantes à goma arábica (NAYAK *et al.*, 2019).

O camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) é uma das espécies mais cultivada no mundo. Originalmente capturados no Oceano Pacífico, mas agora cultivados comercialmente como um recurso economicamente importante nos países asiáticos e na América do Sul. Tanto os produtos refrigerados, como os congelados, são exportados para os principais mercados globais (Estados Unidos da América, União Europeia e Japão) (KIMBUATHONG; LEELAPHIWAT; HARNKARNSUJARIT, 2020).

Diante disto, a fim de evitar perdas econômicas em um produto comercial, como o camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Avaliou-se a atividade antibacteriana e antioxidante da goma do cajueiro e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e sua capacidade de formar uma nanoemulsão com menor tamanho de partícula, alta eficiência de encapsulamento, com estabilidade durante o armazenamento refrigerado e com maior atividade *in vitro*, com potencial utilização preservação de alimentos. A avaliação da nanoemulsão formulada na conservação e inibição da melanose em *L. vannamei* armazenados a $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 16 dias, foi verificada através dos parâmetros microbiológico e físico-químicos.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antioxidante da goma do cajueiro e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e sua capacidade de formar uma nanoemulsão, com potencial utilização na conservação e inibição da melanose em *Litopenaeus vannamei* armazenados refrigerados a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

2.2 Específicos

- Caracterizar o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e avaliar sua composição em termos de compostos antibacteriano e antioxidante;
- Isolar e avaliar a composição da goma obtida do exsudato do cajueiro (*Anacardium occidentale*);
- Desenvolver uma nanoemulsão com o óleo essencial e a goma do cajueiro com estabilidade durante o armazenamento refrigerado;
- Verificar a atividade antibacteriana e antioxidante da nanoemulsão;
- Determinar a morfologia da nanoemulsão desenvolvida;
- Avaliar como ocorre a interação química dos compostos na formação da nanoemulsão;
- Avaliar a ação da nanoemulsão na conservação e inibição da melanose em camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) armazenados por 16 dias a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Carcinicultura

A produção da aquicultura mundial em 2018 foi de 82,1 milhões de toneladas, sendo que os crustáceos correspondem com 9,38 milhões de toneladas. Dentre as espécies de crustáceos cultivadas, o *Litopenaeus vannamei* conhecido como camarão branco do Pacífico ou camarão perna branca, representa a maior produção em espécies de crustáceos, correspondendo a 52,9% da produção total, pouco mais da metade, com 4.966,2 mil toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2020). O camarão de perna branca é nativo da costa do Pacífico oriental de Sonora, México no norte, através da América Central e do Sul até o sul de Tumbes no Peru, vivendo em habitats marinhos tropicais. Os principais países produtores são China, Tailândia, Indonésia, Brasil, Equador, México, Venezuela, Honduras, Guatemala, Nicarágua, Belize, Vietnã, Malásia, Taiwan PC, Pacífico Ilhas, Peru, Colômbia, Costa Rica, Panamá, El Salvador, Estados Unidos da América, Índia, Filipinas, Camboja, Suriname, São Cristóvão, Jamaica, Cuba, República Dominicana, Bahamas (FAO, 2021).

A carcinicultura brasileira é liderada pela Região Nordeste, em 2020 a produção aumentou 14,1% em relação ao ano anterior, totalizando 62,9 mil toneladas de camarão, o que corresponde 99,6% do total nacional. Os destaques couberam aos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará, com 34,8% e 33,2% do volume total produzido, respectivamente (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2020). Praticamente toda a produção nordestina de camarão cultivado é comercializada na forma *in natura* no mercado interno. Um pequeno grupo de empresas de maior porte comercializa o produto com marca própria, diretamente para supermercados e restaurantes. A produção de camarão dos pequenos e médios produtores é comercializada *in natura* para intermediários que vendem o produto nos grandes centros urbanos do País (XIMENES, 2021). Toda via, os camarões devem enquadrar-se nas características sensoriais determinadas pela Instrução Normativa nº 23/2019 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA que são aplicáveis ao camarão cru fresco e resfriado e, no que couber, ao camarão congelado os quais devem caracterizar-se como aspecto geral brilhante e úmido, corpo em curvatura natural, rígida, artículos firmes e resistentes, carapaça bem aderente ao corpo, coloração própria da espécie, sem qualquer pigmentação estranha, olhos vivos, proeminentes e ausência de odor amoniacal, sulfídrico, ranço ou indicativo de putrefação (BRASIL, 2019a).

Os camarões também devem atender aos padrões microbiológicos para patógenos que causam doenças transmitidas por alimentos (DTAs), as quais são geralmente de natureza infecciosa ou tóxica e causadas por bactérias, vírus ou parasitas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2020). As bactérias patogênicas comuns que levam a intoxicação alimentar bacteriana são *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella*, *Vibrio* e *Staphylococcus aureus* (JU *et al.*, 2019). *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* enterohemorrágica estão entre os patógenos alimentares mais comuns que afetam milhões de pessoas anualmente, às vezes com resultados graves e fatais (OMS, 2020). No Brasil a Instrução Normativa da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA nº 60/2019 determina o limite de bactérias patogênicas vinculadas a sua comercialização de camarões frescos, resfriados ou congelados que devem ser: ausência para *Salmonella* spp., 10^3 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva e para a *Escherichia coli* de até 10^2 UFC/g se o camarão que for consumido cru ou 5×10^2 UFC/g para o camarão não consumido cru (BRASIL, 2019b).

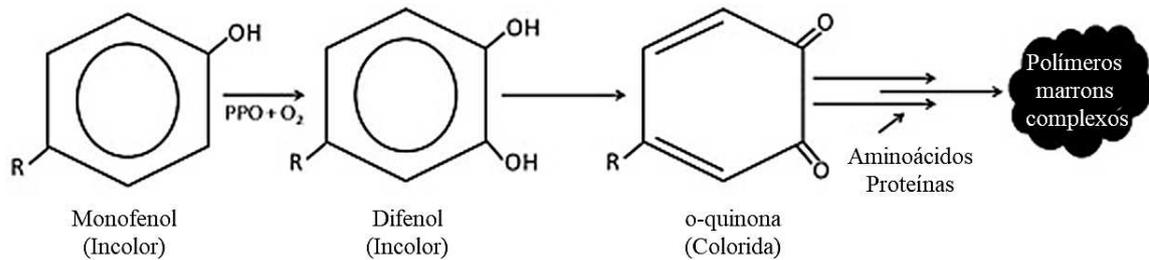
3.1.1 Melanose

O camarão proporciona inúmeros benefícios à saúde dos consumidores, por tratar-se de um produto aquático com alto teor de proteína, além de ser considerado um alimento delicioso e requintado (LI; YANG; LI, 2016; SHARIFIAN *et al.*, 2019). Como todos os produtos pesqueiros, o camarão é altamente suscetível à deterioração, devido ao seu alto teor de água e componentes nutricionais. O processo de deterioração começa imediatamente após o abate, fator agravado pela possibilidade de oxidação de compostos do tipo amino-fenol, provocando a melanose ou “black spot”, pela formação de melanina (SIRENO *et al.*, 2010; WU, 2014). A melanose ocorre de forma natural, os pigmentos escuros ocorrem principalmente na região do cefalotórax e articulações, causada pela oxidação enzimática de compostos fenólicos. Apesar de parecer inofensiva para os consumidores e não está diretamente associada à deterioração microbiana, a melanose é um dos problemas mais sérios em crustáceos, pois afeta suas características sensoriais, causando impacto na sua aceitação pelo consumidor, reduzindo sua vida útil e sua qualidade, o que reduz drasticamente seu valor de mercado, levando a prejuízos econômicos (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016; SAE-LEAW; BENJAKUL, 2019).

A biossíntese da melanina ou melanose, ocorre através de uma reação enzimática oxidativa da tirosina, presente na hemolinfa e na carapaça do camarão (VALENÇA; MENDES, 2004). A Figura 1 ilustra o desenvolvimento da melanose, a reação é iniciada pela enzima

polifenoloxidase (PPO), a qual ocorre naturalmente nos crustáceos. Na presença de oxigênio, ocorre a hidroxilação de um monofenol em o-difenol, seguida por uma oxidação em o-quinona. Eles podem polimerizar espontaneamente para formar compostos de alto peso molecular ou pigmentos marrons (melanina), ou reagir com aminoácidos e proteínas que aumentam a cor marrom produzida (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 1997; GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016).

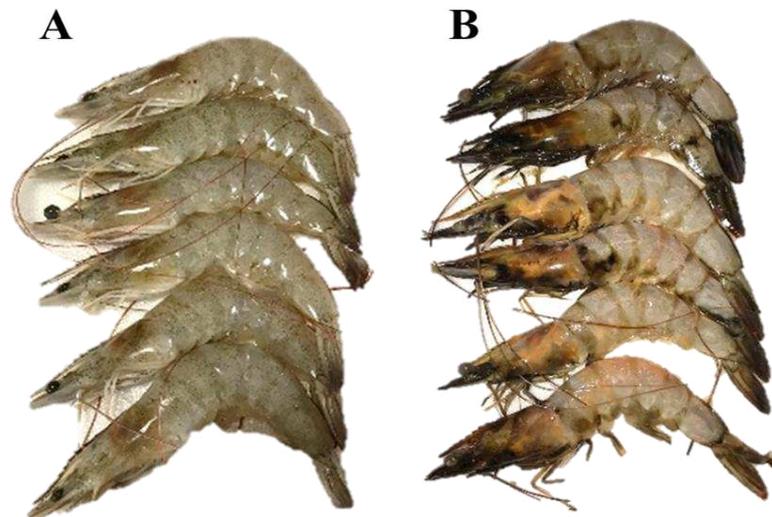
Figura 1 – Desenvolvimento da melanose



Fonte: Gonçalves e Oliveira (2016, com adaptações).

A melanose na superfície dos crustáceos eventualmente se expande da casca em direção ao músculo. Por causa da intensa irrigação do cefalotórax, é aqui que a PPO é mais comumente encontrada. A retirada do cefalotórax minimiza os problemas relacionados com a melanose, uma vez que a maior concentração da enzima está presente nesta porção. Porém, a maior parte do camarão cultivado, após a despesca, é comercializado inteiro. Além disso, a refrigeração (com ou sem gelo) em baixa temperatura não previne ou interrompe completamente a reação de melanose indesejável, porque a PPO permanece ativa sob esta condição (Figura 2). Durante o congelamento, a PPO em crustáceos torna-se inativa. Ativando-se novamente nos produtos descongelados. Portanto, a melanose pode ser um indicador da falta de boas práticas de manuseio e armazenamento, o que também pode estar relacionado ao crescimento microbiano. Para prevenir este fenômeno, tanto quanto possível, uma variedade de compostos têm sido usados para atuar como inibidores (MONTERO; LOPEZ-CABALLERO; PEREZ-MATEOS, 2001; ANDRADE; LACERDA; VENTURA, 2015; SAELEAW; BENJAKUL, 2019).

Figura 2 – Fotografia de camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (A) fresco e (B) armazenado refrigerado (escurecimento do exoesqueleto)



Fonte: elaborada pelo autor.

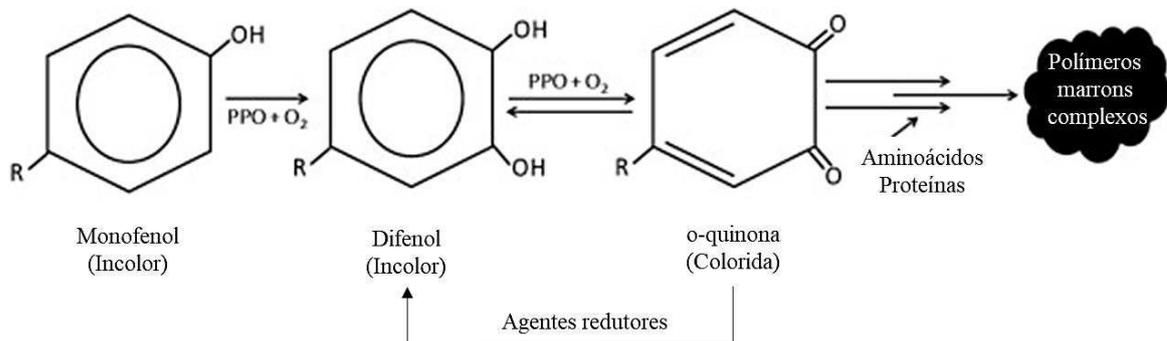
De acordo com a Instrução Normativa nº 23/2019 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2019a), os lotes de camarões são considerados defeituosos quando há alterações evidentes na coloração própria da espécie, que afetem mais de 10% da área superficial do indivíduo e que afetem mais de 25% da unidade amostral. Pode-se observar o impacto econômico das reações de escurecimento em produtos importados e exportados para países de todo o mundo, pois sua ocorrência é considerada um processo de deterioração que deve ser controlado e/ou eliminado (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016).

Para evitar grandes perdas econômicas, diferentes métodos de preservação são utilizados e estudados para inibir a melanose (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016). Portanto, a aplicação de métodos conservantes é uma etapa crucial para estender o prazo de validade e manter sua qualidade e segurança, retardando as alterações microbianas, químicas e físicas durante o armazenamento (REZAEI *et al.*, 2021).

Para estender a vida útil de camarões ou crustáceos, inibidores de melanose têm sido usados. Os produtos químicos mais amplamente usados na prevenção do escurecimento enzimático são agentes redutores, como agente sulfitante, ácido ascórbico, cisteína e glutatona. Os sulfitos e seus derivados são amplamente utilizados como inibidores de PPO, atuam evitando a polimerização das quinonas, combinando-se irreversivelmente com elas e formando compostos incolores, ou mesmo reduzindo *o*-quinonas a difenóis incolores (Figura 3) (MONTERO; LOPEZ-CABALLERO; PEREZ-MATEOS, 2001; NIRMAL; BENJAKUL, 2009; NIRMAL *et al.*, 2015; GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016). Os agentes sulfitantes são

adicionados aos alimentos para muitas finalidades técnicas importantes, incluindo o controle do escurecimento enzimático e não enzimático, ação antimicrobiana, ação antioxidantes e agentes redutores, uso de agente branqueador e uma variedade de usos de auxiliar de processamento (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986).

Figura 3 - O papel principal dos agentes redutores, como os agentes sulfitantes, na inibição do escurecimento enzimático para reduzir os precursores do pigmento (quinonas) a difenóis incolores e menos reativos



Fonte: Gonçalves e Oliveira (2016, com adaptações).

Muitos indivíduos são sensíveis aos aditivos de sulfito e podem apresentar uma série de reações, incluindo efeitos dermatológicos, gastrointestinais e respiratórios. É importante notar que vários indivíduos experimentam uma série de sintomas após a exposição aos sulfitos; assim, as reações cutâneas, intestinais e respiratórias podem ocorrer simultaneamente e combinados, em diferentes níveis de gravidades, podendo ser fatais (VALLY; MISSO, 2012). Nas fazendas de camarão, o procedimento usual é a imersão dos camarões despescados, em água com gelo contendo metabissulfito de sódio, para provocar uma morte rápida e inibir o processo da melanose. Entretanto, o metabissulfito de sódio em contato com ácidos, água e/ou gelo libera o gás dióxido de enxofre (SO_2), corrosivo, e que pode ser mortal se inalado. Podendo causar reações alérgicas severas em pessoas asmáticas ou sensíveis a sulfitos (VALENÇA; MENDES, 2004). A Resolução n° 329/2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2019c), estabelece o padrão para o uso de conservante de sulfitos, como o metabissulfito de sódio, através da quantificação de dióxido de enxofre residual (SO_2), sendo o limite máximo permitido de 0,01 g a cada 100 g de sulfito, somente para crustáceos, exclusivamente na matéria-prima após a captura.

O 4-hexilresorcinol (4-HR) é utilizado para aliviar a melanose, embora seja uma boa alternativa (não apresenta danos comprovados ao bem-estar de pescadores e consumidores e tem demonstrado eficácia como agente antimelanósico), pode causar alterações sensoriais

desagradáveis ao produto, e ainda tem o custo elevado, apesar de sua segurança (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016; SAE-LEAW; BENJAKUL, 2019). O uso de compostos sintéticos na preservação de alimentos e aplicações de segurança alimentar tem levantado preocupações do consumidor devido aos efeitos adversos à saúde percebidos, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana e poluição ambiental (MCCLEMENTS *et al.*, 2021). Há uma preocupação crescente com os riscos potenciais carcinogênicos e mutagênicos associados aos conservantes químicos, sendo exigidos alimentos “mais frescos”, “mais naturais” e “minimamente processados” (LIAO *et al.*, 2021).

Para superar a melanose em crustáceos, compostos novos e seguros, especialmente de fontes seguras e naturais, têm sido usados na busca por técnicas viáveis, inócuas e eficazes para prevenir ou inibir a formação da melanose, visando a necessidade da produção de crustáceos com maior vida útil e de maior qualidade, com foco nas tendências do mercado e investindo em produtos saudáveis, livres de aditivos químicos perigosos (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016; SAE-LEAW; BENJAKUL, 2019).

O uso de compostos fenólicos de extrato vegetal parece ser uma alternativa natural aos sulfitos convencionais para prevenção da formação de melanose. A ação inibitória do PPO do composto fenólico é devida à sua atividade quelante de metais e semelhança estrutural com o substrato (NIRMAL *et al.*, 2015). A eficácia desses agentes depende de sua capacidade de prevenir a oxidação, portanto, eles devem ter atividade eliminadora de radicais livres e propriedades quelantes de íons metálicos (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016). O uso de agentes antimelanose em crustáceos é limitado por muitas considerações relevantes à segurança, salubridade, custo e seus efeitos nas propriedades organolépticas, como sabor, sabor e textura (SAE-LEAW; BENJAKUL, 2019).

Neste sentido, compostos seguros de origem natural, como revestimento de quitosana combinada com extrato de chá verde (YUAN *et al.*, 2016), extrato da alga *Porphyra yezoensis* (LI; YANG; LI, 2016), extrato da casca da laranja (VAKILI; YASINI ARDAKANI, 2018), catequina e seus derivados isolados, epicatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina e galato de epigallocatequina (SAE-LEAW; BENJAKUL; SIMPSON, 2017), goma de semente de *Lepidium sativum* contendo carvacrol (KARAMKHANI; ANVAR; ATAEE, 2018), alginato e quitosana com extrato de semente de toranja (KIM; HONG; OH, 2018), florotaninos de algas pardas (SHARIFIAN *et al.*, 2019), aloe vera e eugenol (SHARIFIMEHR; SOLTANIZADEH; HOSSEIN GOLI, 2019) extrato de semente de manga (BADEE *et al.*, 2020), extrato da alga *Sargassum horneri* (FANG *et al.*, 2021), extratos de casca de limão (*Citrus limon*) e pomelo (*Citrus maxima*) (PANDIYAN; SONI; ELUMALAI,

2021), alginato com extrato de semente de toranja (BAEK; LEE; OH, 2021), têm sido propostos como substitutos de agentes sulfitantes.

A abundância de matérias-primas devido ao crescimento exuberante das plantas e sua natureza renovável faz com que o uso de óleos essenciais sejam econômicos para aplicação prática (PRAKASH *et al.*, 2012). Comparados com outros tipos de conservantes de alimentos, os óleos essenciais chamam atenção porque atendem à atual tendência de desenvolvimento de aditivos alimentares sobre "verde", "segurança" e "saúde"(JU *et al.*, 2019).

3.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são misturas líquidas complexas de compostos voláteis, aromáticos, altamente lipofílicos e sujeitos à degradação oxidativa e fototérmica. São biossintetizados como metabolitos secundários por organismos vivos, predominantemente plantas aromáticas. Quimicamente, os OEs são compostos de aldeídos, monoterpenos, sesquiterpenos, flavonóides, isoflavonas, carotenóides, alcalóides e ácidos fenólicos, podendo ser obtidos das sementes, frutas, cascas de frutas, flores, raízes, rizomas, botões, galhos, folhas, madeira, casca e resinas (PAUL; HMAR; ZOTHANTLUANGA *et al.*, 2020; SRIVASTAVA; FATIMA, 2021; ANIS; PAL; AL- ZHRANI, 2021). Entretanto, dentro da mesma planta, há variações nas composições e rendimentos de óleos essenciais obtidos de diferentes partes (DUNG *et al.*, 2021).

As principais famílias de plantas das quais os OEs são extraídos incluem Asteraceae, Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae e Zingiberaceae, as famílias de plantas angiospermas dicotiledôneas. São metabólitos secundários produzidos no citoplasma e plastídios de células vegetais e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidêmicas ou tricomas glandulares (SRIVASTAVA; FATIMA, 2021).

Os OEs são geralmente extraídos por processos de destilação a vapor, extração em fase sólida, prensagem a frio, extração por solvente, extração com fluido supercrítico, hidrodestilação ou destilação-extração simultânea (PAUL; HMAR; ZOTHANTLUANGA, 2020). A hidrodestilação tornou-se o método padrão de extração de OE de material vegetal, o qual é frequentemente usado para isolar produtos naturais não solúveis em água com alto ponto de ebulição (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). Além de ser um método simples, traz inúmeras vantagens, incluindo facilidade de controle de parâmetros, reduzido tempo de produção e custos mais baixos (DUNG *et al.*, 2021). O processo envolve a imersão completa de materiais vegetais em água, seguida de fervura. Este método protege os óleos extraídos até

um certo grau, pois a água ao redor atua como uma barreira para impedir o superaquecimento. O vapor e o vapor do óleo essencial são condensados originando duas frações líquidas: uma aquosa (hidrolato ou hidrossol) e a fase orgânica (óleo essencial) (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Os OEs são muito utilizados pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (DUNG *et al.*, 2021). A indústria alimentícia usa principalmente óleos essenciais como aromatizantes; eles representam uma fonte interessante de antimicrobianos naturais para preservação de alimentos (SRIVASTAVA; FATIMA, 2021). Quando aplicados aos alimentos, os OEs podem desempenhar funções antimicrobianas, antioxidantes ou aromatizantes (RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais apresentam alto potencial para serem utilizados como agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais (FALLEH *et al.*, 2020). A exploração dessas misturas bioativas, fornecendo evidências científicas adequadas, como o óleo essencial de folha de laranja (ALPARSLAN *et al.*, 2016), óleos essenciais de canela, limão e alho (NOORDINI *et al.*, 2018) e óleo de alho (NOORDIN *et al.*, 2021), contribuindo para aumentar as chances de desenvolver agentes conservantes de alimentos potentes, ecológicos e mais seguros que possam ser boas alternativas aos produtos químicos sintéticos (FALLEH *et al.*, 2020).

3.2.1 *Ocimum gratissimum*

A planta *Ocimum gratissimum* nativa do Sri Lanka, Índia, Irã, África e Madagascar é naturalizada em todo o mundo, por possuir uma vasta amplitude ecológica, podendo adaptar-se a climas tropicais quentes e úmidos, bem como regiões subtropicais (AKBAR, 2020; DUNG *et al.*, 2021). No Brasil, a planta também é chamada de “alfavaca”, “manjerição cravo”, “alfavaca-branco” ou “quioiô”. A altura da planta pode variar de 0,5 a 1,5 m, em altitudes acima de 1.000 m a planta apresenta o crescimento lento. As folhas são denteadas (Figura 4), opostas, inteiras, pecioladas e de cor verde, as flores são pequenas, dispostas em numerosas inflorescências eretas, geralmente em grupo de três e se aglomeram no ápice, o fruto ou semente resulta em sementes muito pequenas, esféricas e de cor preta (CRUZ; BEZERRA, 2017; DUNG *et al.*, 2021).

Figura 4 – *Ocimum gratissimum*

Fonte: elaborada pelo autor.

A análise fitoquímica nas folhas frescas e secas da planta revelou a presença de terpenos, flavonóides, taninos, alcalóides, esteróides, proteínas, carboidratos, gorduras e óleos com as amostras secas apresentando concentrações mais elevadas (NJOKU *et al.*, 2011). Além de minerais como Cálcio, Cloreto, Manganês, Magnésio, Zinco e Potássio (MBEGBU; NWAJINKA; AMAEFULE, 2021).

Várias espécies e variedades de plantas do gênero *Ocimum* produzem óleos de natureza diversa, comumente conhecidos como óleos basilicos (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006). Entretanto, a composição química (quimiotipo) e a atividade biológica dos óleos essenciais destilados de plantas pertencentes à mesma espécie podem variar significativamente, dependendo de fatores intrínsecos relacionados à planta e interação com o ambiente (tipo de solo e clima, etc.) e maturidade da planta, época e horário da colheita e fatores extrínsecos relacionados ao método de extração e ao meio ambiente (DHIFI *et al.*, 2016; OLIVEIRA BARBOSA *et al.*, 2021). Apesar de poderem conter entre 20 e 60 componentes em concentrações bastante diferentes, os OEs são geralmente caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações razoavelmente altas (20-70%) em comparação a outros componentes secundários presentes em quantidades vestigiais (ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2016).

O óleo essencial extraído de *O. gratissimum* pode apresentar diferentes quimiotipos que são classificados de acordo com seu componente principal, como o timol, geraniol, eugenol, 1,8-cineol e cinamato de metila (VIEIRA; SIMON, 2000; PRAKASH *et al.*, 2011; BRUM *et*

al., 2017; JOSHI, 2021). Uma vez que os OEs são extraídos de fontes naturais, e muitos dos quais, geralmente são seguros para consumo humano. Por esse motivo, muitos dos OEs foram classificados como Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS) pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos (US-FDA).

O. gratissimum é uma planta muito importante na Nigéria, especialmente na parte sudeste do país, seus extratos são usados como uma cura para a malária, febre, inflamação, gota e outros sintomas (IBRAHIM *et al.*, 2020). Chás e infusões são utilizados para o tratamento de infecções fúngicas, febre, resfriado e tosse (KUMAR; LAL, 2021). No Nordeste do Brasil as folhas são utilizadas popularmente para tratamento estomacal, digestivo, purgativo, expectorante e emenagogo, usado como decocção ou xarope (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007), além de ser usado para tratamento de gripe, tosse, coceira, calmante, estresse, dor de cabeça e fadiga (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Na comunidade de Inhamã em Pernambuco, no estudo etnobotânico, a espécie alcançou o valor máximo de importância relativa entre as espécies citadas como medicinais para tratamentos de transtornos dos sistemas respiratório, digestório e nervoso (RODRIGUES; ANDRADE, 2014). Sendo é amplamente utilizada como condimento (NJOKU *et al.*, 2011). Além disso o OE de *O. gratissimum* apresentou estabilidade em termos de alterações químicas durante o armazenamento a -20°C (LISBOA *et al.*, 2020).

A *Ocimum gratissimum* por ser uma planta de uso etno medicamentosa em diversos países, possui suas diversas aplicações empíricas apoiadas em investigações científicas. Pesquisas acerca do seu óleo essencial comprovaram sua atividade antifúngica contra as espécies de fungo *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* que são considerados na deterioração dos alimentos e produtores de micotoxinas (NGUEFACK *et al.*, 2004). Também contra diversas espécies de *Candida* (NAKAMURA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2016), *Cryptococcus neoformans* (LEMOS *et al.*, 2005), *Fusarium verticillioides* (DAMBOLENA *et al.*, 2010), além de apresentar atividade contra isolados de fungos de algumas especiarias e apresentando melhor eficácia como fungitoxicante do que o predominate fungicida Wettasul-80 (PRAKASH *et al.*, 2011) e contra fungos isolados de peixes defumados (ATREVVY *et al.*, 2020).

Além disso, sua atividade antibacteriana foi comprovada contra as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri* relacionadas a gastroenterites (CHIMNOI *et al.*, 2018). Apresentando atividade antioxidante (DAMBOLENA *et al.*, 2010; PRAKASH *et al.*, 2011; HZOUNDA *et al.*, 2016;

VASCONCELOS *et al.*, 2021) e baixa toxicidade para glóbulos vermelhos humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

O óleo essencial de *O. gratissimum* apresenta um papel proeminente no desenvolvimento de um aditivo alimentar ideal à base de plantas, sendo proposto na preservação do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) atuando como biopreservativo na perspectiva de reduzir as perdas pós-colheita (HOUINSOU *et al.*, 2012). Quando incorporado a revestimento comestível de *Manihot esculenta* aumentou a vida útil de mangas (*Mangifera indica*) em até 18 e 27 dias de armazenamento em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e baixa temperatura ($4 \pm 2^\circ\text{C}$), respectivamente (NYANGENA; WANGILA; CHERUTOI, 2021). Sua utilização também é proposta como aromatizante de iogurte (IBRAHIM *et al.*, 2020).

O OE *O. gratissimum* foi eficiente na preservação da qualidade da cavala (*Scomber scombrus*) diminuindo o nível de bactérias psicrotróficas, enterobacterias, bases voláteis totais e produtos de oxidação lipídica durante a estocagem por um mês a -18°C (NDASI *et al.*, 2021). O OE em questão e a mesma espécie de peixe, mas em filés, mostrou que sua aplicação prolongou em 3-5 dias a vida útil dos filés armazenados a 2°C por até 15 dias (KAROUI; HASSOUN, 2017). Na conservação de peixe defumando o OE de *O. gratissimum* prolongou substancialmente a vida útil em 10 dias, contudo, os resultados indicam que apesar das atividades bioativas e protetoras pronunciadas destes OEs, a bioproteção proporcionada foi diminuída gradativamente. Esta diminuição da atividade deve-se ao efeito da persistência dos óleos essenciais que são substâncias muito voláteis e a sua exposição provoca a partida gradual de moléculas voláteis que se misturam com o ar (DEGNON *et al.*, 2013).

Liao *et al.* (2021) afirmam que apesar da excelente eficácia dos OEs, eles não têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos devido a algumas barreiras intrínsecas importantes, como baixa solubilidade em água, biodisponibilidade, volatilidade e estabilidade em sistemas alimentares. Avanços recentes em nanotecnologia têm o potencial de abordar essas barreiras existentes, a fim de usar OE como conservantes em sistemas alimentares em baixas doses.

3.3 Goma do Cajueiro

O cajueiro (*Anacardium occidentale*), membro da família Anacardiaceae, possui uma considerável capacidade adaptativa a solos de baixa fertilidade, a temperaturas elevadas e ao estresse hídrico, é uma árvore rústica que pode crescer até 3,6 metros de altura, com arquitetura de copa tortuosa e de diferentes portes e pode ser facilmente encontrada em países

tropicais, no Brasil é principalmente encontrada nas regiões Norte e Nordeste como Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (CUNHA; SILVA, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2016; SERRANO; PESSOA, 2017; SILVA *et al.*, 2018). Devido a essas características, o cajueiro se tornou uma importante fonte de renda para os estados do Nordeste, principalmente para aqueles que possuem regiões semiáridas. Ademais, por produzir em pleno período seco, na entressafra das culturas anuais, o cajueiro se torna importante para a geração de empregos tanto no campo quanto nas indústrias. Dada a importância econômica desta cultura no Nordeste brasileiro no ano de 2021 a área cultivada da planta foi de 428.311 hectares (SERRANO; PESSOA, 2017; CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2021).

Para a comercialização, Carneiro da Cunha *et al.* (2020) afirmam que o principal produto do cajueiro é a amêndoa da castanha-de-caju, localizada no interior da castanha, entretanto, praticamente todas as partes da planta podem ser aproveitadas, da castanha também pode ser extraída a película que reveste a amêndoa, rica em taninos utilizados na indústria química de tintas e vernizes. Já o pedúnculo do caju (pseudofruto) é processado por indústrias para a obtenção do suco ou da polpa congelada, a ser utilizada na fabricação de sucos, cajuínas e outras bebidas, na fabricação de doces e na alimentação animal, além disso, o caju inteiro (pedúnculo com castanha) é comercializado in natura em feiras e supermercados. Outras partes dessa planta também são utilizadas, as cascas das árvores e as folhas, são fontes de tanino e sua goma é de interesse biotecnológico. A goma do cajueiro (GC) é um coproduto do agronegócio do caju com potencial de aplicação industrial; entretanto, ainda não é explorada sob o ponto de vista comercial (PORTO; FURTADO; CRISTIANINI, 2017).

A goma do cajueiro é obtida do exsudato da planta que pode ocorrer no tronco ou em seus ramos. Sob certas condições (agressão de microrganismos, ataque químico ou físico), a casca do cajueiro exsuda um material viscoso, o exsudado fresco é geralmente de cor leitosa, mas em contato com o ar, a cor muda para marrom claro ou escuro (Figura 5), também conhecida como resina, de consistência dura, regularmente solúvel em água e insolúvel no álcool e nos demais solventes orgânicos (PAULA PESSOA; BANDEIRA, 1993; ZAKARIA; RAHMAN; MAHMOOD, 1997; OKOYE; ONYEKWELI; FATOKI, 2012).

Figura 5- (A) Exsudato do cajueiro (*Anacardium occidentale*)
(B) goma do cajueiro



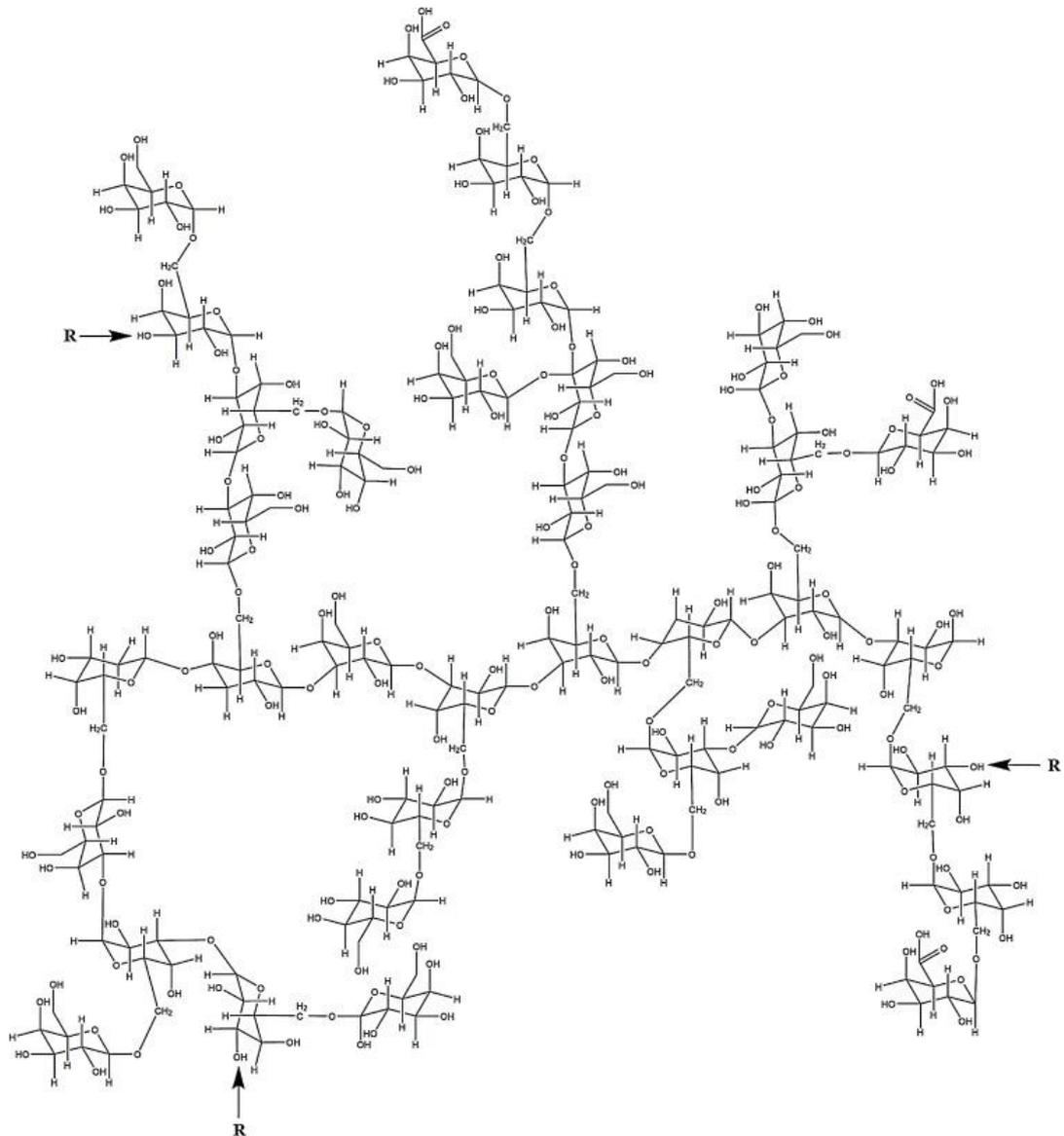
Fonte: elaborada pelo autor.

As gomas são polímeros naturais, formados por unidades de monossacarídeos em arranjos lineares ou ramificados, pertencentes à classe dos carboidratos (ANDRADE; CARVALHO; TAKEITI, 2013). A GC é um complexo de heteropolissacarídeo que após hidrólise apresenta um alto teor de monossacarídeos com uma variada composição dependendo de sua origem (MOTHÉ *et al.*, 2017). A forma isolada da GC possui como seu principal açúcar a β -D-galactose (72%), seguido da α -D-glicose (14%), α -L-arabinose (4-6%), β -D-ácido glucurônico (4-5%) e α -L-ramnose (3-2%) (PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998). A estrutura molecular da goma do cajueiro é composta por estrutura heteropolissacarídica altamente ramificada, um fragmento é verificado na Figura 6, a GC composta por galactose em sua cadeia principal com ligações (1 \rightarrow 3) e cadeias laterais com ligações (1 \rightarrow 6), a glicose, arabinose, ramnose, e o ácido glucurônico estão presentes como grupos terminais (MOTHÉ *et al.*, 2008; MOURA NETO *et al.*, 2011).

O exsudato da *Anacardium occidentale* é utilizado a décadas com base no conhecimento popular em várias regiões do Nordeste brasileiro, onde é utilizada comumente pela população como anti-inflamatório, agente cicatrizante de feridas, contra verrugas e tosse, antidiarreico, gastroprotetor, dentre outros usos, o seu uso popular vem estimulando pesquisas científicas com objetivo de confirmar tais propriedades atribuídas (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; CARNEIRO DA CUNHA *et al.*, 2020). Carvalho *et al.* (2015) comprovaram o efeito gastroprotetor da GC, através da inibição da inflamação e o aumento da quantidade de muco aderente na mucosa, além da proteção tópica à mucosa esofágica e perfil anti-inflamatório (NICOLAU *et al.*, 2019), atividade antibacteriana (40-30 mg/mL) (CAMPOS *et al.*, 2012), citotoxicidade contra as linhas tumorais testadas, apresentando maior escore

citotóxico para as linhas leucêmicas, não exibindo citotoxicidade para linhas não-tumorais (RIBEIRO *et al.*, 2020) atividade antitumoral foi verificada por Barros *et al.* (2020) não havendo indução da toxicidade para os órgãos e com poucas alterações hematológicas.

Figura 6- Fragmento estrutural de goma do cajueiro



Fonte: Ribeiro *et al.* (2016, com adaptações).

O uso de materiais biodegradáveis e provenientes de fontes renováveis é uma tendência da atualidade. Países tropicais como o Brasil são detentores de uma grande variedade de fontes conhecidas e de outras ainda desconhecidas de polissacarídeos de origem vegetal, com grande potencial em aplicações industriais (CUNHA; SILVA, 2013).

A GC tem sido citada como uma possível alternativa para substituir a goma arábica (GA) na indústria de alimentos, várias propriedades físico-químicas importantes semelhantes

entre as gomas. A goma do cajueiro, além da semelhança estrutural (ramificações) e química (açúcares componentes) com a GA, tem um importante diferencial: sua alta disponibilidade na região Nordeste do território brasileiro, podendo gerar lucros no período da entressafra e agregando mais valor ao agronegócio do caju. A goma arábica além do elevado custo, ocasionalmente tem sua importação comprometida pela dificuldade de fornecimento, relacionada a problemas climáticos, econômicos e políticos da região africana produtora. Eventualmente, a consolidação da substituição da goma arábica pela goma do cajueiro e sua padronização comercial, elevaria Brasil a exportador no mercado internacional. Deste modo, o Brasil livrar-se-ia da dependência de importação e contaria com um produto altamente competitivo em sua pauta de exportações (ANDRADE; CARVALHO; TAKEITI, 2013; PORTO; CRISTIANINI, 2014; MOTHÉ *et al.*, 2017; NAYAK *et al.*, 2019).

A GC foi identificado como um excelente material formador de filme com potencial aplicação em dispositivos nanobiomédicos (ARAÚJO *et al.*, 2012). Devido a sua origem biológica, a capacidade de formar géis e o fato de ter propriedades semelhantes aos polímeros sintéticos, é uma ótima opção para aplicação em diversos setores da indústria, na indústria alimentícia como emulsionante ou estabilizante, pois não é tóxico e não apresenta odor ou sabor (MOTHÉ *et al.*, 2017). Além disso apresenta vantagem como produto farmacêutico excipiente, pela fácil disponibilidade e menor custo quando comparado com outro excipiente para os usos semelhantes (NAYAK *et al.*, 2019).

As informações acumuladas sobre as propriedades físico-químicas e biológicas superiores dos polissacarídeos levaram ao reconhecimento desses polímeros naturais como um material promissor para a preparação de micro/nanopartículas (YANG *et al.*, 2015). O estudo de novos polímeros naturais como agentes encapsulantes é uma necessidade para atender exigências do mercado mundial e garantir a disponibilidade de materiais alternativos àqueles já utilizados, preferencialmente de baixo custo, baixa toxicidade, ampla disponibilidade e biodegradabilidade (CARNEIRO DA CUNHA *et al.*, 2020). Os polissacarídeos são encontrados recentemente como estabilizadores eficazes para substituir pequenos surfactantes moleculares sintéticos na preparação de nanoemulsões de óleo vegetal, reduzindo assim o risco de toxicidade potencial e melhorando a aplicabilidade das nanoemulsões para aplicações em alimentos (LUO; WANG; ZHANG, 2020).

3.4 Nanotecnologia

Nanotecnologia é uma tecnologia emergente que pode ser usada em uma ampla gama de produtos, incluindo produtos médicos, alimentos e cosméticos abrangendo questões de escala atômica ou molecular. Assim sendo, a aplicação da nanotecnologia pode resultar em atributos do produto que diferem daqueles dos produtos fabricados convencionalmente. Em termos de propriedades e transporte, as nanopartículas são consideradas pequenas entidades que agem como uma unidade completa (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2014; BOVERHOF *et al.*, 2015).

De acordo com a FDA (2014) produtos que contêm ou são fabricados com materiais na faixa da nanoescala são considerados “produtos que envolvem a aplicação de nanotecnologia” ou “produtos nanotecnológicos”. Sendo o termo “nanomaterial” geralmente utilizados para referir-se a ambos os materiais na faixa da nanoescala e certos materiais que, de outra forma, exibem propriedades ou fenômenos dependentes da dimensão relacionados. A Organização Internacional de Padronização (ISO) definiu nanomaterial como um material com qualquer dimensão externa na nanoescala ou tendo estrutura interna ou estrutura de superfície na nanoescala, incluindo nano-objeto e material nano-estruturado (ISO, 2015).

As principais propriedades de um nanossistema dependem do tamanho da matéria. O tamanho das nanopartículas (NPs) exibem propriedades diferentes daquelas encontradas na nível macro de escala, uma vez que seu tamanho lhes permitiria se mover pelo corpo (tecidos, estruturas da membrana celular) mais livremente do que partículas maiores, enquanto sua alta área de superfície aumenta sua reatividade e permite uma maior contato com membranas celulares ou organelas celulares, bem como maior capacidade de absorção e migração (ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2016; SHARMA *et al.*, 2019).

De acordo com Sharma *et al.* (2019) as nanopartículas podem ser incorporadas na indústria de alimentos em qualquer setor, como processamento, embalagem, armazenamento, transporte, segurança e melhoria da qualidade. Os nanomateriais testados na indústria de alimentos incluem inorgânicos (NPs de metal e óxido de metal), orgânicos (principalmente NPs de produtos naturais) e combinados (ou seja, argila) (HE; DENG; HWANG, 2019).

Os NPs de produtos naturais são normalmente concebidos como um sistema de entrega e também envolvidos como ingredientes ou suplementos na indústria alimentar (HE; DENG; HWANG, 2019). A interação de NPs com o ambiente alimentar é definida pelo tamanho das NPs, estado de aglomeração/agregação, composição, distribuição de tamanho de partícula, forma, solubilidade, dispersibilidade, área de superfície, química de superfície

(incluindo revestimento/funcionalização de superfície), densidade de carga de superfície, hidrofobia de superfície, permeabilidade à água, etc. (SHARMA *et al.*, 2019). A aplicação da nanotecnologia no setor de alimentos está voltada principalmente em emulsão, encapsulamento e tecnologias de embalagem. Entre vários nanotecnológicos em aplicações alimentares, a nanoemulsão encontrou um enorme mercado e aplicação na indústria alimentar (DASGUPTA; RANJAN; GANDHI, 2019).

3.4.1 Nanoemulsão

Emulsão é definida basicamente como a mistura de uma fase líquida em outra, total ou parcialmente imiscível, por meio da utilização de moléculas tensoativas (surfactantes) que reduzem a tensão interfacial entre os dois líquidos para obter estabilidade. As nanoemulsões (NEs) são emulsões de tamanho nano, fabricadas para melhorar a distribuição de ingredientes ativos, trata-se do sistema isotrópico termodinamicamente estável. A principal diferença entre emulsão e nanoemulsão está no tamanho e na forma das partículas dispersas na fase contínua. Além disto, das NEs serem sistemas coloidais cineticamente estáveis, apresentando propriedades funcionais aprimoradas em comparação com as emulsões convencionais (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2014; CRUCHO; BARROS, 2017; ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019).

As emulsões são classificadas em três categorias, do tipo óleo em água O/A (o óleo é disperso na fase aquosa), tipo água em óleo A/O (a água é dispersa na fase oleosa) e bi-contínuo (microdomínios de água e óleo são interdispersos no sistema). A transformação entre esses três tipos pode ser alcançada alterando os componentes das emulsões (GURPREET; SINGH, 2018).

A maneira mais comum de estabilizar emulsões é pelo surfactante adsorvido na interface entre gotículas e meio de dispersão. As camadas de adsorção de surfactantes não apenas reduzem a tensão interfacial e evitando a agregação de gotículas, pois, também podem fornecer uma carga elétrica às gotículas de emulsão (surfactantes iônicos) ou criar uma forte barreira estérica por meio de grupos moleculares volumosos direcionados ao meio de dispersão (surfactantes não iônicos), podendo assim fornecer estabilização estérica ou eletrostática ou eletrostática dupla (GRIGORIEV; MILLER, 2009; SINGH *et al.*, 2017).

As NEs tem ganhado crescente interesse dos pesquisadores ao longo dos anos, por apresentar gota de pequeno tamanho com uma grande área de superfície, com diâmetros na faixa de 10 a 500 nm (AZMI *et al.*, 2019; ABDELRASOUL; EID; BADAWY, 2020). O

tamanho das gotículas de nanoemulsão é influenciado pelo tipo e porcentagem de óleo, surfactantes e co-surfactantes (TAYEL *et al.*, 2013)

Existem muitas maneiras de produzir NEs originando pequenas partículas com distribuição estreita de tamanho, alguns métodos requerem pouca ou nenhuma energia (calor ou mistura) e maior quantidade de surfactantes para promover uma maior redução da tensão interfacial entre os compostos imiscíveis, com a ajuda de um surfactante em suas formulações (baixa energia). No entanto, também existem métodos que precisam de dispositivos mecânicos especializados para quebrar as gotas em um tamanho menor, necessitando de uma grande quantidade de energia (alta energia) ou a combinação de ambos (PENG *et al.*, 2015; AZMI *et al.*, 2019).

Os métodos de alta energia requerem dispositivos mecânicos especializados capazes de gerar forças mecânicas intensas que podem interferir e interromper as fases de óleo e água, como sonicadores, homogeneizadores de válvulas de alta pressão ou microfluidizadores (LANDRY *et al.*, 2014; KAUR *et al.*, 2017). Os métodos de alta energia requerem quantidades menores de surfactante do que os métodos de baixa energia. Embora sejam industrialmente escaláveis, consomem grande quantidade de energia levando a altos custos de produção (KUMAR *et al.*, 2019; SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). As principais desvantagens incluem custo instrumental e geração de altas temperaturas operacionais, o que às vezes exclui a utilização de compostos termolábeis (SINGH *et al.*, 2017).

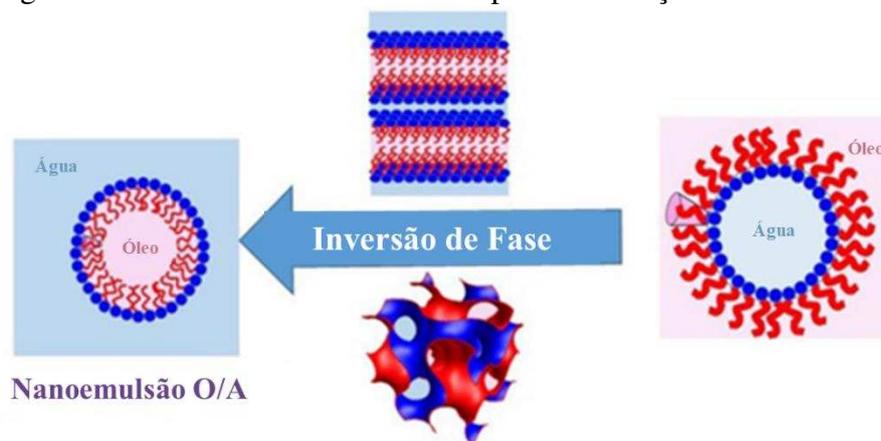
Enquanto que no método de baixa energia as nanoemulsões são preparadas utilizando a energia interna do produto químico (ou potencial químico dos componentes), apenas uma pequena quantidade de entrada de energia mecânica é necessária para a mistura suave dos componentes pelo agitador (PATHAK, 2017; SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). Envolvendo baixa variação de temperatura no sistema e, portanto, evitam a degradação de compostos termolábeis (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019). Porém geralmente precisam de uma alta concentração de surfactante (DOOST *et al.*, 2019).

A utilização de baixa energia é vantajosa devido à facilidade de implementação utilizando métodos simples de produção, menores custos de equipamentos e operação, não exigindo instrumentos sofisticados, menores custos de fabricação e maior eficiência energética (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2014; WALKER; DECKER; MCCLEMENTS, 2015; KUMAR *et al.*, 2019). A principal desvantagem da abordagem de baixa energia é a limitação dos tipos de óleos e emulsificantes que podem ser usados (WALKER; DECKER; MCCLEMENTS, 2015).

Nos métodos de baixa energia as formulações são preparadas por processos de Inversão de Fase por Temperatura (PIT), Inversão da Fase de Composição (PIC) e Emulsificação Espontânea, através da mistura de todos os ingredientes (óleo, água, surfactante e/ou co-surfactante). Usando esses processos, o tamanho das gotículas pode ser reduzido variando a composição da emulsão e alterando os fatores ambientais como a temperatura (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014; SUGUMAR *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2019; PONGSUMPUN; IWAMOTO; SIRIPATRAWAN, 2020).

O método PIT, que só é possível em sistemas com surfactantes que são termorresponsivos (por exemplo, alquiletoxilatos), o método PIC pode ser usado, em princípio, com todos os tipos de surfactantes e com moléculas termolábeis (FENG *et al.*, 2020). O procedimento de emulsificação pelo método PIC ocorre pela adição, a temperatura constante, da fase da aquosa (A) em uma mistura surfactante-óleo (SO) [(A) → SO], formando inicialmente uma emulsão de água em óleo (A/O) quando a água acrescida na mistura de SO, quando maiores quantidades de água são injetadas, o sistema converte-se em uma emulsão de óleo em água em óleo (O/A/O) que, em seguida, se decompõe em um sistema óleo em água (O/A) após a maior adição de água no sistema (FIGURA 7). Em suma, o comportamento hidrofílico e lipofílico do emulsificante é alterado pela alteração da composição dos constituintes sem variação de temperatura, ao alterar-se a composição e volume da fase contínua e a composição do emulsificante (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2014; PATHAK, 2017; FENG *et al.*, 2020).

Figura 7- Método de Inversão de Fase para formulação de nanoemulsão



Fonte: Feng *et al.* (2020, com adaptações).

O método PIC é considerado como tendo um potencial maior para uma produção em larga escala que o PIT, porque é experimentalmente mais fácil adicionar um componente a

um grande volume de emulsão do que produzir uma mudança repentina de temperatura (SOLANS; SOLÉ, 2012).

As nanoemulsões alimentares O/A parecem ser candidatas ideais para a entrega de compostos bioativos lipofílicos, como os óleos essenciais. Em particular, os compostos bioativos são normalmente necessários apenas em baixas concentrações para exibir suas atividades de promoção da saúde, podendo melhorar significativamente a estabilidade química, a liberação e a atividade biológica dos compostos bioativos. O método de baixa energia é particularmente adequadas para o desenvolvimento de sistemas de distribuição de óleos essenciais (CHANG; MCLANDBOROUGH; MCCLEMENTS, 2013; DONSI, 2018).

As nanoemulsões O/A são sistemas de entrega simples, mas altamente eficazes, que podem ser formulados a partir de ingredientes naturais ou derivados de forma natural e produzidos em alto rendimento usando processos facilmente escaláveis, constituídas por um núcleo lipofílico (fase oleosa) em que o composto bioativo lipofílico está preso e a camada hidrofílica (fase aquosa) e uma camada interfacial anfifílica composta pelo emulsionante/surfactante (ÖZTÜRK, 2017; DONSI, 2018). No entanto, tanto o óleo como a água podem conter vários outros componentes, e podem ser utilizados mais de um tipo de emulsionante. As características e a concentração dos principais componentes em uma nanoemulsão determinam suas propriedades finais (SALVIA-TRUJILLO *et al.*, 2017).

Acevedo-Fani, Soliva-Fortuny e Martin-Belloso (2017) afirmam que o tipo de surfactante, a concentração de surfactante, a viscosidade do meio aquoso, a concentração de biopolímero, o pH, a força iônica estão entre os fatores mais importantes que afetam a formação e a estabilidade das gotículas. A utilização de polissacarídeos como emulsionantes, tem sido proposta, por atuarem na redução da tensão interfacial entre as fases aquosas e o óleo, o que eventualmente diminui o tamanho das gotas. A utilização da goma do cajueiro tem ganhado popularidade como candidato a estabilizador, sendo capaz de estabilizar as nanoemulsões por longo período de tempo, gerando emulsões de menor tamanho com destruição estreita de tamanho (REHMAN *et al.*, 2020; PAULA *et al.*, 2011; HERCULANO *et al.*, 2015).

Aswathanarayan e Vittal (2019) afirmam que a composição e estrutura das nanoemulsões podem ser controladas para o encapsulamento e entrega eficaz de compostos lipofílicos bioativos no aumento da sua biodisponibilidade, possuindo potencial aplicação na indústria de alimentos para o fornecimento de nutracêuticos, agentes corantes e aromatizantes e antimicrobianos.

As nanoemulsões podem ser adicionadas diretamente às matrizes alimentares no estado líquido ou, em vez disso, podem ser aplicadas como revestimentos comestíveis nas

superfícies dos alimentos (estado sólido) se um biopolímero for incorporado na fase aquosa das nanoemulsões (ARTIGA-ARTIGAS; ACEVEDO-FANI; MARTÍN-BELLOSO, 2017). Nos últimos anos diversos estudos foram feitos para aplicação de nanoemulsões na conservação de pescado na preservação e extensão da vida de prateleira (Tabela 1).

Tabela 1- Nanoemulsões desenvolvidas e seus efeitos na preservação de pescado

Pescado	Nanoemulsão	Efeitos	Referências
Filés de robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Óleos de girassol, canola, milho, oliva, soja e avelã	Melhorou parâmetros químicos, microbianos e parâmetros de qualidade organoléptica; Extensão da vida útil em relação com o controle em: 2 dias; Armazenados por 12 dias a $2 \pm 2^\circ\text{C}$.	Özogul <i>et al.</i> (2016)
Filés de robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>) e Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Óleo de girassol	Diminui os parâmetros químicos e inibiu o crescimento bacteriano; Extensão da vida útil em relação com o controle: 1 ou 2 dias; Armazenados por 10 dias a $2 \pm 2^\circ\text{C}$.	Yazgan <i>et al.</i> (2017)
Filés de esturção Beluga (<i>Huso, Beluga</i>)	OE de Urtiga (<i>Urtica dioica</i> L.) e goma de Jujuba (<i>Zizyphus jujuba</i> Mill.) e	Exibiu menores perdas de peso e cozimento, mudanças de pH, deterioração textural e de cor, oxidação de lipídios e crescimento microbiano; Armazenados por 15 dias a 4°C	Gharibzahe di e Mohammad nabi (2017)
Filés de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Óleo de girassol e óleo essencial de <i>Zataria multiflora</i> Boiss	Protegeu contra oxidação, aumentou a aceitabilidade de sabor, odor e textura; Extensão da vida útil em: 15 dias; Armazenados por 15 dias a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.	Shadman <i>et al.</i> (2017)
Filés de robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>) embalados a vácuo	Óleo de girassol, avelã, canola, soja, milho, azeitona	Perdeu mais lentamente os ácidos graxos, também houve diferença na composição dos mesmos, além da prevenção da oxidação lipídica; Armazenados por 18 dias a $2 \pm 2^\circ\text{C}$.	Ozogul <i>et al.</i> (2017a)
Filés de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Óleos essenciais de alecrim, tomilho, louro e sálvia	Aumentou da qualidade organoléptica, redução dos valores dos parâmetros bioquímicos e redução no crescimento de bactérias; Extensão da vida útil em relação com o controle: 3 dias; Armazenados por 24 dias a $2 \pm 2^\circ\text{C}$	Ozogul <i>et al.</i> (2017b)

Continua

Pescado	Nanoemulsão	Efeitos	Referências
Filés de robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Óleos de girassol, canola, milho, oliva, soja e avelã	Atrasou as reações de auto-oxidação de ácidos graxos insaturados e retardo na oxidação lipídica; Armazenados por 24 dias a $2 \pm 2^\circ\text{C}$.	Durmus e Ozogul (2018)
Filés de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	OE de laranja, toranja, tangerina e limão	Apresentou efeito positivo na qualidade organoléptica, reduziu os valores dos parâmetros bioquímicos e retardou o crescimento de bactérias; Extensão da vida útil em relação com o controle: 4-6 dias; Armazenados por 16 dias a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.	Durmus (2020)
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	OE de <i>Ferulago angulata</i> e quitosana	Efeito inibidor sobre o crescimento microbiano, melhor controle dos índices de deterioração química, melhor textura, a cor e a aceitabilidade geral dos filés; Extensão da vida útil em pelo menos: 8 dias; Armazenados por 16 dias a 4°C .	Shokri <i>et al.</i> (2020)
Filés de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	OE de alecrim e curcumina	Reduziu os valores dos parâmetros bioquímicos; Armazenados por 9 dias a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.	Ceylan <i>et al.</i> , 2020
Filés de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	OEs de laranja, limão, tangerina e toranja	Apresentou efeito supressor na formação de aminas biogênicas, mantendo as mesmas em níveis baixos no Índice de Qualidade, baixos níveis de histamina também foram verificados;	Kosker (2020)
Filés de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	OE de curcumina	Retardou o crescimento de bactérias deteriorante e menor valor nos parâmetro físico-químicos; Armazenados por 15 dias a 4°C .	Lahidjani, Ahari e Sharifan (2020)
Filés de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	OE de funcho com goma de manjerição e <i>Lepidium perfoliatum</i>	Evitou a oxidação lipídica do filé e retardou o crescimento bacteriano; Armazenados por 28 dias a 4°C .	Sayyari <i>et al.</i> (2021)
Filés de tainha chata (<i>Mugil cephalus</i>)	OE de uva e canela	Inibiu a oxidação, hidrólise de lipídios, o crescimento de bactérias mesofílicas, psicofílicas e Enterobacteriaceae. Além de apresentarem melhor cor, odor e aceitação geral, melhorando a textura, o odor e o sabor do peixe cozido; Extensão da vida útil em relação com o controle: 2-4 dias; Armazenados por 14 dias a 2°C .	Ameur <i>et al.</i> (2021)

Continua

Pescado	Nanoemulsão	Efeitos	Referências
Camarão (<i>Crocus sativus</i> L.)	OE de açafrão	Protegeu dos camarões e de suas características antibacterianas e antioxidantes; Armazenados por 14 dias a 4 e 8°C.	Aboutorab <i>et al.</i> (2021)
Camarão (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	OE de cravo	Melhorou nos parâmetro físico-químico e na qualidade do camarão quanto as propriedades texturais e sensoriais; Armazenados por 10 dias a 4°C.	Rezaei <i>et al.</i> (2021)
Filés de dourada (<i>Pagrus major</i>)	OE de canela-perila em filmes quitosana com antocianidina	Inibiu a oxidação lipídica e o crescimento de microrganismos Extensão da vida útil dos filés: 6–8 dias; Armazenados por 14 dias a 4°C.	Zhao <i>et al.</i> , (2022)

Fonte: elaborada pelo autor.

A aplicação de nanoemulsões na qualidade do pescado vem ganhando cada vez mais importância, tendo em vista que os nanomateriais fornecem alta área de superfície associada a sua maior resistência, estabilidade em atividades químicas e biológicas em comparação com as aplicações de materiais alimentícios em micro e macroescala (CEYLAN *et al.*, 2020). Enquanto isso, proteínas e polissacarídeos são incluídos na composição como emulsificantes/estabilizadores e revestimentos de superfície, respectivamente, para melhorar a estabilidade coloidal geral durante o armazenamento (LUO; WANG; ZHANG, 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

O exsudato do cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi coletado no município de Ilha Grande (2°45'58,68" S; 41°50'59,94" O), Piauí, Brasil. As folhas de *Ocimum gratissimum* foram coletas no Nordeste do Brasil nos estados do (1) Piauí, na Embrapa Meio-Norte/UEP em Parnaíba (herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia sob o número de registro 92497), no (2) Ceará, na Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza. As espécies foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen), sob o número de registro AD8EDDD. Os reagentes químicos usados foram analíticos (PA) ou grau de HPLC, conforme necessário.

4.2 Obtenção do óleo essencial

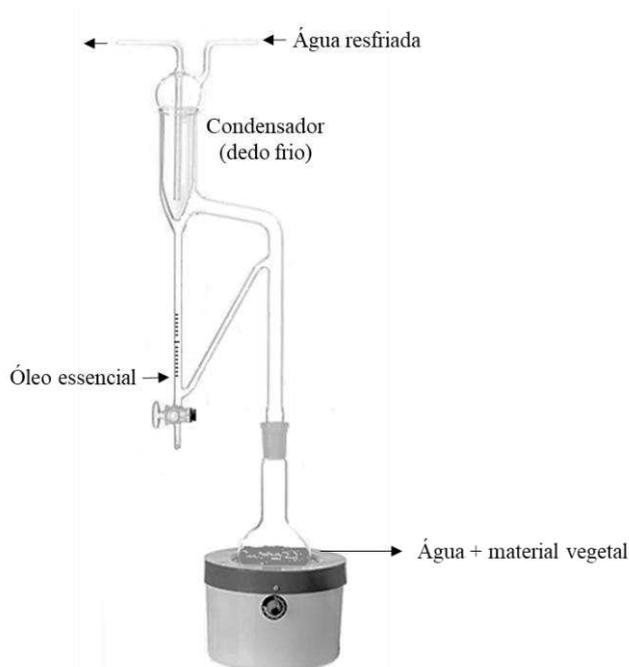
O procedimento de obtenção do óleo essencial dos Estados do Piauí e Ceará foram realizados na Embrapa Meio-Norte, Parnaíba, Piauí, Brasil. A extração do óleo foi realizada por hidrodestilação de acordo com a metodologia de Castro *et al.* (2018), com adaptações, onde 400 g das folhas secas e colhidas em horário pre-estabelecido de 8:00, foram imersas em 3,5 L de água e destilada em um aparelho tipo Clevenger adaptado a um balão de fundo redondo de 5 L (FIGURA 8), o tempo de extração foi estabelecido em 3 horas e 30 minutos, a partir do ponto de ebulição da água, transcorrido este tempo o óleo essencial foi recolhido.

O rendimento médio do óleo essencial das folhas foi $1,33 \pm 0,08$ calculado de acordo com Cruz e Bezerra (2017), através da equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = (V \text{ (mL)} / m \text{ (g)}) \times 100 \quad (1)$$

Onde, V = volume de óleo extraído e m = matéria vegetal.

Figura 8 - Esquema da hidrodestilação do óleo essencial em aparelho tipo Clevenger



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3 Caracterização do óleo essencial

4.3.1 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS)

O método utilizado para a identificação dos compostos químicos do óleo essencial foi Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) com ionização por impacto de elétrons (GC-MS-QP210 SE, Shimadzu, Japão). O equipamento foi operado nas seguintes condições de análise: coluna capilar Equity TM⁻¹, equivalente a 60 m x 0,25 mm x 1 µm HP⁻¹ (Supelco); temperatura do injetor de 220°C; temperatura do detector de 250°C; programação da coluna: temperatura inicial de 40°C, seguida de aquecimento de 40-240°C, com taxa de aquecimento de 3°C/min; fluxo de gás transportador (He) de 1 mL/minuto; proporção de divisão de 1:10 e volume de injeção de 1 µL. No espectrômetro de massa, a temperatura da fonte de íons utilizada foi de 240°C; temperatura da interface: 250°C; tempo de corte com solvente: 10 min; Modo de análise: varredura (35-500 m/z).

Os componentes do óleo essencial foram identificados comparando os perfis de fragmentação espectral de massa com os da base de dados Wiley229 e Nist08. A quantificação de cada composto volátil foi realizada com base na área relativa do pico do cromatograma de

íon total (TIC) dos compostos voláteis (RAJIVGANDHI *et al.*, 2020; CEBI; ARICI; SAGDIC, 2021).

4.3.2 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (GC-FID)

A análise por cromatografia gasosa acoplada com detector de ionização de chama (GC-FID) foi realizada num instrumento Shimadzu QP-2010 Plus (Kioto, Japão), com detector de ionização por chama (FID), coluna RTX-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm ; Restek), modo de injeção com divisão de fluxo de 1:30, gás de arraste hidrogênio com fluxo constante de 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura do forno foi elevada de acordo com 2 rapas: 1ª de 70 a 180°C a 4°C min^{-1} e a 2ª de 180 a 250°C a 10°C min^{-1} . As temperaturas do injetor e do detector foram, respectivamente, 250°C e 280°C. Os espectros de massa foram registrados em uma faixa de razão massa-carga (m/c) entre 30 e 450. Os índices de retenção foram determinados pela injeção de uma mistura de C₇-C₃₀ homólogos de n-alcanos (Sigma, St. Louis, MO).

A identificação dos compostos voláteis foi obtida através da comparação dos espectros de massa registrados com aqueles fornecidos pelo banco de dados do espectrômetro (NIST 02-287.324 compostos) juntamente com os índices de retenção e espectros de massa da literatura (ADAMS, 2017; NIST, 2011) O conteúdo relativo de cada constituinte foi quantificado como a área de pico normalizada detectada no cromatograma GC-FID e expresso como uma porcentagem.

4.4 Obtenção da Goma do Cajueiro (GC)

O polissacarídeo foi isolado a partir do exsudato da árvore. O método para o isolamento consistiu no descrito por Paula e Rodrigues (1995), com modificações. O exsudato foi dissolvido em água destilada à temperatura ambiente numa concentração 10% (m/v) de solução. Na solução adicionou-se 2 g de NaCl e submeteu-se a agitação durante 1 hora. O pH da solução foi ajustado para 7,0 com adição de NaOH (1 M). A solução foi filtrada e o polissacarídeo precipitado em etanol (1:4 v/v), sendo lavado com etanol e acetona e seco ao ar quente (FIGURA 9).

Figura 9 – Fluxograma de obtenção da goma do cajueiro



Fonte: elaborada pelo autor.

4.4.1 Caracterização da GC por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para obter os espectros de ressonância magnética nuclear, 20 mg da GC foi dissolvido em óxido de deutério (D₂O). Os espectros de ¹H e ¹³C foram obtidos usando um espectrômetro Agilent NMR a 400 MHz a 50°C.

4.5 Formulação das nanoemulsões

As nanoemulsões óleo-em-água (O/A) consistiram de uma fase aquosa contendo GC (1 mg.mL⁻¹) dissolvida em água destilada. A fase orgânica consistiu de OE (*O. gratissimum*) e surfactante não iônico Tween 80, a relação OE/surfactante utilizada foi de 2:1 (v/v).

Dois métodos foram propostos para a síntese das nanoemulsões Figura 10. O primeiro utilizando baixa energia (NaGC), consistindo na utilização de agitador magnético analógico múltiplo (RO5, IKA) a 1.000 rpm por 30 minutos. O segundo utilizando alta energia (NbGC) com um misturador ultra-turrax T10 (IKA, Staufen, Alemanha) a 15.000 rpm por 5 minutos. Após a síntese, as amostras obtidas foram armazenadas sob refrigeração (4 ± 1°C) até que todas as próximas etapas do trabalho fossem realizadas. O pH das formulações foram determinados: NaGC foi de 3,8 ± 0,12 e para a NbGC de 3,51 ± 0,11.

Figura 10 – Fluxograma da formulação das nanoemulsões



Fonte: elaborada pelo autor.

4.6 Caracterização das nanoemulsões

4.6.1 Determinação Diâmetro, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico da partícula (nm) e o índice de polidispersidade (PDI) foram determinados com 1, 14 e 37 dias após a síntese por espalhamento dinâmico de luz (DLS), com laser a 633 nm e ângulos de espalhamento de 173° a 25°C, usando um Malvern Nano Zetasizer. O potencial Zeta (mV) foi determinado com 1 e 37 dias. Para as medições, as amostras foram diluídas em água Milli-Q (1:10; v/v), conforme sugerido por Salvia-Trujillo *et al.* (2015). Os parâmetros foram estimados pela média de três medições.

4.6.2 Eficiência de incorporação do óleo na nanoemulsão

A quantidade de óleo nas nanoemulsões foi determinada por espectrofotometria UV-visível (Shimadzu UV-1800), segundo Rodrigues *et al.* (2018), com adaptações. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio (CHCl₃), na proporção de 1:10 (v/v) e submetidas à agitação por 1 minuto em vórtice Kasvi (K45-2820). Posteriormente, as amostras foram

centrifugadas a 7.000 rpm por 10 minutos em uma mini centrífuga UniSpin (UNI-E0711). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o conteúdo diluído analisado a 316 nm.

Para determinar a quantidade de óleo no sistema, uma curva de calibração foi construída com diferentes concentrações de OE em clorofórmio. A análise de regressão foi realizada para os dados ($y=0,1923x - 0,002$; $R^2= 0,997$). Todas as análises espectrofotométricas obedeceram à lei de Beer. As análises foram realizadas em triplicata, e a eficiência de encapsulamento (EE%) do OE na nanoemulsão foi calculada com base em Kujur *et al.* (2017), por meio da equação 2:

$$EE (\%) = (QtOE_v / QtOE_i) \times 100 \quad (2)$$

Onde: QtOE_v corresponde à quantidade de óleo essencial verificada; QtOE_i é a quantidade inicial de óleo essencial.

4.6.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

As nanopartículas foram analisadas em equipamento Malvern Panalytical NanoSight NS300, equipado com módulo laser de 642 nm (Malvern, UK) e software NTA 3.3 para obtenção de dados de tamanho e concentração de partículas suspensas no meio, segundo Vasconcelos *et al.* (2020). As amostras foram diluídas 50.000 vezes, usando água ultrapura, e uma alíquota da suspensão diluída foi retirada com uma seringa de plástico e injetada na célula de fluxo do equipamento. Para obter uma melhor visão das partículas, o foco e o nível da câmera foram ajustados após conferir que não havia bolhas de ar e nenhuma partícula aderida às paredes das células. Cinco vídeos de 1 min foram capturados, enquanto a amostra avançava através da célula de fluxo a uma taxa de 2 µL/min, permitindo a medição de um número maior de partículas de tamanhos variados através da alíquota.

As configurações de análise, em particular o limiar de detecção, foram definidas dependendo da intensidade de luz dispersa que foi observada nos vídeos capturados. As medidas foram realizadas a 25°C, e para análise dos dados, o valor de viscosidade considerado foi o da água. Cada vídeo foi analisado independentemente e os resultados foram automaticamente mesclados em um gráfico de distribuição de tamanho de partícula.

4.6.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise infravermelha (FTIR) foi obtida com Shimadzu IRAffinity-1S, na região do infravermelho e faixa espectral de 4000 a 700 cm^{-1} , utilizando o módulo ATR (Refletância Total Atenuada). Todas as análises foram realizadas com 45 varreduras em um cristal de seleneto de zinco para identificar os grupos funcionais presentes no óleo essencial, na goma do cajueiro e nanoemulsões.

4.6.5 Microscopia de Força Atômica

A nanoemulsão NaGC foi diluído na proporção de 1:100 e deixado em banho ultrassônico por 15 minutos. Posteriormente, uma alíquota de 10 μL foi retirada de cada amostra e depositada sobre uma superfície de mica. Antes da análise, a amostra foi deixada secar por 15 minutos em estufa a 36°C. As imagens foram obtidas com TT-AFM (AFM Workshop - USA), no modo de contato intermitente, com ponta TED PELLA (TAP300-G10), com amplitude de frequência de aproximadamente 238 kHz. As imagens foram processadas com o software Gwyddion 2.45, que também foi utilizado para obter o tamanho (nanômetros) das nanopartículas.

4.7 Estudo computacional

A Modelagem Molecular é uma ferramenta importante que provê uma maneira de correlacionar os conceitos teóricos com os dados experimentais, auxiliando na compreensão de princípios fundamentais relacionados aos conceitos de átomo e molécula na descrição de estrutura e propriedades de interesse em química, através da mecânica molecular e parâmetros físico-químicos (OLIVEIRA CORDEIRO *et al.*, 2013).

Para uma melhor compreensão das interações presentes nos sistema que levam a formação das nanopartículas métodos computacionais foram empregados. Inicialmente as moléculas de eugenol, 1,8-cineol, surfactante (Tween 80) e goma do cajueiro tiveram suas geometrias otimizadas sendo ainda submetidos a cálculos de frequência harmônica. A ausência de uma frequência negativa observada apontou que as geometrias calculadas correspondem aos respectivos pontos de mínima energia. Esta primeira etapa foi realizada através do programa Gaussian v.9 (FRISCH *et al.*, 2009).

Em uma segunda etapa as moléculas foram utilizadas para a realização de cálculos por dinâmica molecular com o programa GROMACS parametrizado com campo de força 53A6 (OOSTENBRINK *et al.*, 2004; OOSTENBRINK *et al.*, 2005). A quantidade de cada componente aos sistemas foi adicionada obedecendo a proporção experimental. As análises realizadas foram baseadas nas observações das disposições moleculares antes e após os respectivos cálculos.

4.8 Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos

A atividade antimicrobiana foi determinada contra três bactérias patogênicas comuns de origem alimentar: a cepa Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e as cepas Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enterica* (ATCC 14028). Os experimentos foram realizados de acordo com as determinações do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2015). Para tanto, as cepas foram semeadas, incubadas e suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,9%; p/v) para obtenção de absorvância entre 0,08 e 0,13 a 625 nm, que corresponde à escala 0,5 de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL), a partir dessa suspensão foi feita a diluição para alcançar o inóculo de concentração 10^5 UFC/mL.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada em uma microplaca de 96 poços contendo caldo Mueller-Hinton onde as amostras foram sucessivamente diluídas até atingir uma concentração incapaz de inibir o crescimento das cepas utilizadas, na concentração de 5×10^5 UFC/mL. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h em condições aeróbias. O OE, os polímeros e os surfactantes foram testados na mesma concentração usada para formular as nanoemulsões. Após a determinação da CIM, a Concentração Bactericida Mínima (CBM) também foi avaliada. Para isso, 10 µL foram retirados dos poços onde foi observada a inibição do crescimento e transferidos para placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton. As alíquotas que permitiram o crescimento bacteriano foram consideradas bacteriostáticas, enquanto as que não apresentaram crescimento foram consideradas bactericidas. As placas foram incubadas conforme descrito anteriormente. As determinações de CIM e CBM foram realizadas em triplicata, e as análises foram realizadas 1 e 37 dias após o armazenamento das nanoemulsões. Os resultados foram analisados por inspeção visual, de acordo com as diretrizes do CLSI (2015).

4.9 Avaliação da atividade antioxidante

4.9.1 ABTS

A atividade antioxidante das nanopartículas foi determinada avaliando o seu potencial para eliminar o radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), de acordo com Gião *et al.* (2007), com modificações. A análise utilizou 40 µL das amostras diluídas na proporção de 1:200 (v/v) e 2 mL de solução ABTS, que foi deixada reagir por 6 minutos no escuro. Depois disso, capacidade das nanoemulsões, OE, goma e surfactante para eliminação do radical ABTS foi verificada. A média de três repetições foi utilizada como ponto de referência. A capacidade antioxidante total foi expressa em porcentagem de inibição (PI), de acordo com a equação 3:

$$PI = ((Abs\ ABTS - Abs\ Amostra) / AbsABTS) \times 100 \quad (3)$$

Onde: AbsABTS corresponde à absorvância inicial do ABTS diluído e AbsAmostra é a absorvância da amostra após a reação.

4.9.2 DPPH

A atividade antioxidante determinada *in vitro* por meio do método da atividade sequestradora de radicais livres, utilizando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com adaptações. Alíquotas de 50µL das amostras, em diferentes concentrações, foram adicionadas a 150 µL de solução metanólica de DPPH, em microplacas de 96 poços. O DPPH foi preparado a 100 µM, conforme Scherer e Godoy (2009) encontra-se dentro da faixa de linearidade para as soluções de DPPH, a absorvância foi aferida utilizando-se o comprimento de onda de 517nm. O trolox e eugenol foram testados em concentrações entre 62,5 - 0,49 µg·mL⁻¹, o OE e a nanoemulsão de 281,25 a 0,49 µg·mL⁻¹, todas as amostras diluídas de forma seriada de razão 2.

A atividade antioxidante foi expressa em IC₅₀ (concentração que fornece 50% de inibição), calculada plotando a concentração da amostra em relação ao efeito de eliminação correspondente dose resposta utilizando-se o software GraphPad Prism 6. O índice de atividade antioxidante (IAA), foi calculado de acordo com Scherer e Godoy (2009), de acordo com a equação 4:

$$\text{IAA} = \text{Concentração final do DPPH}^\bullet (\mu\text{g.mL}^{-1}) / \text{IC}_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1}) \quad (4)$$

Onde, considerando a massa do DPPH e a massa do composto testado na reação, resultando em uma constante para cada composto, independente da concentração de DPPH ponto radical e da amostra utilizada. Os autores em seu trabalho consideraram que os extratos vegetais testados por eles apresentam atividade antioxidante baixa quando $\text{IAA} < 0,5$, atividade antioxidante moderada quando IAA entre 0,5 e 1,0, forte atividade antioxidante quando IAA entre 1,0 e 2,0 e muito forte quando $\text{IAA} > 2,0$.

4.10 Preparo dos tratamento nos camarões

Os camarões brancos do Pacífico (*L. vannamei*) foram adquiridos de um fornecedor local em Fortaleza, Ceará, Brasil. Apresentando todos os atributos de camarão fresco e não continham nenhum conservante. Após a despesca foram imediatamente armazenados em uma caixa isotérmica com gelo e transportados para o Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE) na Universidade Federal do Ceará. Ao chegarem ao laboratório os camarões foram imediatamente lavados com água fria (1–3°C) e armazenados em gelo na proporção de 1:2 (gelo para camarão) para o próximo estágio. O processo de preparação durou 2h.

Os camarões foram divididos aleatoriamente em três grupos: controle (grupo sem tratamento), emulsão controle com óleo essencial (*Ocimum gratissimum*) nas mesmas concentrações de NaGC com ausência de GC e a nanoemulsão com goma de cajueiro (NaGC). A aplicação do OE e da nanoemulsão foi realizada por aspersão utilizando-se 1 mL de revestimento para 100g de camarão, posteriormente os camarões foram armazenados em bandejas cobertos com filme de polietileno, armazenados sob refrigeração a $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em uma estufa incubadora BOD por 16 dias. A amostragem foi realizada a cada 4 dias de armazenamento.

4.11 Avaliação da melanose

A análise da melanose foi realizada por 15 avaliadores em um painel de 6 camarões, a pesquisa foi realizada através de formulário eletrônico no qual as fotografias dos camarões imediatamente após a captura (tempo inicial) com e sem tratamento, a cada 4 dias em um total de 16 dias de armazenamento refrigerado, eram fotografados e apresentados aos avaliadores via

Google Formulário, tais medidas foram adotadas diante do distanciamento social causado pela pandemia da Covid-19.

A escala visual que verificava manifestação de manchas pretas nos camarões, foi utilizada de acordo com Montero, Lopez-Caballero e Perez-Mateos (2001) (com modificação da escala desenvolvida por Otwell e Marshall, 1986), onde a intensidade da melanose de camarão apresentou uma escala de pontuação de 10 pontos (0–10), onde a pontuação 0 correspondia a nenhuma melanose (ausente). Os painelistas foram solicitados a dar a pontuação da melanose (0–10), onde 0= ausente; 2= leve (até 20% da superfície dos camarões afetada); 4= moderado (20–40% da superfície dos camarões afetada); 6 = notável (40–60% da superfície dos camarões afetada); 8= severo (60–80% da superfície dos camarões afetada); 10= extremamente pesado (80–100% da superfície dos camarões afetada).

4.12 Análise microbiológica

A quantificação de bactérias psicrotróficas seguiu as recomendações da *American Public Health Association* (APHA), na sua quarta edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001). Amostras de 25 g de cada tratamento foram maceradas e homogeneizadas em 225 mL de solução salina a 0,85% (m/v) de NaCl, correspondendo à diluição de 10^{-1} . Deste homogenato, foi retirada uma alíquota de 1 mL e diluída em 9 mL de solução salina 0,85%, correspondendo à diluição 10^{-2} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-6} .

Os tubos de cada diluição, das amostras, foram homogeneizados com auxílio de um agitador de tubos (Vortex modelo QL-901). De cada diluição foi retirada uma alíquota de 1 mL e inoculada em placas de Petri, em duplicata, na qual foram colocados 15 mL de Agar Padrão para Contagem (PCA) pela técnica de *pour plate*. As placas para contagem de bactérias psicrotróficas foram invertidas e incubadas a temperatura de 7°C por 10 dias em Estufa de incubação do tipo DBO (QUIMIS modelo Q315M26). Os dados microbiológicos foram convertidos em logaritmos do número de unidades formadoras de colônias (UFC/g).

4.13 Análises físico-químicas dos camarões

4.13.1 Determinação do pH

O potencial hidrogeniônico foi determinado de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), 10 g dos camarões foram macerados e homogeneizados em 100 mL de água destilada por 30 segundos, posteriormente filtrados em papel filtro nº 1, o pH foi aferido na amostra filtrada com o auxílio do pHmetro digital (Kasvi modelo K39-1014B).

4.13.2 Análise do nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)

A análise do N-BVT foi realizada por destilação a vapor de extrato dos camarões em TCA, de acordo com o método relatado por Malle e Tao (1987), com modificações. O extrato foi preparado homogeneizando-se 10 g da amostra do camarão previamente trituradas em um multiprocessador, com 90 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% (v/v), ficando em repouso por 5 minutos. Posteriormente o homogeneizado foi filtrado em papel de filtro nº 1 para obtenção do extrato. No tubo de destilação foram adicionados 25 mL do extrato filtrado com 5 mL de hidróxido de sódio 10% (m/v). Utilizou-se, ainda, ácido bórico 4% (m/v) com 0,04 mL de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol) no erlenmeyer para a destilação.

A destilação foi realizada no destilador de Nitrogênio (TECNAL modelo TE-036/1) até obter o volume total de 50 mL de solução no erlenmeyer. As quantidades de N-BVT foram calculadas a partir do volume de ácido sulfúrico 0,05 M utilizado para a titulação. Os valores foram expressos em miligramas (mg) de nitrogênio por 100 g de músculo, calculado através da equação 5, a seguir:

$$\text{N-BVT} = (14 \text{ g/mol} \times a \times b \times 300) / 25 \text{ mL} \quad (5)$$

Onde: a= mL de ácido sulfúrico gasto na titulação; b= normalidade do ácido sulfúrico (0,1).

4.13.3 Análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)

A oxidação dos lipídios das amostras foi medida por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB), conforme por Vyncke (1970). O extrato foi preparado homogeneizando-se 10 g da amostra do camarão previamente trituradas em um

multiprocessador, com 50 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% (v/v), ficando em repouso por 5 minutos. Posteriormente o homogeneizado foi filtrado em papel de filtro nº 1 para obtenção do extrato. Foram então adicionados 5 mL de homogeneizado e 5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,02 M, sendo homogeneizados com auxílio de um agitador de tubos (Vortex modelo QL-901). Para o branco utilizou-se 5 mL ácido tiobarbitúrico e 5 mL de água destilada. Em seguida os tubos foram aquecidos a 90°C em banho-maria (Microproce SSADO, modelo 0215M2, Quimis) por 10 min e posteriormente foram resfriado em água com gelo para o desenvolvimento de uma coloração rosa.

A absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Para encontrar o valor de SRATB em mg de malonaldeído (MDA) equivalentes/kg de músculo do camarão (mg de MDA eq/kg de músculo), utilizou-se a curva padrão a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). A evolução da oxidação da gordura foi acompanhada pela alteração da concentração de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico.

4.14 Análises estatísticas

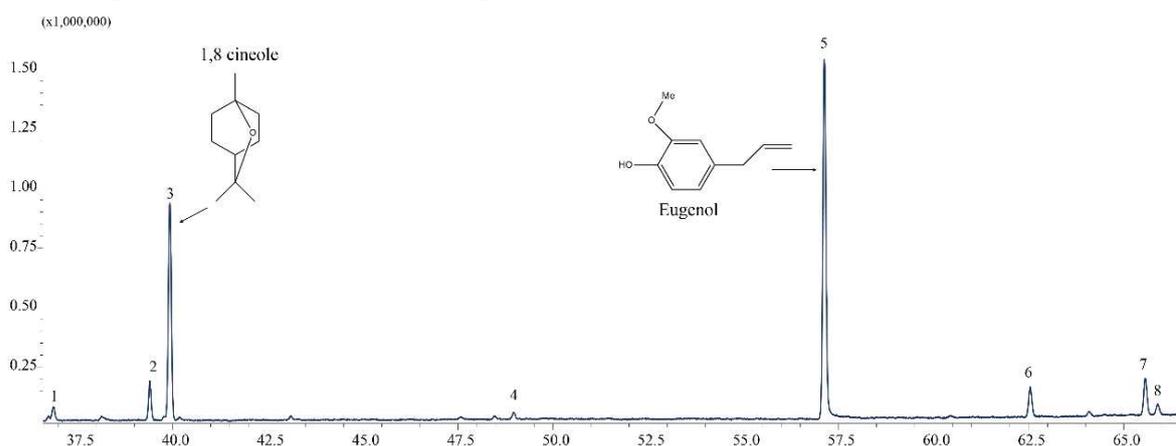
ANOVA Two-way foi usada para analisar o diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade, potencial Zeta, eficiência de encapsulação, avaliação da melanose, análise microbiológica dos camarões, determinação do pH, análise do nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT) e Análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB). Para a análise de AFM, ABTS e DPPH ANOVA One-way foi aplicada. As comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey e, para a análise da rugosidade por AFM. Para a análise do diâmetro médio de partículas de AFM, o teste t foi aplicado. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 6. Diferenças significativas foram consideradas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do óleo essencial

A análise da composição do OE de *Ocimum gratissimum* por GC-MS das folhas colhidas no Estado do Piauí revelou 8 componentes diferentes (FIGURA 11), os compostos identificados são mostrados na Tabela 2. Mostrou-se predominantemente composto por Fenilpropanoide (Eugenol), monoterpenos (L- β -Pinoeno, cis- β -Ocimeno, 1,8-Cineol, α -terpineol) e sequesterpenos (β -cariofileno, β -Selineno, α -Selineno). Eugenol (51,19%) e 1,8-cineol (29,55%), foram os componentes mais representativos.

Figura 11 - Cromatograma GC-MS do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. Os números sobre os picos são referentes aos compostos da Tabela 2



Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.

Para as folhas de *O. gratissimum* colhidas no Estado do Ceará para análise da composição do OE por GC-FID revelou 13 componentes diferentes (FIGURA 12), os compostos identificados são mostrados na Tabela 3. Os constituintes predominantes do OE também consistiu no eugenol (47,31%) em menor quantidade e no 1,8-cineol (30,74%) em maior quantidade, em relação ao OE do Estado do Piauí. Corroborando com Castro *et al.* (2018) e Oliveira Barbosa *et al.* (2021) que determinaram 52,99% e 47,03% de eugenol e 24,68% e 22,10% de 1,8-cineol, para os Estados do Piauí e Ceará, respectivamente, para OE da mesma espécie de planta. A composição química dos óleos essenciais de plantas pertencentes à mesma

¹ARAÚJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

espécie pode variar significativamente dependendo da variedade de cultivares, ambiente, altitude, métodos de cultivo, tipos de solo, temporada e época de colheita (OLIVEIRA BARBOSA *et al.*, 2021; DUNG *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial *Ocimum gratissimum* obtido pela extração de plantas do Estado do Piauí e analisado por GC-MS

Nº	Componentes	TR	IS	(%)
1	L-β-Pineno	36,86	96	1,62 ± 0,42
2	cis-β-Ocimeno	39,40	98	4,46 ± 0,10
3	1,8-Cineol	39,92	95	29,55 ± 0,17
4	α-terpineol	48,95	91	0,73 ± 0,14
5	Eugenol	57,12	97	51,19 ± 0,30
6	β-Cariofileno	62,54	96	4,35 ± 0,10
7	β-Selineno	65,56	93	5,63 ± 0,10
8	α-Selineno	65,89	89	1,57 ± 0,11

Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.

TR = tempo de retenção (min); IS = Índice de similaridade (%);

(%) = porcentagem de compostos no óleo essencial.

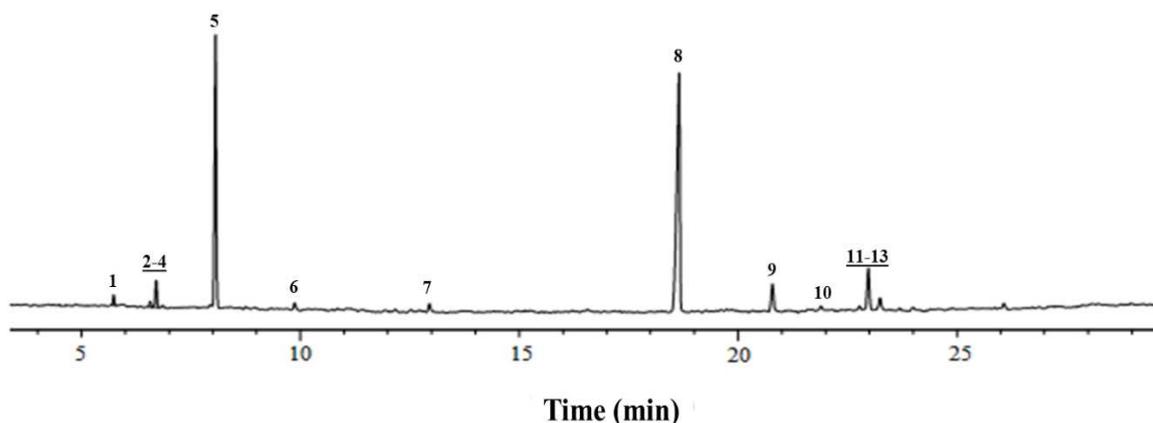
Eugenol é um hidroxifenilpropeno naturalmente presente em óleos essenciais de várias plantas pertencentes às famílias Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae e Myristicaceae (MARCHESE *et al.*, 2017). Este composto é um ácido fraco solúvel em solventes orgânicos e extraído principalmente do óleo de cravo-da-índia, noz-moscada, canela, manjeriço e louro (NEJAD; ÖZGÜNEŞ; BAŞARAN, 2017). Do ponto de vista nutracêutico, o eugenol é um componente interessante dos óleos essenciais devido ao seu alto potencial antioxidante e antibacteriano (KOROCH; SIMON; JULIANI, 2017).

O eucaliptol (1,8-cineol) está presente em óleos essenciais de plantas como alecrim e louro, constituindo o principal componente do óleo essencial de eucalipto (RODENAK-KLADNIEW *et al.*, 2021). O uso de 1,8-cineol, um componente natural clinicamente preparado como um ingrediente anti-inflamatório ativo, está bem estabelecido para a terapia de doenças das vias aéreas, como sinusite crônica e bronquite, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma brônquica (GREINER *et al.*, 2013), em além de demonstrar a capacidade de prevenir lesão

¹ARAUJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

pulmonar aguda, podendo ser utilizado como recurso preventivo ou nutricional contra doenças respiratórias agudas (GONDIM; SERRA; CAVALCANTE, 2019).

Figura 12 - Cromatograma GC-FID do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. Os números sobre os picos são referentes aos compostos da Tabela 3



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 3 - Composição química do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* do Estado do Ceará e analisado por GC-FID

Pico	Componente ^a	IRC ^b	IRL ^c	Área (%) ^d
1	α -Pinenol ^e	936	943	0,93
2	Sabineno ^e	976	982	0,57
3	β -Pinenol ^e	981	986	2,90
4	Mirceno ^e	995	995	-
5	1,8-Cineol ^f	1033	1040	30,74
6	Linalool ^f	1107	1103	0,97
7	α -Terpineol ^f	1200	1196	1,20
8	Eugenol ^g	1361	1365	47,31
9	E-Cariofileno ^h	1421	1427	4,23
10	α -Humuleno ^h	1463	1461	0,46
11	γ -Muuroleno ^h	1483	1488	0,55
12	β -Selineno ^h	1488	1493	6,22
13	α -Selineno ^h	1497	1501	1,97
	^e Monoterpeno hidrocarboneto			2,43
	^f Monoterpeno oxigenado			27,66
	^g Fenilpropanoide			55,23
	^h Sesquiterpeno hidrocarboneto			12,96
	Total identificado			98,29

Fonte: dados da pesquisa.

^aCompostos identificados por correspondência espectral com a literatura (ADAMS, 2017).

^bÍndice de retenção calculado em coluna HP5-MS.

^cÍndice de retenção da literatura (MELO *et al.*, 2019a).

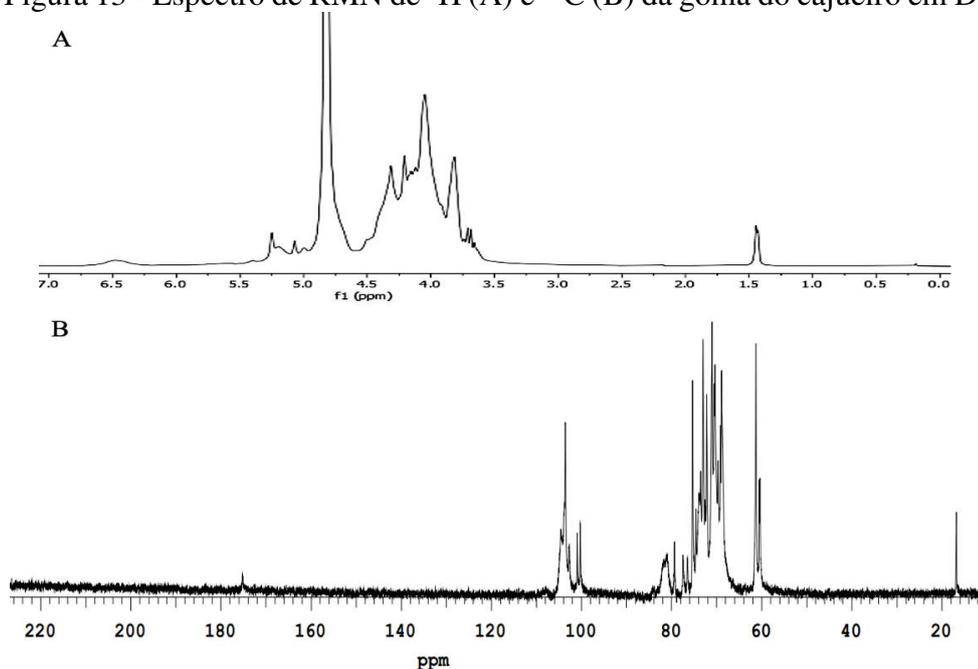
^dÁreas relativas determinadas por GC-FID.

Eugenol e eucaliptol (1,8-cineol) são substâncias classificadas como reconhecidas como seguras (GRAS) pela *Food and Drug Administration*, sendo amplamente utilizadas para diversos fins em diversos setores, como farmacêutico, alimentício e cosmético, agrícola e outros (NEJAD; ÖZGÜNEŞ; BAŞARAN, 2017; LIMA *et al.*, 2021). No entanto, as atividades anteriores para os OEs são limitadas devido à sua baixa solubilidade e estabilidade aquosa, são substâncias altamente voláteis com baixa estabilidade química, sendo sensíveis à oxidação e interações químicas (MARCHESE *et al.*, 2017; SHAO *et al.*, 2018), a estabilização em um sistema nanoestruturado é proposta para melhorar os aspectos acima mencionados.

5.2 Caracterização da Goma do Cajueiro (GC)

A Figura 13A mostra os espectros de RMN de ^1H de GC. O sinal a 1,3 ppm está relacionado ao CH_3 da ramnose. Os deslocamentos químicos de 3,5 a 4,0 ppm correspondem a H-2 a H-5. Os sinais em 4,3 e 4,8 indicam o H-1 de β -D-galactose (1 \rightarrow 6) e α -L-ramnose, respectivamente. Os sinais atribuíveis aos prótons anoméricos são vistos em 4,6-5 ppm. A Figura 13B mostra os espectros de ^{13}C RMN de GC.

Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H (A) e ^{13}C (B) da goma do cajueiro em D_2O



Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.

¹ARAÚJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

O deslocamento químico a 16,7 ppm indica a presença de ramnose CH₃. Os desvios químicos nas regiões de 60,3-81,1 ppm podem ser atribuídos aos sinais C-2 e C-6. Sinais de carbono anomérico indicam a presença de β-D-galactose (1→3) (103 ppm), β-D-galactose (1→6) (104 ppm), α-L-ramnose (100,9 ppm) e α-L -arabinose (107 ppm). O deslocamento químico em 175,2 ppm é característico de carbonila (PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998; QUELEMES *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

5.3 Caracterização das nanoemulsões

Na Figura 14 verifica-se a imagem fotografica das nanoemulsões formuladas. As várias técnicas de caracterização para as nanoemulsões incluem determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta, determinação da eficiência de encapsulamento, bem como caracterização por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e microscopia eletrônica (GURPREET; SINGH, 2018).

Figura 14 – Fotografia das nanoemulsões formuladas



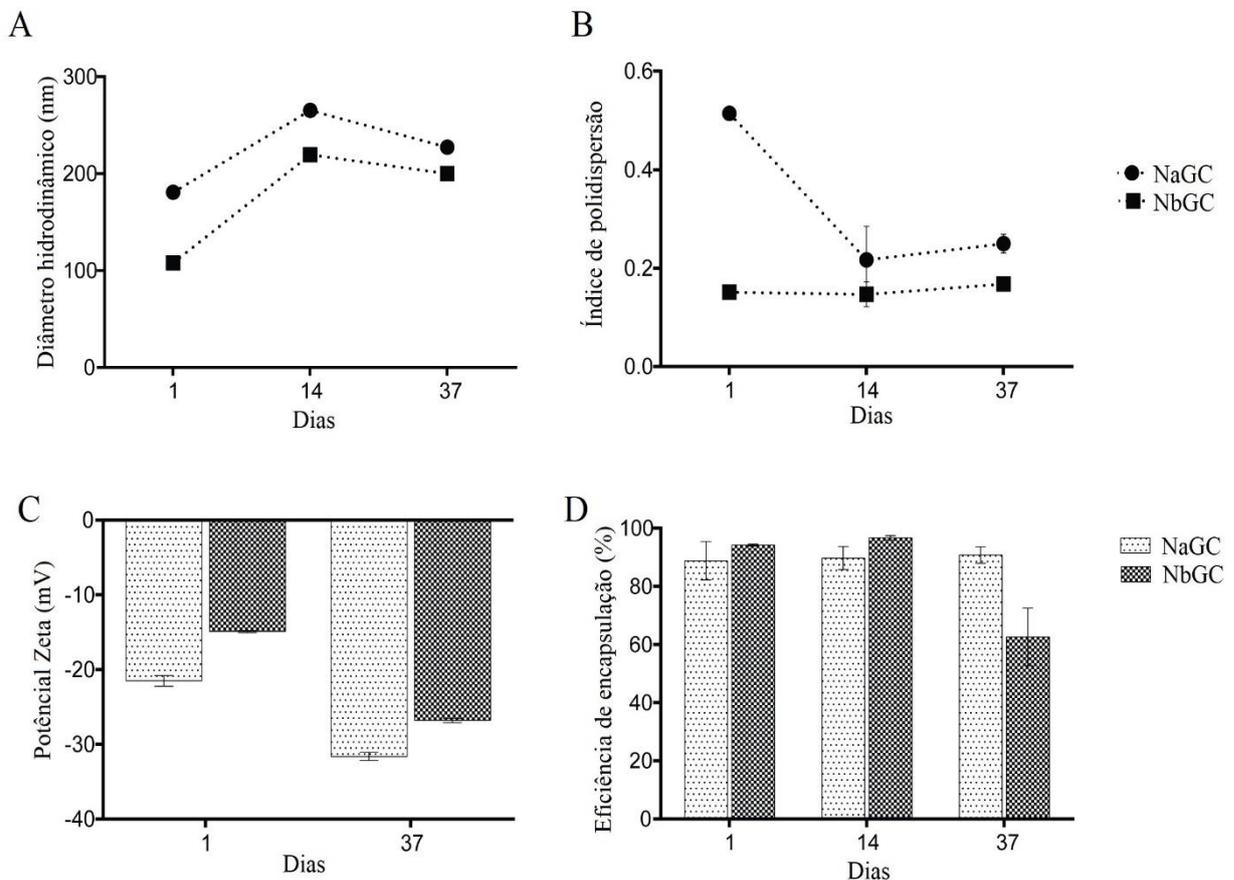
Fonte: elaborada pelo autor.

5.3.1 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulamento e estabilidade temporal

Em aplicações práticas, é importante que as nanoemulsões tenham um prazo de validade suficientemente longo após a sua formação, que é verificado por sua estabilidade de armazenamento (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2014). A estabilidade das nanoemulsões estão relacionadas à sua composição, concentração, tamanho, estado físico, encapsulamento e propriedades interfaciais das partículas (BORTHAKUR *et al.*, 2016).

O diâmetro hidrodinâmico médio encontrado para as formulações foram $180,87 \pm 2,44$ (NaGC) e $108,17 \pm 1,69$ (NbGC) (GRÁFICO 1A). Esses valores foram estatisticamente diferentes ($p < 0,001$). O menor diâmetro foi verificado para o método de alta energia, que promove maior agitação durante a síntese, demonstra que o tamanho das gotas formadas depende da velocidade de agitação, o mesmo foi verificado por Sugumar *et al.* (2016). Os valores encontrados concordam com o tamanho médio de gotículas de nanoemulsões O/A, que variam entre 10 e 500 nm (ABDELRASOUL; EID; BADAWY, 2020).

Gráfico 1 - Análise da estabilidade das nanoemulsões durante 37 dias de armazenamento. (A) Diâmetro hidrodinâmico; (B) Índice de polidispersidade; (C) potencial Zeta; (D) Eficiência de encapsulamento



Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.
Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Os diâmetros hidrodinâmicos verificados após a síntese estão de acordo com os resultados evidenciado por Silva Gündel *et al.* (2018) ao utilizarem alta agitação pelo

¹ARAUJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

equipamento Ultra-Turrax para incorporação de OE de *O. basilicum*, o diâmetro médio foi de $119 \pm 1,13$ nm e por Onyebuchi e Kavaz (2019) ao utilizarem baixa energia para nanoemulsão quitosana com OE de *O. gratissimum*. $134,9 \pm 6,73$ - $135,5 \pm 10,48$ nm. Na presente pesquisa a formulação sintetizada na ausência de goma do cajueiro através da metodologia de baixa energia, apresentou diâmetro médio de $475,30 \pm 15,10$ nm, observando-se melhores resultados quando a GC é inserida no sistema, com diminuição do tamanho em até três vezes.

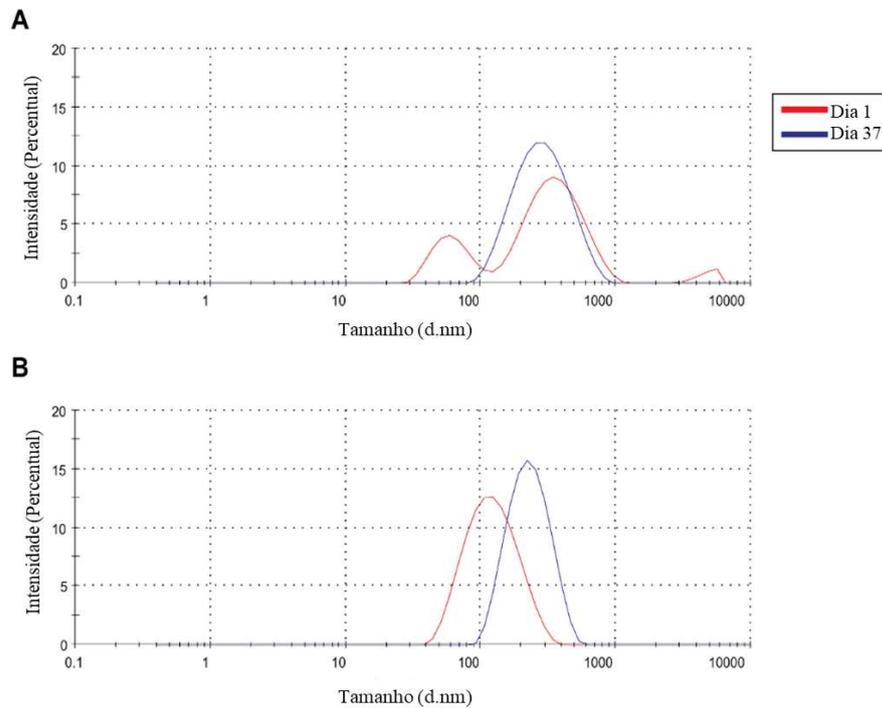
As nanoemulsões apresentaram variação no diâmetro hidrodinâmico médio durante os 37 dias (GRÁFICO 1A) de avaliação, com aumento de tamanho. Tayel *et al.* (2013) atribuíram tal comportamento a uma agregação transitória que pode ocorrer durante o movimento browniano. No entanto, uma diminuição é evidente entre o 14º e 37º dia ($p < 0,0001$). De acordo com Li *et al.* (2016), durante o armazenamento, os emulsificantes podem interagir com as gotículas de óleo de forma mais compacta, reduzindo o tamanho das micelas.

Além disso, a variação do potencial zeta, pode estar correlacionada com o tamanho da nanopartícula no sistema (LI; LU, 2016). Observou-se que quando há uma diminuição no diâmetro da partícula (GRÁFICO 1A), há um aumento no potencial zeta (GRÁFICO 1C). Quanto maior o potencial zeta, mais forte é a repulsão entre as partículas e mais fraca é a tendência de agregação, conforme sugerido por Wu *et al.* (2018). Além de que, nenhuma separação de fases foi observada durante os dias de armazenamento, demonstrando fortemente a boa estabilidade a longo prazo das amostras.

No caso do DLS, além do tamanho, a distribuição da forma da partícula também é determinada. O índice de polidispersidade (IPD) indica a uniformidade do tamanho da gota na nanoemulsão. Essa medida de homogeneidade das partículas que varia de 0 a 1. Quanto mais próximo de zero o valor do IPD, mais homogêneas são as partículas (PATEL *et al.*, 2011; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). No presente estudo, foram encontrados valores próximos a zero para a formulação NbGC, que foi sintetizada pelo método de alta energia ($0,15 \pm 0,01$). A formulação obtida pelo método de baixa energia (NaGC), por sua vez, apresentou valor intermediário ($0,51 \pm 0,01$). Quando as formulações foram analisadas na ausência de GC, foi observado um valor superior mais próximo de 1 ($0,74 \pm 0,10$).

A formulação NaGC apresentou diminuição no IPD (GRÁFICO 1B) e permaneceu estável até o final do experimento, o que também é evidenciado na distribuição de tamanho. Esses dados são apresentados na Figura 15B, onde é possível observar uma distribuição monomodal no 37º dia para ambos os métodos de síntese. De acordo com El-Sayed *et al.* (2017), uma distribuição monomodal leva a uma dispersão fisicamente mais estável.

Figura 15 - Distribuição de tamanho das nanoemulsões por espalhamento dinâmico de luz (DLS) com 1 e 37 dias de armazenamento. (A) NaGC e (B) NbGC



Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.

O potencial zeta (ζ) é determinado em mV e informa a carga elétrica superficial na interface da gota (WU *et al.*, 2018). A GC apresentou potencial ζ negativo ($-22,10 \pm 1,76$), corroborando com Quelemes *et al.* (2017) e Amorim *et al.* (2019). Valores negativos de ζ também foram encontrados para as nanoemulsões (GRÁFICO 1C), que podem estar associados a sítios carboxilados presentes no GC (OLIVEIRA; PAULA; DE PAULA, 2014). Uma carga superficial negativa é considerada uma vantagem, uma vez que nanopartículas com superfícies carregadas negativamente reduzem a bioadesão das proteínas plasmáticas e uma baixa taxa de captação de células inespecíficas (ZHANG *et al.*, 2012). Além disto, atividade bactericidas prolongadas foram verificados em nanoemulsões carregada negativamente (SHARIF *et al.*, 2017).

O potencial zeta das nanoemulsões após 37 dias de armazenamento foi maior (em valor absoluto) que os iniciais $-19,10 \pm 1,28$ para NaGC e $-16,60 \pm 1,47$ mV para NbGC, correspondendo a $-31,60 \pm 0,57$ e $-26,80 \pm 0,28$ mV, respectivamente, apresentando diferença estatística em relação ao inicial ($p < 0,001$). O valor absoluto do potencial zeta ≥ 30 mV pode

¹ARAÚJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

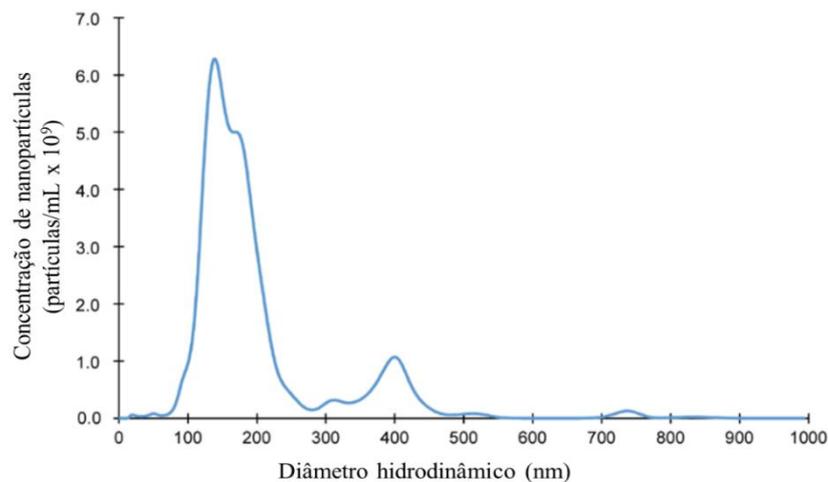
inferir a estabilidade coloidal da nanoemulsão (GURPREET; SINGH, 2018), perfil observado para o NaGC.

A quantidade de OE no sistema nanoemulsificado foi determinada pela eficiência de encapsulamento (EE%) (GRÁFICO 1D). Os valores de EE% para as formulações não foram estatisticamente diferentes, correspondendo a $88,81 \pm 6,61\%$ para NaGC e $94,19 \pm 0,33\%$ para NbGC. Valores elevados de EE% são uma característica desejável para o sistema (HASANI; OJAGH; GHORBANI, 2018), contudo, no 37º dia de armazenamento, a NbGC apresentou uma diminuição em 31,55% do teor inicial de OE, o que pode estar relacionado com a desestabilização do sistema e volatilização do OE. A nanoemulsão NaGC manteve os níveis de OE, sem diferença estatística durante o período avaliado. Esses resultados sugerem que esta amostra tem melhor estabilidade para uma aplicação de longo prazo.

A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) é a microscopia de espalhamento de luz a laser com uma câmera de dispositivo de carga acoplada, que permite a visualização e registro de nanopartículas individuais se movendo sob o movimento browniano em solução (CRUCHO; BARROS, 2017).

A análise de NTA foi realizada para a nanoemulsão NaGC devido a sua maior estabilidade temporal e corrobora com a análise DLS, mostrando uma amostra polidispersa com diâmetro hidrodinâmico médio de $166,90 \pm 0,20$ nm (FIGURA 16).

Figura 16- Distribuição do diâmetro hidrodinâmico do NaGC obtido por medidas de NTA. As amostras foram diluídas na proporção 1/50.000 e analisadas na célula de fluxo a 2 μ L/min com a captura de cinco vídeos de 1 min de duração cada



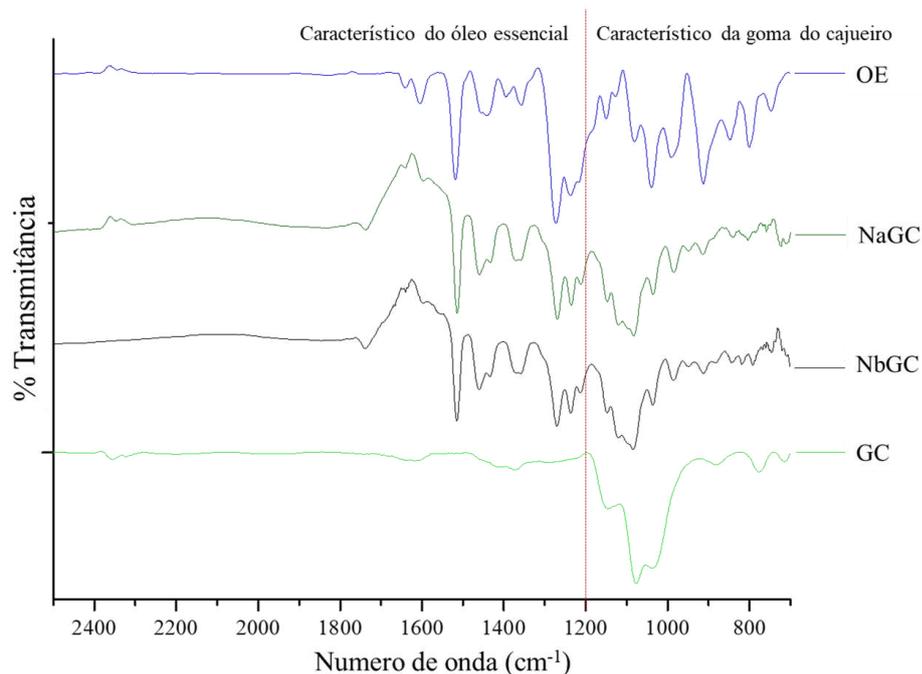
Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.

¹ARAÚJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

5.3.2 Análise de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) fornece as informações dos diferentes grupos funcionais presentes em uma amostra (DASGUPTA; RANJAN; GANDHI, 2019). O espectro OE, representado na Figura 17, mostrou absorções características para o eugenol na região de 1639 cm^{-1} correspondendo a C=C, para 1267 , 1236 e 1036 cm^{-1} atribuiu-se a C-O, 993 , 914 e 796 cm^{-1} ao CH fora do plano. Para 1,8-cineol na região de 1379 , 1215 e 842 cm^{-1} foram atribuídas a ligação $\text{CH}_3(\text{CO})$, C-O-C e dobramento C-H fora do plano, respectivamente (BARANSKA *et al.*, 2005; SCHULZ *et al.*, 2005; HASANI; OJAGH; GHORBANI, 2018; HZOUNDA *et al.*, 2016), corroborando com a análise de caracterização do OE GC-MS.

Figura 17 - Espectros FTIR das nanoemulsões e seus precursores. Óleo essencial (OE), nanoemulsão formulada com goma do cajueiro e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* pelos métodos de baixa (NaGC) e alta (NbGC) energia, goma do cajueiro (GC)



Fonte: Araujo *et al.* (2021, com adaptações)¹.

O espectro de GC mostra picos fortes em 1150 cm^{-1} , atribuídos a CO (carbono anomérico) (RIBEIRO *et al.*, 2020), vibrações entre $1072\text{-}1077\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a vibrações

¹ARAUJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

de alongamento C-O-C (Ligação glicosídica) e 1031-1036 cm^{-1} à flexão OH de álcoois (PITOMBEIRA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Tais resultados corroboram os obtidos por Amorim *et al.* (2019) para GC isolado.

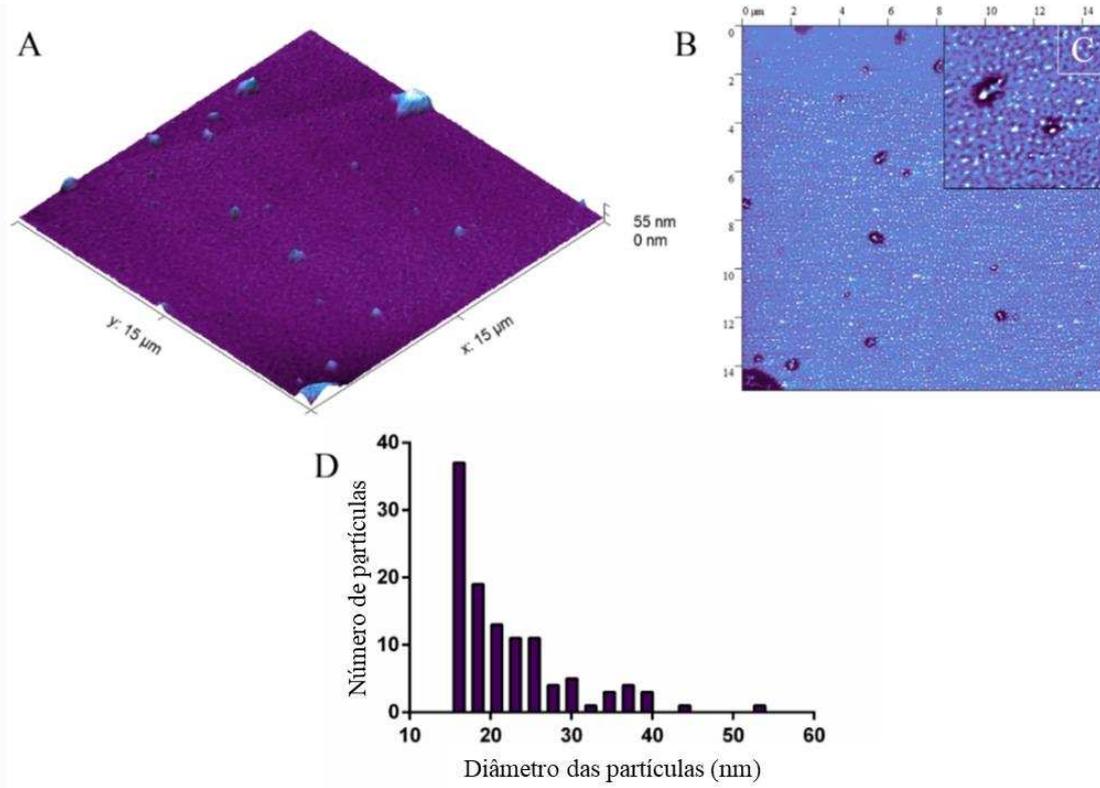
No espectro das nanoemulsões, as bandas características do OE e do GC estão presentes, mas apresentaram intensidade diminuída, o que sugere que as nanoemulsões são formadas pelo polímero e pelo óleo essencial. Não foi observada diferença entre os espectros das nanoemulsões formuladas, indicando que ambas as amostras possuem basicamente a mesma constituição (polissacarídeo e OE).

5.3.3 Morfologia das micelas da nanoemulsão

A técnica de microscopia de força atômica (AFM) é usada para investigar a forma e o tamanho, as propriedades físicas de nanopartículas, como rugosidade, tamanho de gota e morfologia da superfície (BORTHAKUR *et al.*, 2016). A morfologia das micelas da nanoemulsão de NaGC obtida por AFM é mostrada nas Figura 18A, B e C. A Figura 18A, mostra que as partículas são esféricas e massivas, sem muita variação em sua distribuição de tamanho, além de apresentarem uma superfície lisa. Partículas em formatos esféricos também foram verificadas para nanoemulsões por Silva Gündel *et al.* (2018). Pavoni *et al.* (2020) relatam que as estruturas nas NEs são geralmente esféricas, pois são o resultado da redução da área interfacial como consequência do pequeno raio e da alta tensão interfacial.

A AFM é particularmente útil para verificar-se quando há duas ou mais fases em uma nanoestrutura, como as nanopartículas de lipídio-biopolímero (LUO; WANG; ZHANG, 2020). Nas Figuras 18B e 18C, em relação à imagem de fase, os NaGCs exibem diferentes contrastes em sua superfície e núcleo. Com a imagem de fase, é possível monitorar as possíveis transições entre diferentes materiais (MAGONOV; ELINGS; WHANGBO, 1997), que neste caso corresponde ao polissacarídeo: OE. A micela é composta por um núcleo de óleo circundado por monocamadas de surfactante, ou multicamadas, direcionado com as caudas apolares em direção ao núcleo lipofílico e as cabeças polares em direção à fase aquosa (PAVONI *et al.*, 2020).

Figura 18 - Imagens AFM de NaGC: imagem 3D Height - 15 x 15 μm (A); Imagem de fase 2D - 15 x 15 μm (B); Imagem de fase 2D - 3 x 3 μm (C) e gráfico de distribuição do diâmetro de partícula (D). Imagens com resolução de 512 x 512 pixels



Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.

A AFM é particularmente útil para verificar-se quando há duas ou mais fases em uma nanoestrutura, como as nanopartículas de lipídio-biopolímero (LUO; WANG; ZHANG, 2020). Nas Figuras 18B e 18C, em relação à imagem de fase, os NaGCs exibem diferentes contrastes em sua superfície e núcleo. Com a imagem de fase, é possível monitorar as possíveis transições entre diferentes materiais (MAGONOV; ELINGS; WHANGBO, 1997), que neste caso corresponde ao polissacarídeo: OE. A micela é composta por um núcleo de óleo circundado por monocamadas de surfactante, ou multicamadas, direcionado com as caudas apolares em direção ao núcleo lipofílico e as cabeças polares em direção à fase aquosa (PAVONI *et al.*, 2020).

Na Figura 18D é possível observar os diâmetros obtidos para o NaGC, demonstrando que a nanoemulsão possui partículas com tamanho mínimo de 14,98 nm e tamanho máximo de 54,46 nm. A maioria das partículas tem tamanhos entre 14-30 nm, com

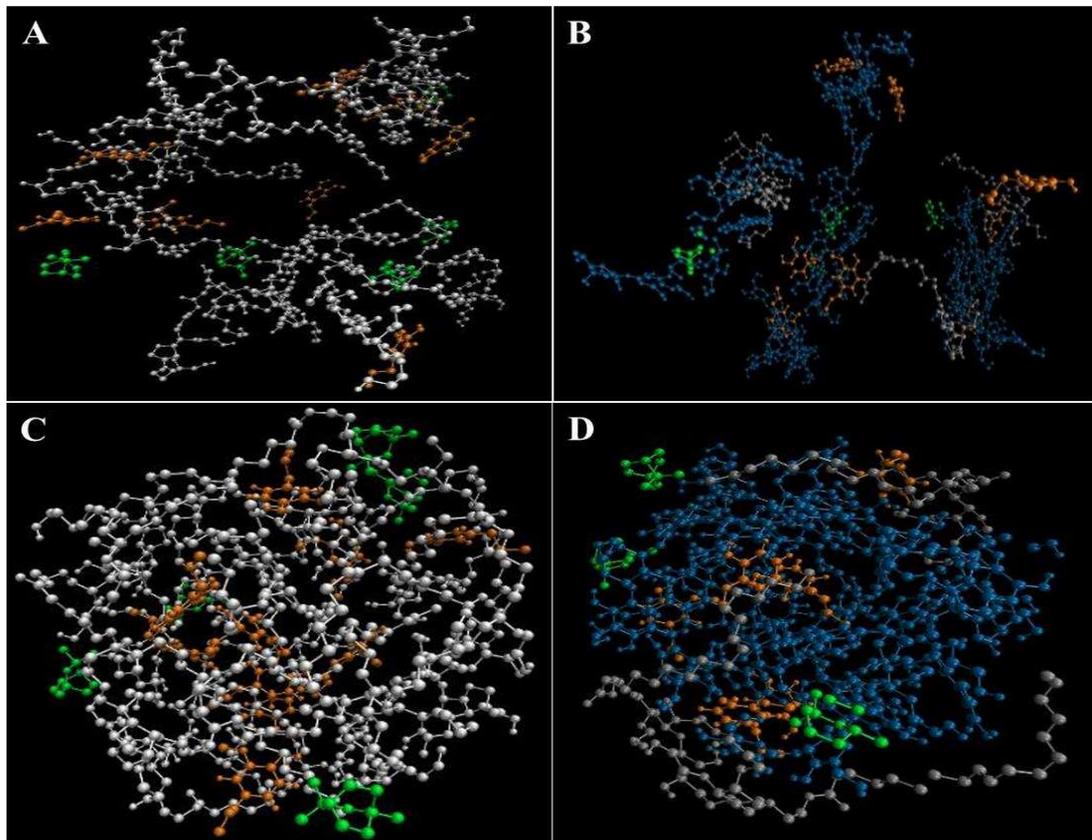
¹ARAUJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

um diâmetro médio de $22,70 \pm 8,27$ nm. Os diâmetros obtidos por AFM são bem menores quando comparados aos obtidos por DLS e NTA, o que pode estar relacionado à possível aglomeração de partículas em meio líquido, quando analisado por técnicas de espalhamento de luz (BRAR; VERMA, 2011; EATON *et al.*, 2017). Deve-se notar também que esses métodos são baseados em mecanismos totalmente diferentes e empregam diferentes processos de preparação de amostras, o que pode levar à discrepância dos resultados (LIU *et al.*, 2007).

5.4 Estudo computacional

A diferença observada no tamanho das nanopartículas em presença da goma do cajueiro foram melhor avaliadas através de métodos computacionais de dinâmica molecular. O processos foram realizados inicialmente mantendo os componentes do sistemas de forma bem dispersa, conforme apresentado na Figura 19A e 19B. Ao final das simulações, a formação de nanopartícula pôde ser observada para ambos os sistemas Figuras 19C e 19D.

Figura 19 – Sistemas simulados por dinâmica molecular; sistemas iniciais (tempo zero) (A) sem e (B) com goma do cajueiro; sistemas finais (C) sem e (D) com goma do cajueiro



Fonte: dados da pesquisa.

● cinza – tween 80, ● verde – 1,8 cineol (eucaliptol), ● laranja – eugenol, ● azul – goma do cajueiro.

Uma característica comum nos dois casos, com (FIGURAS 19C e 19D) e sem (FIGURAS 19A e 19B) a goma do cajueiro foi à permanência do 1,8-cineol em torno da superfície da nanopartícula, enquanto que o eugenol manteve-se mais emaranhado no interior do sistema. Além disso, na simulação em que há presença de GC observou-se uma não adesão de todos os componentes do sistema na nanopartícula, o que não foi observado para o outro sistema. No sistema em que não há presença da goma, verificamos uma totalidade de todos os resíduos pertencentes ao sistema na geração da estrutura final.

A presença da GC agrupa uma menor quantidade tanto de 1,8-cineol, eugenol e surfactante na estrutura final da nanopartícula formada. Provavelmente, uma menor quantidade de resíduos na formação da nanopartícula na presença da goma do cajueiro leve a uma menor estrutura, o que não significa menor efetividade da sua atividade em relação a ausência de GC. Corroborando com a análise do diâmetro hidrodinâmico do sistema por DLS onde o diâmetro médio sem a goma foi de até 3x superior (475,30 nm) do que o verificado na presença da goma (108 nm – 180 nm), independente do sistema utilizado.

Os diâmetros para medidos para as nanopartículas nos sistemas sem e com a goma foram de 37 nm e 28 nm, respectivamente. O fato de estas medidas terem sido realizados a partir de um processo clássico computacional deve ser considerando, uma vez que a quantidade molecular dos componentes não conferem as mesmas experimentais, são apenas equivalentes, ou proporcionalmente molares. O diâmetro da nanopartícula com a goma está de acordo com diâmetro médio verificada por AFM que corresponde a $22,70 \pm 8,27$ nm (FIGURA 18D).

5.5 Atividade antibacteriana

A concentração mais baixa de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo em poços ou tubos de microdiluição, detectada a olho nu, é chamada de Concentração Inibitória Mínima (CIM). A estimativa mais comum da atividade bactericida é a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), que é definida como a concentração que mata 99,9% ou mais dos inócuos iniciais, enquanto os agentes bacteriostáticos simplesmente inibem o crescimento bacteriano (SRIVASTAVA; FATIMA, 2021).

As concentrações inibitórias mínimas das bactérias foram analisadas com 1 e 37 dias de armazenamento (TABELA 4). A CIM do OE de *O. gratissimum* foi de $1,30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sem diferença entre as três bactérias testadas. No entanto, a CBM foi menor para as bactérias Gram-negativas *E. coli* ($2,59 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e *S. enterica* ($2,59 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) quando comparada com a Gram-positiva *S. aureus* ($20,72 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). No estudo realizado por Chimnoi *et al.* (2018) para

OE *O. gratissimum*, os valores de CIM obtidos para *E. coli* (2,0 mg·mL⁻¹) e *S. aureus* (2,0 mg·mL⁻¹) também não diferiram entre si, a CBM também foi inferior para *E. coli* (2,0 mg·mL⁻¹) em relação ao *S. aureus* (4,0 mg·mL⁻¹), que por sua vez foi inferior ao do presentes estudo. O efeito diferente para OE da mesma espécie é atribuído às diferenças nos constituintes químicos do óleo essencial. Embora, Chiminoi *et al.* (2018) tenha encontrado o eugenol (55,6%) em concentrações próximas ao do presente estudo, o segundo componente mais abundante foi o cis-ocimeno (13,9%), no presente estudo, o 1,8-cineol (29,55%) apresenta baixa atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (LI *et al.*, 2014), fato este, que pode estar relacionado ao elevado valor da CBM encontrada para *S. aureus*.

Tabela 4 - Valores de CIM e CBM das nanoemulsões e óleo essencial de *O. gratissimum* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*

Amostras	CIM - CBM (mg·mL ⁻¹)		
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. enterica</i> ATCC 14028
1 Dia			
NaGC	0,65-5,18	0,65-1,30	1,30-1,30
NbGC	0,65-0,65	0,65-5,18	1,30-1,30
37 Dias			
NaGC	0,65-5,18	0,65-1,30	1,30-1,30
NbGC	1,30-1,30	1,30-5,18	2,59-2,59
OE	1,30-20,72	1,30-2,59	1,30-2,59
GC	-	-	-

Fonte: Araujo *et al.* (2021, com adaptações)¹.

OE - óleo essencial. GC – Goma do cajueiro + Tween 80. Nanoemulsão formulada com goma do cajueiro e óleo essencial por métodos de baixa (NaGC) e alta (NbGC) de energia.

Como substâncias lipofílicas típicas, os OEs são capazes de atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática, tendo um efeito diferente nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GUTIÉRREZ-DEL-RÍO; FERNÁNDEZ; LOMBÓ, 2018). Prevê-se que as bactérias Gram-negativas tenham maior tolerância aos OEs do que as Gram-positivas, devido à barreira física criada pela camada de lipopolissacarídeo na membrana da parede celular

¹ARAUJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

externa que limitaria assim a difusão de compostos hidrofóbicos através dela, enquanto esta membrana extra complexa está ausente nas bactérias Gram-positivas, que são circundadas por uma parede de peptidoglicano espessa e não densa o suficiente para resistir a pequenas moléculas antimicrobianas, o que facilita o acesso à membrana celular. Além disso, as bactérias Gram-positivas podem facilitar a infiltração de compostos hidrofóbicos de OE devido às extremidades lipofílicas do ácido lipoteicoico presente na membrana celular (RAO *et al.*, 2019; SRIVASTAVA; FATIMA, 2021).

As análises antibacterianas para o OE de *O. gratissimum* quimitipo eugenol, verificou-se maior atividade antibacteriana dos OEs para espécies Gram-negativas (JOSHI, 2013; MELO *et al.*, 2019b; VASCONCELOS *et al.*, 2021). De acordo com Srivastava e Fatima (2021), geralmente, as propriedades biológicas dos óleos essenciais são determinadas por seus componentes principais. O que estaria de acordo com a ação do eugenol de forma isolada que apresentou maior atividade antibacteriana contra Gram-negativas, conforme verificado por Joshi (2013), Zhang *et al.* (2017), Jeyakumar e Lawrence (2021) sugerindo que o OE de *O. gratissimum* do quimiotipo eugenol, tem maior atividade bactericida contra bactérias Gram-negativas.

As nanoemulsões apresentaram melhores resultados em relação ao OE para *S. aureus* e *E. coli*, obtendo menores valores de CIM e CBM. Para *S. enterica*, o valor de CIM não foi diferente do observado para o OE, mas a ação bactericida foi potencializada nas nanoemulsões, o que pode ser verificado nos menores valores da CBM. A eficácia antimicrobiana da nanoemulsão em relação ao OE também foi verificada por outros estudos como Ozogul *et al.* (2020) para OE de tomilho, onde, os efeitos antimicrobianos das nanoemulsões de tomilho contra patógenos de origem alimentar foram significativamente maiores ($p < 0,05$) do que OE. Moghimi *et al.* (2016) ao converterem o óleo essencial de *Salvia* (*Salvia officinalis*) em uma nanoemulsão, observaram melhor atividade antibacteriana em relação ao OE não nanoestruturado. A nanoencapsulação do óleo de manjeriço (*Ocimum basilicum*) aumentou seu potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SILVA GÜNDEL *et al.*, 2018). Yazgan, Ozogul e Kuley (2019) ao convertetem o óleo essencial de limão em nanoemulsão, observaram que houve melhor atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar em relação ao OE, contudo, as nanoemulsões foram menos eficazes contra bactérias deteriorantes de peixes.

A reduzida propriedade hidrofóbica do óleo essencial na nanoemulsão poderia permitir que suas moléculas tivessem maior contato com a superfície das membranas celulares da bactéria, permitindo sua ruptura e o vazamento de constituintes celulares, aumentando o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais contra bactérias Gram-negativos (MOGHIMI *et al.*, 2016). Em geral, a eficácia da transferência de compostos lipofílicos bioativos para certos locais de ação é promovida devido à maior solubilidade em água das nanoemulsões (WAN *et al.*, 2018).

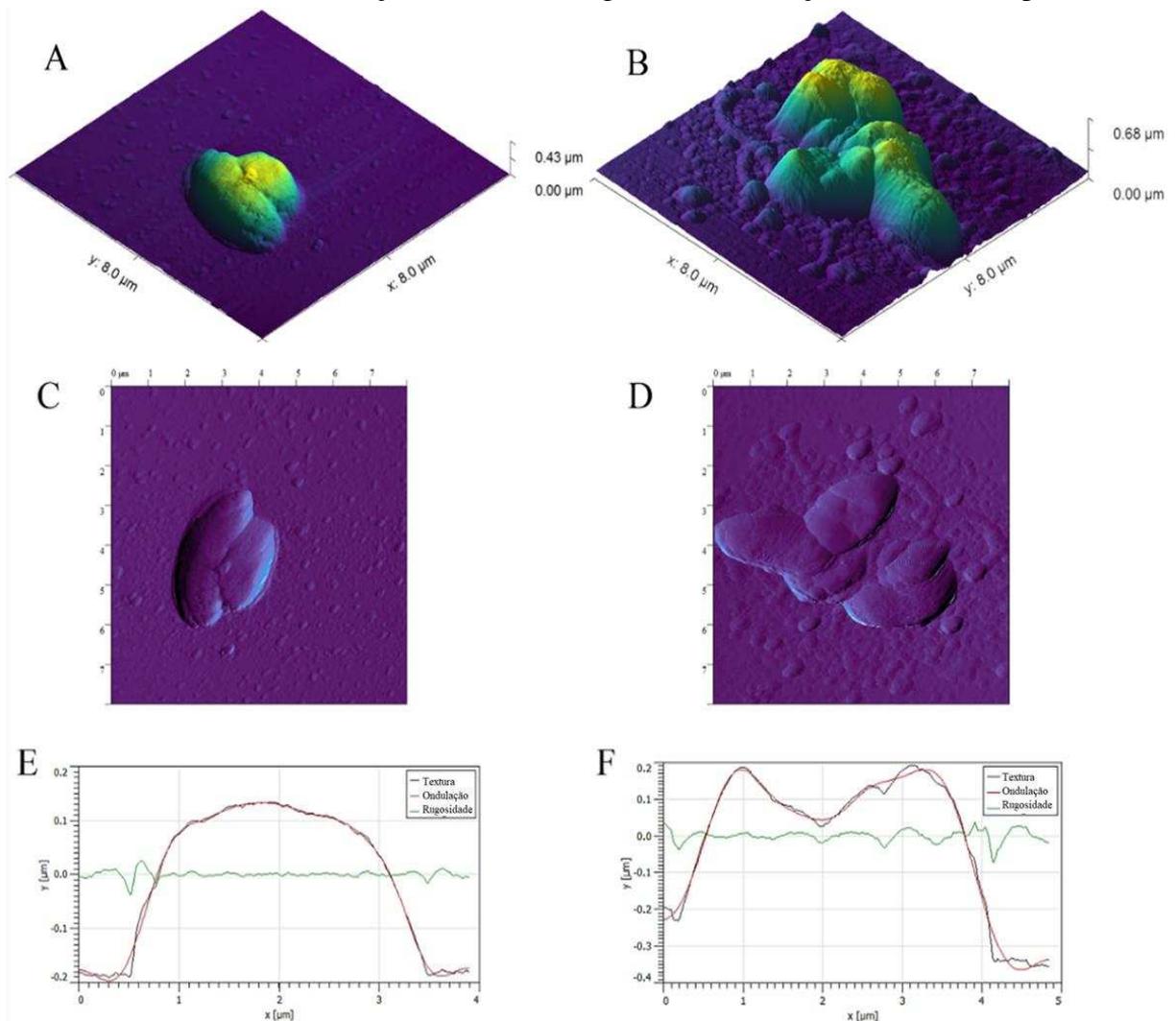
A goma do cajueiro e o surfactante não apresentaram efeito antibacteriano na concentração utilizada para a formulação das nanoemulsões, corroborando com Quelemes *et al.* (2017) e Araruna *et al.* (2020) para GC e Ozogul *et al.* (2020) e Moghimi *et al.* (2016) para Tween 80 nas concentrações da formulação proposta. Vale salientar que a GC purificada apresenta atividade antibacteriana com CIM de 30 mg/mL, apresentando maior atividade para bactérias Gram-positivas (CAMPOS *et al.*, 2012). Portanto, podemos inferir que a atividade antibacteriana das nanoemulsões está relacionada aos constituintes presentes no OE. Além disso, o encapsulamento do óleo essencial em nanoemulsão aumentou sua atividade antimicrobiana, conforme demonstrado pelo menor valor de CIM e CBM obtido para as nanoemulsões. Após 37 dias de armazenamento, houve diminuição da atividade antibacteriana da formulação NbGC, o que pode estar relacionado à redução do OE no sistema, conforme mostrado no Gráfico 1C. Assim, podemos concluir que a concentração de OE no sistema influencia diretamente no CIM e no CBM.

A microscopia de alta resolução, como a Microscopia de Força Atômica (AFM), pode revelar as consequências mais extremas da exposição a um composto antimicrobiano, ou seja, deformação das células que ocorrem por lise ou danos à parede celular (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Na Figura 20 através das imagens obtidas por AFM para *S. enterica* é possível observar que o perfil morfológico da bactéria mudou.

As Figuras 20A e 20C mostram o controle morfológico da célula, com as estruturas extracelulares características da bactéria. Devido à sua capacidade de formar biofilmes, a produção exacerbada de polissacarídeos capsulares, como o LPS (ANRIANY *et al.*, 2006; MALCOVA *et al.*, 2008), é comumente observada. Estruturas semelhantes também foram observadas após o tratamento com NaGC em concentração subCIM (FIGURA 20B e 20D). Porém, a morfologia da célula tratada mostra algumas elevações superficiais, bem como uma leve desorganização celular, apresentando 680 µm de altura, enquanto a testemunha apresenta apenas 430 µm.

As Figuras 20E e 20F mostram os padrões de ondulação da superfície das células bacterianas, provavelmente relacionados à arquitetura do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Esses resultados demonstram que, após tratamento com NaGC, os perfis de ondulação da superfície celular aumentaram, refletindo a rugosidade da membrana (BEAUSSART; EL-KIRAT-CHATEL,2019).

Figura 20 - Imagens AFM de *S. enterica*: Controle (bactéria não tratada) - imagem 3D (A); concentração sub-CIM - imagem 3D (B); controle (bactérias não tratadas) - imagem 2D (C); concentração sub-CIM - imagem 2D (D); (E) indica o histograma de rugosidade da superfície da célula bacteriana não tratada e (F) indica o histograma de rugosidade da superfície da célula bacteriana tratada na concentração sub-CIM. Imagens com resolução de 512×512 pixels

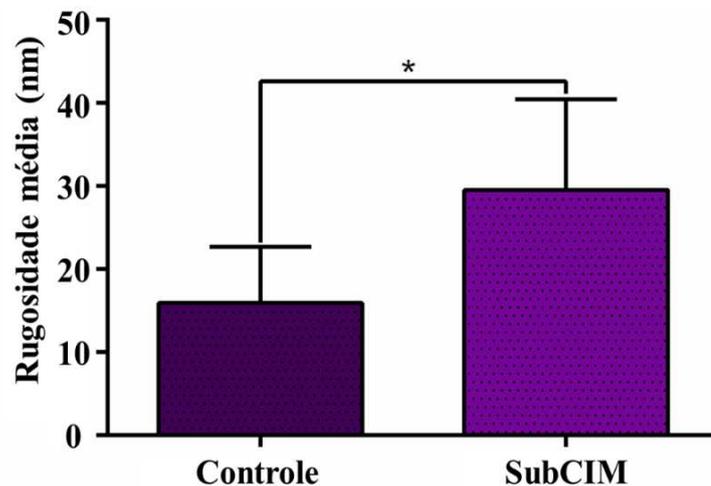


Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.

¹ARAUJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

Na Gráfico 2 é possível observar as medidas de rugosidade média (Ra) para bactérias tratadas e não tratadas (controle). O gráfico indica uma mudança significativa no Ra após o tratamento com NaGC, onde os valores de Ra foram $15,96 \pm 1,17$ nm para o grupo controle e $29,57 \pm 1,89$ nm para o grupo tratado na concentração subCIM. De acordo com Seow *et al.* (2014) os OEs podem reagir com lipídios na membrana celular bacteriana, aumentando a permeabilidade da membrana e perturbando as estruturas celulares originais. Conseqüentemente, ocorre um colapso da homeostase, conhecido como estado de constantes condições físicas e químicas internas, responsável pela manutenção dos sistemas vivos.

Gráfico 2 - Gráfico da rugosidade média de *S. enterica*: não tratada (controle) e tratada com NaGC (SubCIM)



Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.

Resultados expressos em média \pm desvio padrão. Significância estatística foi considerada quando $p < 0,0001$ (*).

A ação do *O. gratissimum* OE em bactérias corrobora estudos anteriores. Chimnoi *et al.* (2018) observaram que o OE causava ruptura da membrana celular, aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática e eventual morte bacteriana. O mesmo fato foi evidenciado por Ghosh, Mukherjee e Chandrasekaran (2014) e Devi *et al.* (2010) para o eugenol (constituente principal do OE). Devi *et al.* (2010) no estudo realizado contra *Salmonella typhi*, observaram a formação de poros na membrana plasmática, a perda da integridade da membrana e da superfície celular danificada, apoiando que o modo de ação bactericida do eugenol é através da ruptura da membrana e bloqueio adicional do crescimento celular. Esse

¹ARAUJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

efeito foi atribuído à sua capacidade de desnaturar proteínas e reagir com os fosfolipídios da membrana celular, alterando sua permeabilidade (BRIOZZO *et al.*, 1989).

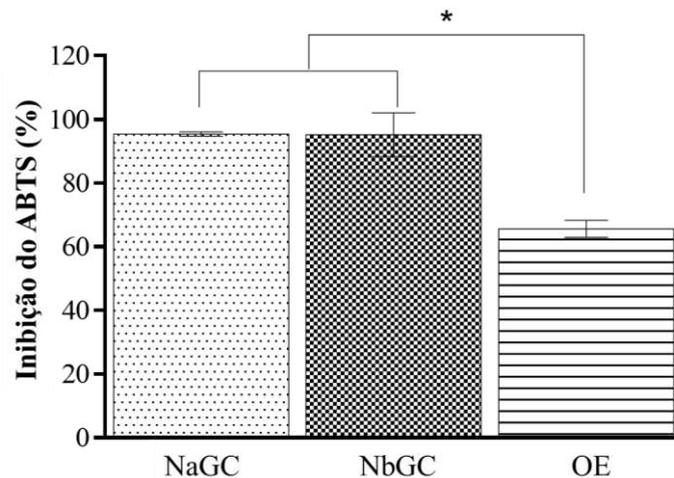
A perturbação na permeabilidade da membrana celular desativa as bactérias, permitindo a permeação de íons e moléculas orgânicas de fora da célula e, eventualmente, leva à perda da integridade da membrana, o que é fundamental para a sobrevivência microbiana. Quando a membrana celular é rompida, parte do conteúdo intracelular é liberada, o que pode ser usado para detectar a eficácia de um agente antimicrobiano. Além disso, o tamanho nanométrico das micelas tem a vantagem de aumentar as interações do composto ativo com a membrana celular das bactérias, esse mecanismo de ação pode contribuir para diminuição do desenvolvimento de cepas microbianas resistentes (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019; FALLEH *et al.*, 2020).

5.6 Atividade antioxidante

A capacidade de eliminar os radicais livres é uma das propriedades biológicas mais desejáveis das substâncias naturais (WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2019). Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie molecular capaz de existência independente que contém um elétron desemparelhado em um orbital atômico. A presença de um elétron desemparelhado resulta em certas propriedades comuns que são compartilhadas pela maioria dos radicais. Eles podem doar um elétron ou aceitar um elétron de outras moléculas, comportando-se, portanto, como oxidantes ou redutores (OLIVEIRA BARBOSA *et al.*, 2021). Os compostos antioxidantes podem prevenir, alterar e até acabar com reações oxidativas em concentrações relativamente baixas. A esse respeito, os OEs e seus constituintes desempenham um papel fundamental no exercício da atividade antioxidante (FALLEH *et al.*, 2020)

O ensaio de descoloração ABTS fornece uma boa estimativa da capacidade antioxidante, é aplicável a ambos os antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (AMINJAFARI *et al.*, 2016). Na Gráfico 3, a capacidade de eliminação do radical ABTS das nanoemulsões e OE é mostrada. O potencial antioxidante das nanoemulsões não foi estatisticamente diferente entre as amostras, mas foram superiores e estatisticamente diferentes do OE livre ($p = 0,0095$) na concentração. Corroborando com Doost *et al.* (2019), em seu estudo verificaram que a nanoemulsão melhorou a atividade antioxidante do timol em comparação ao timol livre.

Gráfico 3 - Atividade antioxidante das nanoemulsões e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* contra o radical ABTS (%)

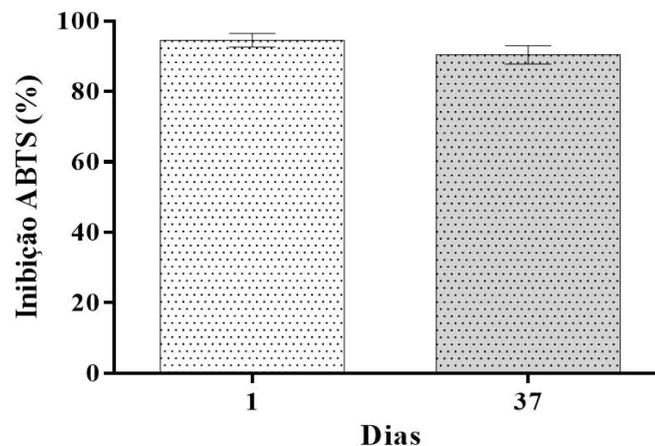


Fonte: Araujo *et al.* (2021)¹.

Resultados expressos em média \pm desvio padrão. Significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$ (*).

A NaGC manteve a atividade antioxidante por até 37 dias de armazenamento (GRÁFICO 4) não apresentando diferença significativa entre os dias analisados ($p = 0,2168$), o que corrobora com a EE% (GRÁFICO 1D) no qual o OE manteve-se estável na nanoemulsão, bem como sua atividade antioxidante permanecendo estável durante o armazenamento.

Gráfico 4 - Atividade antioxidante da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NaGC) com 1 e 37 dias após a síntese contra o radical ABTS (%).



Fonte: dados da pesquisa.

Resultados expressos em média \pm desvio padrão. Significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$ (*).

¹ ARAUJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021. ANEXO A.

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre, estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta. Na presença de componentes antioxidantes, com um doador de átomo de hidrogênio, DPPH é reduzido e sua cor violeta desaparece, produzindo uma solução amarelo/transparente. No teste de DPPH, a habilidade do óleo essencial agir como doador de átomos de hidrogênio ou elétrons na transformação de DPPH na forma reduzida de DPPH – H (difenilpicrilhidrazina) é medida espectrofotometricamente (CANSIAN *et al.*, 2010; DOOST *et al.*, 2019).

As concentrações do OE de *Ocimum gratissimum*, da nanoemulsão e do eugenol que é necessária para inibir 50% do radical DPPH é verificada na Tabela 5, o IC₅₀ do menor pro maior correspondeu: óleo essencial < nanoemulsão(NaGC) < eugenol.

Tabela 5 – IC₅₀ (µg·mL⁻¹) e índice de atividade antioxidante frente radical DPPH

Amostras	IC ₅₀	IAA
Nanoemulsão (NaGC)	2,86 ± 1,30 ^{ab}	13,78
Óleo essencial	5,12 ± 1,30 ^a	7,69
Eugenol	1,37 ± 0,40 ^b	28,82
Trolox	4,54 ± 0,82 ^a	8,68

Fonte: dados da pesquisa.

IC₅₀ - Concentração da solução necessária para inibir 50% do radical;

IAA - índice de atividade antioxidante. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p <0,05).

O IC₅₀ do OE de *O. gratissimum* foi 5,12 ± 1,30 µg·mL⁻¹, apresentando melhor atividade em relação ao verificado por Oliveira Barbosa *et al.* (2021), onde o OE (*O. gratissimum*) com o mesmo teor de eugenol (47,03%) apresentou menor atividade antioxidante (IC₅₀ = 6,53 µg·mL⁻¹), entretanto os autores verificaram menor expressão do eucaliptol (22,10%) em relação ao presente estudo (30,74%), sugerindo que o sinergismo entre os constituintes do OE (eugenol e eucaliptol) melhorou expressivamente a atividade do OE. Corroborando com Joshi (2021), os quais observaram que embora o eugenol estivesse presente em 85,71 ± 0,55% no OE, a atividade antioxidante do mesmo não foi melhor do que os de menores concentrações de eugenol, neste sentido, a divergência quantitativa de outras classes de constituintes dos óleos essenciais influenciam na atividade antioxidante.

O IC₅₀ do eugenol (1,37 µg·mL⁻¹) apresentou melhor atividade em relação ao trolox (padrão utilizado), e em relação ao encontrado por Oliveira Barbosa *et al.* (2021) e Joshi (2021), para OE de *O. gratissimum* correspondendo a IC₅₀ 1,91 e 1,49 µg·mL⁻¹.

O eugenol apresentou o IC_{50} de $1,37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a nanoemulsão de $2,86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o OE de $5,12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, verificou-se menor IC_{50} para a nanoemulsão em relação ao OE, contudo não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). O eugenol diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do OE do trolox, entretanto não diferiu da nanoemulsão.

De acordo com índice de atividade antioxidante (IAA) temos: eugenol >nanoemulsão >trolox >óleo essencial, todos apresentaram atividade antioxidante muito forte pois encontravam-se maiores que 2, conforme determinado por Scherer e Godoy (2009).

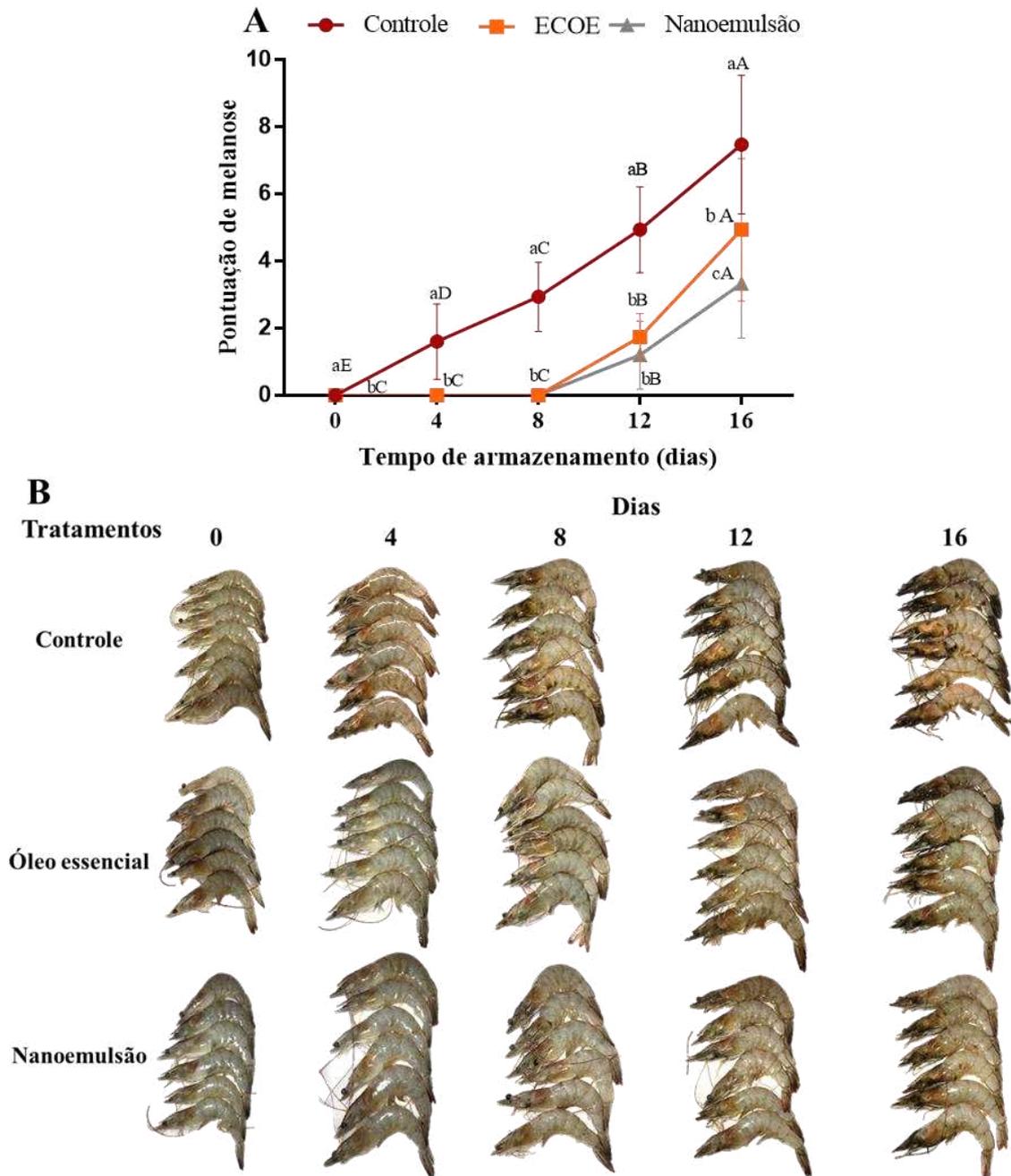
A atividade melhorada de OE na eliminação de radicais dos antioxidantes através do sistema nanoestruturado também foi observada por muitos outros pesquisadores (SUNDARARAJAN *et al.*, 2018; ONYEBUCHI; KAVAZ, 2019; DOOST *et al.*, 2019). Doost *et al.* (2019) atribuíram a maior atividade para nanoemulsão em relação ao timol, as moléculas de timol encapsuladas nas nanoemulsões que seriam colocadas na interface para que sejam mais prontamente expostas ao ambiente contínuo. Outra razão que pode ser proposta é a adição de água a qual interrompe a ligação e facilita a transferência de átomos de hidrogênio, levando a uma maior taxa de reação de DPPH e, portanto, a uma maior capacidade de eliminação de radicais (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

5.7 Avaliação da melanose

Os efeitos dos tratamentos na inibição da melanose dos camarões brancos do Pacífico refrigerados a 4°C são mostrados na Figura 21. As pontuações de todos os grupos aumentaram significativamente ($p < 0,05$) junto com o tempo de armazenamento, no entanto, variou entre os grupos. No início do armazenamento (dia 0), nenhuma melanose foi evidente nos camarões em todos os grupos.

Para os grupos tratados com a emulsão controle com óleo essencial (ECO) e a nanoemulsão (NaGC) a melanose foi evidenciada no 12º dia (FIGURA 21) e não foram estatisticamente diferentes entre si, contudo, apresentaram-se inferiores e significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$). No 16º dia todos os grupos diferiram estatisticamente entre si, sendo a melanose observada no grupo tratado com nanoemulsão avaliada como leve, a ECO como moderado e o grupo não tratado (controle) como severo.

Figura 21 – (A) A pontuação e (B) a evolução da melanose em camarões brancos do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) tratados com emulsão controle com óleo essencial (*Ocimum gratissimum*) (ECOIE) e nanoemulsão durante 16 dias de armazenamento a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$



Fonte: dados da pesquisa.

ECOIE – emulsão controle do óleo essencial.

Letras minúsculas (a-c) diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro do mesmo tempo e letras maiúsculas (A-D) diferentes indicam diferença significativa do tratamento em diferentes tempos de armazenamento teste de Tukey ($p < 0,05$).

A melanose também tornou-se evidente com 4 dias de armazenamento no estudo realizado por Sharifian *et al.* (2019) em *L. vannamei* armazenados em gelo, sem qualquer

tratamento e tratados com metabissulfito de sódio (1,25%), os camarões tratados com metabissulfito de sódio no 16º dia apresentaram a avaliação da melanose como moderada, entretanto, recebeu maior pontuação do que o verificado no presente estudo para a ECOE (FIGURA 21).

Senapati *et al.* (2017) ao avaliarem a vida de prateleira de *Litopenaeus vannamei* refrigerados a 2°C, os autores observaram maiores escores de melanose após 6 dias de armazenamento, neste ponto, a superfície do camarão foi severamente afetada pela melanose (60%-80%) e o produto não foi apreciado pelos avaliadores.

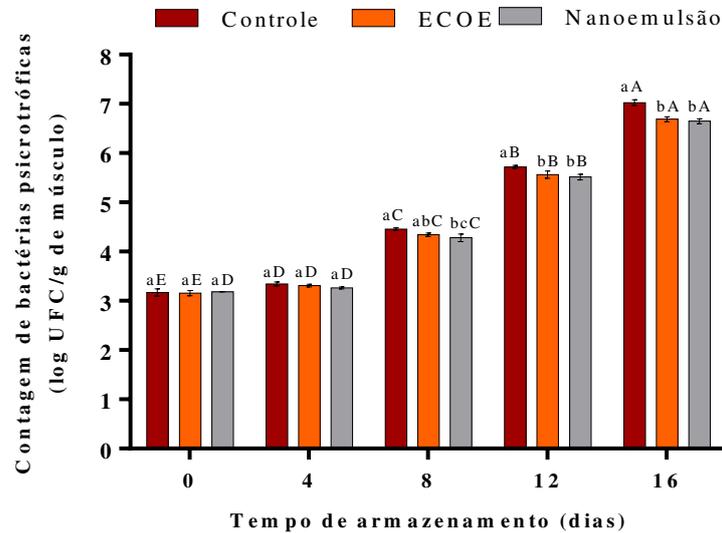
Alparslan *et al.* (2016) verificaram que durante o estudo de armazenamento, qualidade e vida útil de camarão rosa (*Parapenaeus longirostris*) de águas profundas armazenado a frio, o filme de gelatina comestível foi eficaz para manter as características sensoriais dos camarões e a incorporação de óleo essencial de folha de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) potencializou as características protetoras dos revestimentos de gelatina, mostrando-se eficazes na prevenção da melanose.

Para o camarão branco do Pacífico (*L. vannamei*) Laorenza e Harnkarnsujarit (2021) constataram que o grau de melanose aumentou acentuadamente em camarões embalados em filmes de controle, enquanto os filmes contendo OEs de citral e carvacrol mostraram melanose significativamente limitada. Maior concentração de OE resultou em menor grau de melanose, indicando eficiência do OE na inibição da melanose em camarões embalados, os autores correlacionam com o limitado crescimento microbiano pelos filmes contendo OEs e, portanto, reduziu o pró-PPO produzido por bactérias. A enzima PPO ocorre naturalmente sob as cascas de camarões e outros crustáceos, enquanto o pró-PPO se apresenta como zimógenos (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016).

5.8 Análise microbiológica dos camarões

A contagem inicial de bactérias psicrotólicas aeróbicas dos camarões foi de $3,17 \pm 0,07$ log UFC/g durante o armazenamento a $4^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, as bactérias apresentaram um crescimento lento até o 4º dia de armazenamento e sem diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$) com 0 e 4 dias (GRÁFICO 5). Entretanto, em relação ao dia de armazenamento, apenas a nanoemulsão não apresentou diferença entre o dia 0 e 4.

Gráfico 5 – Contagem de bactérias psicrotróficas (log UFC/g de músculo) de camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) durante 16 dias de armazenamento a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. As barras representam o desvio padrão



Fonte: dados da pesquisa.

ECO E – emulsão controle do óleo essencial.

Letras minúsculas (a-c) diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro do mesmo tempo e letras maiúsculas (A-E) diferentes indicam diferença significativa do tratamento em diferentes tempos de armazenamento teste de Tukey ($p < 0,05$).

No 8º dia de armazenamento houve uma elevação no crescimento bacteriano em todos os tratamentos, o grupo controle (sem tratamento) diferiu ($p < 0,05$) do grupo tratado com a nanoemulsão, já o grupo tratado com a emulsão controle com óleo essencial (ECO E) não diferiu do grupo controle e nem do grupo tratado com a nanoemulsão.

No tempo de 12 e 16 dias de armazenamento a ECO E e a nanoemulsão apresentaram menor e significativa ($p < 0,05$) contagem bacteriana em relação ao grupo sem tratamento (controle), dentro de um mesmo intervalo de tempo. Todavia, os grupos tratados com a ECO E e a nanoemulsão não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$).

No 16º dia o grupo controle apresentou contagem bacteriana de 7,03 log UFC/g, enquanto, os grupos tratados com a ECO E e nanoemulsão foram 6,68 e 6,65 log UFC/g, respectivamente (GRÁFICO 5). Ao utilizarmos o critério de deterioração do camarão até o limite de 7,0 log UFC/g, seguindo os limites microbiológicos recomendados pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos - ICMSF (2002), verificamos que o controle atingiu o limite com 16 dias de armazenamento, enquanto a ECO E e a nanoemulsão mantiveram-se abaixo do limite preconizado, correspondendo a níveis aceitáveis.

O processo de crescimento bacteriano nos camarões acentua-se após o abate. Isso ocorre porque a carga bacteriana do animal vivo está sob controle do sistema imunológico, quando ocorre a morte, o sistema imunológico entra em colapso e as bactérias se proliferam rapidamente (OKPALA; CHOO; DYKES, 2014). Os principais fatores de contaminação bacteriana do pescado está relacionada a contaminação da matéria-prima pelo meio ambiente e pelo processamento, e as condições de crescimento bacteriano (temperatura, aw, pH, interações microbianas, etc.) (LØVDAL, 2015).

Embora os grupos tratados com a ECOE e a nanoemulsão não apresentem diferença na inibição do crescimento das bactérias deteriorantes, os tratamentos mostram-se promissores antimicrobianos naturais. Haja vista, que os antimicrobianos naturais de alimentos são compostos bioativos que inibem o crescimento de microrganismos envolvidos na deterioração dos alimentos ou em doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014), podendo destruir e inibir o crescimento destes microrganismos e, conseqüentemente, melhorar a segurança do alimento para os consumidores, além de prolongar a vida útil dos produtos (LIAO *et al.*, 2021).

Sharifian *et al.* (2019) ao utilizarem florotaninos no estudo da qualidade de *L. vannamei*, verificaram que com 16 dias de armazenamento a maior contagem de bactérias psicotróficas também evidenciada no tratamento controle 9,55 log UFC/g, os tratamentos com florotanino (5%) e metabilssulfito (1,25%) também atingiram o limite máximo, correspondendo a 7,40 e 7,22 log UFC/g, respectivamente.

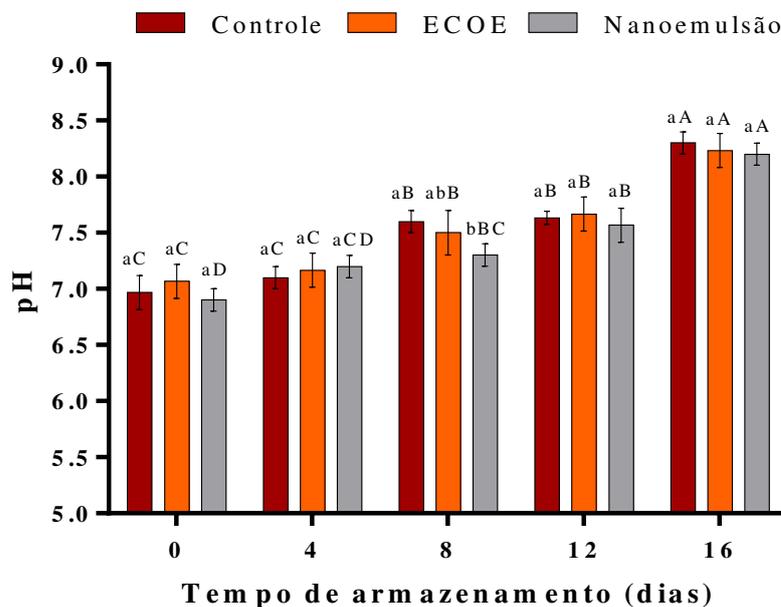
No estudo de Kim, Hong e Oh (2018) em *L. vannamei*, o grupo sem tratamento atingiu 7,80 log UFC/g após 6 dias, enquanto que os camarões tratados com alginato-quitosana e com extrato de toranja só excederam os critérios microbiológicos no dia 12. Para o camarão *Parapenaeus longirostris* o grupo não tratado aumentou significativamente ao longo do armazenamento e atingiu 7,4 log UFC/g após 8 dias de armazenamento, toda via, o tratamento com gelatina e OE de laranja não excedeu o limite ao final dos 14 dias de armazenamento (6,4 log UFC/g). A utilização de produtos naturais tem apresentado resultados promissores na qualidade de camarões refrigerados (ALPARSLAN *et al.*, 2016)

5.9 Análises físico-químicas dos camarões

5.9.1 pH

A análise de pH do camarão branco do Pacífico são apresentados no Gráfico 6, no início do armazenamento (tempo 0) o pH médio dos camarões frescos eram $7,0 \pm 0,2$, não apresentando diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Um aumento contínuo no pH foi observado em todos os grupos, os quais não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$) em quase todos os dias de armazenamento, com exceção do 8º dia, no qual a grupo tratado com nanoemulsão apresentou valor de pH inferior ao grupo controle (sem tratamento) e ao grupo tratado com a ECOE, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) apenas do grupo não tratado. Tal diferença também foi evidenciada na contagem de bactérias psicotróficas (GRÁFICO 5).

Gráfico 6 – Determinação de pH do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) durante 16 dias de armazenamento a $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$



Fonte: dados da pesquisa.

ECOE – emulsão controle do óleo essencial.

Letras minúsculas (a-b) diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro do mesmo tempo e letras maiúsculas (A-D) diferentes indicam diferença significativa do tratamento em diferentes tempos de armazenamento teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao final do tempo de armazenamento (16 dias) os valores de pH de todos os tratamentos estavam acima do estipulado pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária

de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o qual determina que o pH deve ser inferior a 7,85 nos crustáceos (BRASIL, 2020).

Os valores de pH após os tratamentos dos camarões com a ECOE e a nanoemulsão não sofreram alteração. Noordini *et al.* (2018) ao utilizarem OE de canela na conservação de camarão verificaram uma leve redução no pH, embora a ECOE e a nanoemulsão apresentem pH próximo de 4, não observou-se diferença nos tratamentos para o grupo que não recebeu tratamento (controle) (GRÁFICO 6).

Os valores iniciais de pH dos tratamentos corroborando com o verificado por Sharifian *et al.* (2019) para *L. vannamei*, sendo os mesmos inferiores ao encontrado por Li, Yang e Li (2016) $7,36 \pm 0,03$, e superiores a 6,62 e 6,32 verificado por Nirmal e Benjaku (2009) e Farajzadeh *et al.* (2016), respectivamente. Os diferentes valores de pH iniciais encontrados para a mesma espécie de camarão (*L. vannamei*), podem estar relacionadas a fatores como a dieta, estação do ano e nível de estresse durante a captura (LI; YANG; LI, 2016).

Noordini *et al.* (2018) verificaram que o metabissulfito de sódio (1.25%) apresentaram valor superior a legislação com 10 dias de armazenamento 7.81 ± 1.02 para o camarão *Penaeus monodon*. Enquanto o limite no presente estudo foi excedido no 16º dia (GRÁFICO 6).

O aumento no valor do pH indica o acúmulo de compostos alcalinos, como compostos de amônia e trimetilamina, que são principalmente resultantes da ação microbiana (SHARIFIAN *et al.*, 2019), entretanto, os valores de pH só apresentaram conformidade com o crescimento bacteriano (GRÁFICO 5) até o 8º dia de armazenamento. Na análise microbiológica com 12 e 16 dias os grupos tratados com a nanoemulsão e a ECOE foram inferiores e estatisticamente diferentes do grupo não tratado ($p < 0,05$), o que não foi evidenciado na análise de pH (GRÁFICO 6).

A Produção de bases voláteis pela deterioração das atividades de bactérias e alcalinidade dessas composições aumentariam o pH durante o período de armazenamento (VAKILI; YASINI ARDAKANI, 2017). Entretanto, não observou-se uma correlação entre o pH e a análise microbiológica dos tratamentos com a ECOE e a nanoemulsão após o 12º dia, essa não correlação, também também foi verificada em diversos estudos para a utilização de compostos naturais na qualidade do camarão (KIM; HONG; OH, 2018; VELU *et al.*, 2019; SAEIDI; AHARI; ANVAR, 2021).

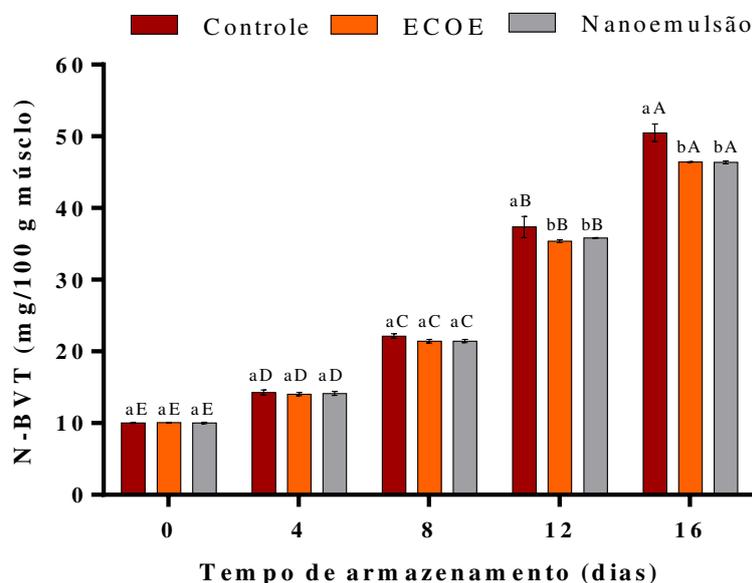
Rezaei *et al.* (2021) ao utilizarem um revestimento de carboximetilcelulose incorporado com nanoemulsão de OE cravo na qualidade do camarão (*Litopenaeus vannamei*) refrigerado, observaram uma menor contagem microbiana dos grupos tratados em comparação

com o grupo controle (sem tratamento), entretanto, o tratamento proposto apresentou o maior pH. Basiri *et al.* (2015) ao utilizarem extrato de romã em camarões observaram menor contagem bacteriana em relação ao grupo controle, porém o grupo controle apresentou o menor pH entre todas as amostras.

5.9.2 Nitrogênio das Bases Voláteis Totais (N-BVT)

O conteúdo inicial de N-BVT do camarão fresco foi $10,04 \pm 0,06$ mg N/100g de carne de camarão (GRÁFICO 7). Todos os tratamentos apresentaram um aumento gradativo e significativo ($p < 0,05$) durante os dias de armazenamento refrigerado, apresentando-se semelhantes até o 8º dia de armazenamento. A partir do 12º dia de armazenamento, os grupos tratados com a ECOE e a nanoemulsão apresentaram-se inferiores e diferentes ($p < 0,05$) do tratamento controle (não tratado), essa distinção também foi observada para a contagem total de bactérias psicrotóficas aeróbicas (GRÁFICO 5) no mesmo período.

Gráfico 7 – Análise do nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT) do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) durante 16 dias de armazenamento a $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$



Fonte: dados da pesquisa.

ECOE – emulsão controle do óleo essencial.

Letras minúsculas (a-b) diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro do mesmo tempo e letras maiúsculas (A-E) diferentes indicam diferença significativa do tratamento em diferentes tempos de armazenamento teste de Tukey ($p < 0,05$).

Embora os valores de N-BVT dos tratamentos com a ECOE e a nanoemulsão fossem inferiores ao dos camarões não tratados a partir do 12º dia, todos os tratamentos apresentaram valores superiores a 30 mg de nitrogênio/100g de tecido muscular, valor indexado para a qualidade do camarão pelo RIISPOA (BRASIL, 2020).

Baek, Lee e Oh (2021) verificaram que os valores para os grupos de camarão (*L. vannamei*) não revestido aumentaram gradualmente, o limite permitido foi excedido no 4º dia (37,21 mg/100g), contudo, as nanopartículas testadas não excederam o limite permitido até o 8º dia ($28,50 \pm 2,21$ mg/100g). Kim, Hong e Oh (2018) verificaram que os camarões não revestidos com tratamento de quitosana, alginato e extrato de toranja, os valores de N-BVT excederam o limite aceitável no dia 9 (30,14 mg/100g), mas todos os camarões revestidos permaneceram dentro do limite no mesmo período.

Alparslan *et al.* (2016) ao utilizarem gelatina OE da laranja na qualidade de camarão (*Parapenaeus longirostris*) verificaram que o controle, a gelatina e gelatina com OE excederam o valor limite aceitável nos dias 6, 8 e 10 de armazenamento, respectivamente.

A maioria dos produtos da pesca deteriorados tem altos níveis de nitrogênio de bases voláteis (N-BVT). O N-BVT inclui a medição de trimetilamina, dimetilamina, amônia e outros compostos associados à deterioração de produtos pesqueiros e aumenta conforme a deterioração progride, é considerado um indicador de frescor, que geralmente é encontrado no padrão comum de deterioração (OCAÑO-HIGUERA *et al.*, 2009; SHARIFIAN *et al.*, 2019).

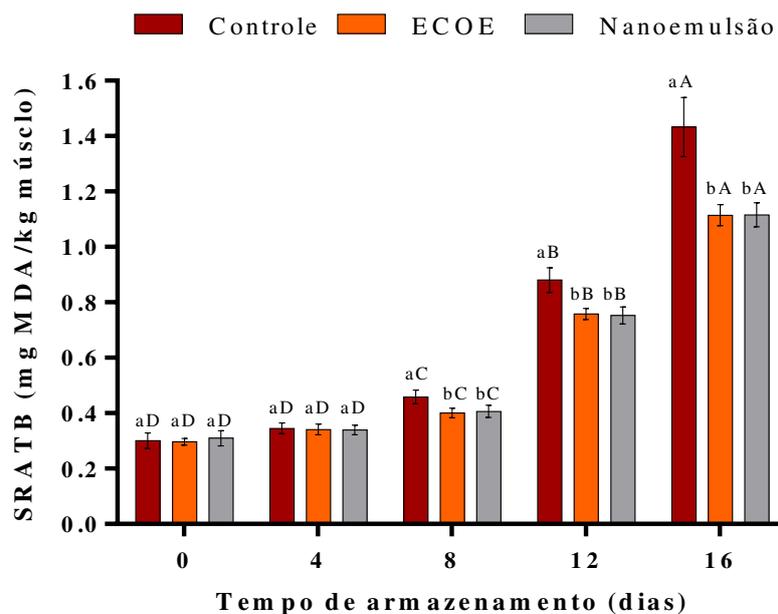
O aumento do valor de N-BVT em pescado está relacionado à deterioração microbiana e química (YUAN *et al.*, 2016). Diante dito, os menores valores de N-BVT estão relacionados com o menor crescimento de bactérias nos camarões tratados com a ECOE e nanoemulsão, evidenciado no Gráfico 5, o que pode ser atribuído à atividade inibitória dos tratamentos contra bactérias produtoras de N-BVT e enzimas proteolíticas no camarão (SHARIFIAN *et al.*, 2019).

Sae-leaw e Benjakul (2019) evidenciaram menor conteúdo de N-BVT pela inibição de microrganismos deteriorantes, pela contagens de *Pseudomonas*, bactérias produtoras de H₂S e Enterobacteriaceae. Diversos estudos tem correlacionado o menor crescimento bacteriano a menores valor de N-BVT para camarão (NIRMAL; BENJAKUL, 2009; LI; YANG; LI, 2016; KIM; HONG; OH, 2018; SHARIFIAN *et al.*, 2019; REZAEI *et al.*, 2021).

5.9.3 Substâncias Reativas Ao Ácido Tiobarbitúrico (SRATB)

Os valores iniciais de SRATB dos camarões frescos foram de $0,30 \pm 0,03$ mg MDA/kg de músculo no início do armazenamento. O valor de SRATB mantiveram-se sem alteração em todos os grupos até o 4º dia de armazenamento (GRÁFICO 8), entretanto, a partir do 8º dia de armazenamento ocorreu um aumento significativo para todos os tratamentos ($p < 0,05$), no qual o grupo não tratado (controle) apresentou um valor de SRATB significativamente ($p < 0,05$) maior que os grupos tratados com a ECOE e a nanoemulsão, os quais não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$), durante todo o período armazenado.

Gráfico 8 – Análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) durante 16 dias de armazenamento a $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$



Fonte: dados da pesquisa.

ECOE – emulsão controle do óleo essencial.

Letras minúsculas (a-b) diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro do mesmo tempo e letras maiúsculas (A-D) diferentes indicam diferença significativa do tratamento em diferentes tempos de armazenamento teste de Tukey ($p < 0,05$).

Um aumento significativo no dia 8 também foi observado por Nirmal e Banejal (2009) para camarão branco do Pacífico tratados com metabissulfito de sódio (1,25%) e com ácido ferúlico. Basiri *et al.* (2015) verificam tal comportamento a partir do 4º dia para camarões tratados com extratos de romã.

Além da melanose, a oxidação lipídica é outra reação deteriorante que causa a inaceitabilidade dos produtos de peixe e camarão. A deterioração em pescado causada por auto-oxidação foi avaliada pelo teor de malonaldeído (MDA), que é um produto secundário da oxidação lipídica. As substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (mg malonaldeído/kg) são amplamente utilizadas como um indicador do grau de oxidação lipídica (LI; YANG; LI, 2016; SHARIFIAN *et al.*, 2019). Os valores SRATB são comumente usados para determinar níveis relacionados à formação de produtos de oxidação secundária (KAROUI; HASSOUN, 2017).

O Brasil não possui uma legislação específica para SRATB, entretanto, a investigação deste parâmetro é um indicativo de qualidade, haja vista que valores elevados do mesmo podem provocar odor e sabor desagradáveis, rancidez e acúmulo de produtos indesejáveis. De acordo com Connell (1995), os valores de SRATB entre 1 e 2 mg MDA/kg podem estar associados as alterações de qualidade nas características sensoriais do pescado. No 16º dia o grupo controle apresentou valor de SRATB de $1,43 \pm 0,11$ mg MDA/kg de músculo, os grupos tratados com a ECOE e a nanoemulsão corresponderam a $1,11 \pm 0,04$ e $1,12 \pm 0,04$ mg MDA/kg de músculo, respectivamente. Noordini *et al.* (2018) verificaram maiores valores de SRATB ($1,83 \pm 0,64$ MDA/kg) para camarões tratados com metabissulfito de sódio (1,25%) no 10º dia de armazenamento.

O aumento do SRATB (GRÁFICO 8) ao longo do tempo, corrobora com o crescimento bacteriano verificado na análise microbiológica (GRÁFICO 5). Laorenza e Harnkarnsujarit (2021) afirmam que onde há crescimento limitado de bactérias psicrotólicas, portanto, a oxidação lipídica será limitada. Sae-leaw e Benjakul (2019) e Badee *et al.* (2020) também verificaram a oxidação lipídica reduzida de camarões tratados com extrato da folha do cajueiro e da manga, respectivamente. Os quais estavam de acordo com o crescimento reduzido dos microrganismos, como resultado os autores observaram o controle da oxidação de lipídios na carne de camarão, prevenindo o ranço.

Li, Yang e Li (2016) e Sharifian *et al.* (2019) verificaram um aumento do valor de SRATB durante o armazenamento de camarão branco do Pacífico, superior e significativamente maior para os camarões não tratados, em relação aos tratamentos com polifenóis e polissacarídeo (*Porphyra yezoensis*), e florotaninos (*Sargassum tenerimum*) obtidos das algas, respectivamente. Noordini *et al.* (2018) atribuem o aumento de SRATB em camarão ao resultando da desidratação parcial do tecido de camarão contendo ácidos graxos altamente poli-insaturados. O dano aos tecidos e a interação dos lipídios com o oxigênio do ar podem induzir a oxidação dos lipídios.

Os menores valores de SRATB para os grupos tratados como ECOE e nanoemulsão, também estariam de acordo com a atividade antioxidante verificada frente aos radicais livres (GRÁFICO 3 e TABELA 5), indicando a eficiência para prevenir a oxidação de lipídios. A diminuição da oxidação de lipídios em camarões, também foi evidenciada com o uso de OE de carvacrol, indicando alta eficiência dos OEs para prevenir a oxidação de lipídios (LAORENZA; HARNKARNSUJARIT, 2021). De acordo com Falleh *et al.* (2020), os menores valores de oxidação lipídica em tratamentos com OE, ocorreria pela dissolução do OE na fração lipídica no camarão, o que facilita sua atividade antioxidante e ajuda a evitar a oxidação ou rancificação lipídica (FALLEH *et al.*, 2020).

6 CONCLUSÃO

A formulação de uma nanoemulsão estável utilizando goma do cajueiro e o óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, foi possível utilizando-se baixa energia, através do método auto-emulsificação. A nanoemulsão apresentou pequeno diâmetro e foi eficiente na encapsulação, mantendo-se estável durante o armazenamento refrigerado. Além disto, as propriedades antibacteriana e antioxidante dos seus percussores foi potencializada na nanoestruturação.

O valor das bases nitrogenadas voláteis totais e do pH de todos os tratamentos, não apresentaram diferença entre o período analisado, e mantiveram-se dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira até o 8º e 12º dia, respectivamente. A nanoemulsão e a emulsão controle com óleo essencial (ECO) retardaram o crescimento de bactérias psicotróficas e a oxidação lipídica durante os 16 dias de armazenamento.

O surgimento da melanose nos camarões foi retardada em 4 dias nos tratamentos com a nanoemulsão e a ECO, em relação aos camarões não tratados. No 16º dia os camarões tratados com a nanoemulsão foram avaliados com a presença leve melanose. Verificando-se a nanoemulsão mostrou-se promissora para a conservação e inibição da melanose em camarões refrigerados.

REFERÊNCIAS

- ABDELRASOUL, Mona A.; EID, Asia R.; BADAWEY, Mohamed EI. Preparation, characterizations and antibacterial activity of different nanoemulsions incorporating monoterpenes: in vitro and in vivo studies. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Germany, v. 53, n. 7-8, p. 310-334, 2020.
- ABOUTORAB, Mahnoush *et al.* Nano-emulsion of saffron essential oil by spontaneous emulsification and ultrasonic homogenization extend the shelf life of shrimp (*Crocus sativus* L.). **Journal of Food Processing and Preservation**, United States, v. 45, n. 2, p. e15224, 2021.
- ACEVEDO-FANI, Alejandra; SOLIVA-FORTUNY, Robert; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 60, p. 12-22, 2017.
- ADAMS, Robert P. *et al.* **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2017.
- AGRA, Maria de Fátima; FREITAS, Patrícia França de; BARBOSA-FILHO, José Maria. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 17, p. 114-140, 2007.
- AKBAR, Shahid. *Ocimum gratissimum* L.(Lamiaceae). *In: Handbook of 200 Medicinal Plants*. Springer, Cham, 2020. p. 1327-1338.
- ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALPARSLAN, Yunus *et al.* Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatin. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 72, p. 457-466, 2016.
- AMEUR, Abderrahmane *et al.* Application of oil-in-water nanoemulsions based on grape and cinnamon essential oils for shelf-life extension of chilled flathead mullet fillets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, England, v. 102, n. 1, p. 105-112, 2021.
- AMINJAFARI, Akram *et al.* Antioxidant activity and protective role on protein glycation of synthetic aminocoumarins. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 19, n. 6, p. 43-48, 2016.
- AMORIM, Adriany *et al.* Copper nanoparticles stabilized with cashew gum: Antimicrobial activity and cytotoxicity against 4T1 mouse mammary tumor cell line. **Journal of biomaterials applications**, United Kingdom, v. 34, n. 2, p. 188-197, 2019.

- ANDRADE, Kelita; DE CARVALHO, Carlos WP; TAKEITI, Cristina Y. Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*): avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros**, São Carlos, v. 23, p. 667-671, 2013.
- ANDRADE, Luciana Trigueiro de; LACERDA, Maria de Fátima Alves Figueiredo de; VENTURA, Ana Paula Moraes. Uso do dióxido de enxofre na despesca e beneficiamento de camarão. **Revista Principia**, Paraíba, n. 28, p. 66-77, 2015.
- ANIS, Arfat; PAL, Kunal; AL-ZAHRANI, Saeed M. Essential oil-containing polysaccharide-based edible films and coatings for food security applications. **Polymers**, Switzerland, v. 13, n. 4, p. 575, 2021.
- ANRIANY, Yuda *et al.* Alteration of the rugose phenotype in waaG and ddhC mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. **Applied and environmental microbiology**, [S.l.], v. 72, n. 7, p. 5002-5012, 2006.
- ANWER, Iqra *et al.* Nanoemulsion of Virgin Rapeseed and Sesame Oil improve Oxidation Stability and Sensoric acceptability of Vacuum Packed Fish Fillets. **Research Square**, United States, 2021.
- ARARUNA, Felipe Bastos *et al.* Antibacterial application of natural and carboxymethylated cashew gum-based silver nanoparticles produced by microwave-assisted synthesis. **Carbohydrate polymers**, England, v. 241, p. 115260, 2020.
- ARAÚJO, I. M. S. *et al.* Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1588-1593, 2012.
- ARAUJO, Thais Danyelle Santos *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 193, p. 100-108, 2021.
- 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**, United Kingdom, v. 76, p. 1-12, 2017.
- ASWATHANARAYAN, Jamuna Bai; VITTAL, Ravishankar Rai. Nanoemulsions and their potential applications in food industry. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Switzerland, v. 3, p. 95, 2019.
- ATREVVY, Brice C. *et al.* Efficacy of some essential oils in the fight against strains of mould extracted from smoked fish taken in South Benin. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, India, v. 8, n. 3, p. 22-7, 2020.
- AZMI, Nor Azrini Nadiha *et al.* Nanoemulsions: factory for food, pharmaceutical and cosmetics. **Processes**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 617, 2019.

- BADEE, A. Z. M. *et al.* Prevention of quality loss and melanosis of white shrimp (*Penaeus spp.*), during cold storage by mango seed kernel extract. **Plant Archives**, India, v. 20, n. 2, p. 7639-7649, 2020.
- BAEK, Ji Hye; LEE, So-Young; OH, Se-Wook. Enhancing safety and quality of shrimp by nanoparticles of sodium alginate-based edible coating containing grapefruit seed extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 189, p. 84-90, 2021.
- BARANSKA, M. *et al.* Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of Eucalyptus essential oils. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 78, n. 5, p. 237-248, 2005.
- BARROS, A. B. *et al.* Evaluation of antitumor potential of cashew gum extracted from *Anacardium occidentale* Linn. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 154, p. 319-328, 2020.
- BASIRI, Sara *et al.* The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 60, n. 2, p. 1025-1033, 2015.
- BEAUSSART, Audrey; EL-KIRAT-CHATEL, Sofiane. Microbial adhesion and ultrastructure from the single-molecule to the single-cell levels by Atomic Force Microscopy. **The Cell Surface**, Holanda, v. 5, p. 100031, 2019.
- BELITZ, H. D.; GROSCHE, W.; SCHIEBERLE, P. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acríbia, 1997. p. 119-120.
- BLANCO-PADILLA, Adriana *et al.* Food antimicrobials nanocarriers. **The Scientific World Journal**, United States, v. 2014, 2014.
- BORTHAKUR, Priyakshree *et al.* Nanoemulsion: Preparation and its application in food industry. *In: Emulsions*. Academic Press, 2016. p. 153-191.
- BOVERHOF, Darrell R. *et al.* Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, United States, v. 73, n. 1, p. 137-150, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRAR, Satinder K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Netherlands, v. 30, n. 1, p. 4-17, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n° 23 de Agosto de 2019**, 2019a. Regulamento Técnico que fixa a identidade e os requisitos de qualidade que devem apresentar o camarão fresco, o camarão resfriado, o camarão congelado, o camarão descongelado, o camarão parcialmente cozido e o camarão cozido. Disponível em:

<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-23-de-20-de-agosto-de-2019-213001623>. Acesso em: 05 nov. 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Instrução Normativa N° 60, de 23 de Dezembro de 2019**, 2019b. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 28 nov. 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada n° 329 de 19 de Dezembro de 2019**, 2019c. Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em pescado e produtos de pescado. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-329-de-19-de-dezembro-de-2019-235414834>. Acesso em: 05 nov. 2021.

BRASIL. **Decreto N° 10.468, de 18 de Agosto de 2020**, Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-10.468-de-18-de-agosto-de-2020-272981604>. Acesso em: 20 out. 2021.

BRIOZZO, Jorge *et al.* Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. **Journal of Applied Bacteriology**, England, v. 66, n. 1, p. 69-75, 1989.

BRUM, Aline *et al.* Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, Netherlands, v. 468, p. 235-243, 2017.

CAMPOS, Débora A. *et al.* Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate polymers**, England, v. 90, n. 1, p. 270-274, 2012.

CANSIAN, Rogério Luis *et al.* Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera* fujita). **Food Science and Technology**, Brazil, v. 30, p. 378-384, 2010.

CARNEIRO DA CUNHA, Marcia Nieves *et al.* (2020). Potencial farmacológico da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.): um biopolímero do nordeste brasileiro. *In: Congresso Internacional de Agroindústria, 2020, Recife. Anais [...]. Recife: CIAGRO, 2020.* Disponível em: <https://ciagro.institutoidv.org/ciagro/uploads/638.pdf>. Acesso em: 20 out. 2021.

CARVALHO, Nathalia S. *et al.* Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, New York, v. 76, n. 3, p. 143-151, 2015.

CASTRO, Karina Neoob de Carvalho *et al.* In vitro efficacy of essential oils with different concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 27, p. 203-210, 2018.

CEBI, Nur; ARICI, Muhammet; SAGDIC, Osman. The famous Turkish rose essential oil: Characterization and authenticity monitoring by FTIR, Raman and GC–MS techniques combined with chemometrics. **Food Chemistry**, Barking, v. 354, p. 129495, 2021.

- CEYLAN, Zafer *et al.* Characterized nano-size curcumin and rosemary oil for the limitation microbial spoilage of rainbow trout fillets. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 134, p. 109965, 2020.
- CHANG, Yuhua; MCLANDSBOROUGH, Lynne; MCCLEMENTS, David Julian. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 61, n. 37, p. 8906-8913, 2013.
- CHIMNOI, Nitirat *et al.* Characterization of essential oil from *Ocimum gratissimum* leaves: Antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens. **Microbial pathogenesis**, England, v. 118, p. 290-300, 2018.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Approved Standard M07–A10**, 2015.
- COMISSÃO INTERNACIONAL DE ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS PARA ALIMENTOS - ICMSF. **Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002, 367 p.
- COMPANHIA DE NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Histórico Mensal Castanha-de-caju**, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-castanha-de-caju>. Acesso em: 05 out. 2021.
- CONNELL, J. J. **Intrinsic quality**. In: Control of fish quality. London, UK: Fishing News Books/Blackwell Science, p. 5-36, 1995.
- CRUCHO, Carina IC; BARROS, Maria Teresa. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 80, p. 771-784, 2017.
- CRUZ, Maria Josiene Farias; BEZERRA, Suzana Barbosa. Obtenção do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L para desenvolvimento de cosmético de limpeza facial. **Revista Diálogos Acadêmicos**, Fortaleza, v. 6, n. 2, 2017.
- DAMBOLENA, José S. *et al.* Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 410-414, 2010.
- DASGUPTA, Nandita; RANJAN, Shivendu; GANDHI, Mansi. Nanoemulsions in food: market demand. **Environmental Chemistry Letters**, United States, v. 17, n. 2, p. 1003-1009, 2019.
- DEGNON, René G. *et al.* Efficacité comparée des huiles essentielles de deux plantes aromatiques dans la conservation post-fumage du Chinchard (*Trachurus trachurus*). **Journal of Animal & Plant Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 2831-2839, 2013.

DEVI, K. Pandima *et al.* Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DHIFI, Wissal *et al.* Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, Switzerland, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DONSÌ, Francesco. Applications of nanoemulsions in foods. *In: Nanoemulsions*. Academic Press, p. 349-377, 2018.

DOOST, Ali Sedaghat *et al.* Production of thymol nanoemulsions stabilized using Quillaja Saponin as a biosurfactant: Antioxidant activity enhancement. **Food Chemistry**, Barking, v. 293, p. 134-143, 2019.

DOWNES, Frances Pouch; ITO, Keith. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington – DC: APHA, 4 ed, 676 p., 2001.

DUNG, P. N. T. *et al.* Extraction and analysis of chemical composition of *Ocimum gratissimum* L essential oil in the North of Vietnam. *In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing, 2021. p. 012092.

DURMUS, Mustafa. The effects of nanoemulsions based on citrus essential oils (orange, mandarin, grapefruit, and lemon) on the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets at $4\pm 2^\circ$ C. **Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. e12718, 2020.

DURMUŞ, Mustafa; ÖZOĞUL, Yeşim. The effects of nanoemulsions on the fatty acid profiles of sea bass fillets during storage at $2\pm 2^\circ$ C. **Su Ürünleri Dergisi**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 227-235, 2018.

EATON, P. *et al.* A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. **Ultramicroscopy**, Netherlands, v. 182, p. 179-190, 2017.

EL-SAYED, Hoda S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. **Food Chemistry**, Barking, v. 221, p. 196-204, 2017.

FALLEH, Hanen *et al.* Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, Barking, v. 330, p. 127268, 2020.

FANG, Hua *et al.* Prevention of quality loss and melanosis of white leg shrimp by *Sargassum horneri* extracts. **British Food Journal**, England, 2021.

FARAJZADEH, Fatemeh *et al.* The effect of chitosan-gelatin coating on the quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under refrigerated condition. **Food Control**, United Kingdom, v. 67, p. 163-170, 2016.

FENG, Jin *et al.* A Concise Review on Nano-emulsion Formation by the Phase Inversion Composition (PIC) Method. **Journal of Surfactants and Detergents**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 677-685, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei*. Cultured Aquatic Species Information Programme**, 2021. Text by Briggs, M. *In*: FAO Fisheries and Aquaculture Division. Rome. Disponível em: https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en. Acesso em: 25 out. 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 (SOFIA)**, 2020. *Sustainability in action*. Rome. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en/>. Acesso em: 25 out. 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology**, 2014. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology>. Acesso em: 05 nov. 2021.

FRISCH, M. J. *et al.* **Gaussian 09, Revision E.01**. Wallingford, CT, 2009.

GHARIBZAHEDI, Seyed Mohammad Taghi; MOHAMMADNABI, Sara. Effect of novel bioactive edible coatings based on jujube gum and nettle oil-loaded nanoemulsions on the shelf-life of Beluga sturgeon fillets. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 95, p. 769-777, 2017.

GHOSH, Vijayalakshmi; MUKHERJEE, Amitava; CHANDRASEKARAN, Natarajan. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Netherlands, v. 114, p. 392-397, 2014.

GIÃO, Maria S. *et al.* Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, England, v. 87, n. 14, p. 2638-2647, 2007.

GONÇALVES, Alex Augusto; OLIVEIRA, Adriene Rosceli Menezes. Melanosis in crustaceans: A review. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 65, p. 791-799, 2016.

GONDIM, Fladimir de Lima; SERRA, Daniel Silveira; CAVALCANTE, Francisco Sales Ávila. Effects of eucalyptol in respiratory system mechanics on acute lung injury after exposure to short-term cigarette smoke. **Respiratory physiology & neurobiology**, Netherlands, v. 266, p. 33-38, 2019.

GREINER, Johannes F.-W. *et al.* 1, 8-Cineol inhibits nuclear translocation of NF- κ B p65 and NF- κ B-dependent transcriptional activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1833, n. 12, p. 2866-2878, 2013.

GRIGORIEV, Dmitry O.; MILLER, Reinhard. Mono- and multilayer covered drops as carriers. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 48-59, 2009.

GUO, Mingming *et al.* Synergistic antibacterial effects of ultrasound and thyme essential oils nanoemulsion against *Escherichia coli* O157: H7. **Ultrasonics sonochemistry**, Amsterdam, v. 66, p. 104988, 2020.

GURPREET, K.; SINGH, S. K. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.] v. 80, n. 5, p. 781-789, 2018.

GUTIÉRREZ-DEL-RÍO, Ignacio; FERNÁNDEZ, Javier; LOMBÓ, Felipe. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: Terpenoids, polyphenols and thiols. **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 309-315, 2018.

HASANI, Shirin; OJAGH, Seyed Mahdi; GHORBANI, Mohammad. Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 115, p. 143-151, 2018.

HASSOUN, Abdo; ÇOBAN, Özlem Emir. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 68, p. 26-36, 2017.

HE, Xiaojia; DENG, Hua; HWANG, Huey-min. The current application of nanotechnology in food and agriculture. **Journal of food and drug analysis**, Taiwan, v. 27, n. 1, p. 1-21, 2019.

HERCULANO, Emanuele D. *et al.* Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 61, n. 2, p. 484-491, 2015.

HOUINSOU, R. de L. *et al.* Antimicrobial activities of essential oil extracted from leaves of *ocimum gratissimum* L. against pathogenic and adulterated microorganisms associated to tomato in Benin. **International Journal of Biosciences (IJB)**, Bangladesh, v. 2, n. 11, p. 90-100, 2012.

HYLDGAARD, Morten; MYGIND, Tina; MEYER, Rikke Louise. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 12, 2012.

HZOUNDA, Jean Baptiste Fokou *et al.* **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 80, p. 101-108, 2016.

IBRAHIM, A. N. *et al.* Influence of *Ocimum gratissimum* (Scent Leaf) on the Organoleptic Acceptability and Shelf Stability of Yoghurt. **Asian Food Science Journal**, India, p. 28-44, 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - Métodos Físicos e Químicos**. 4. ed. São Paulo: IAL, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 48, p.1-12, 2020.

JAISWAL, Manjit; DUDHE, Rupesh; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, Germany, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2015.

JEYAKUMAR, G. Ebenezer; LAWRENCE, Rubina. Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against *Escherichia coli*. **Journal of Herbal Medicine**, Amsterdam, v. 26, p. 100406, 2021.

JOSHI, R. K. Chemical composition, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum*, *O. sanctum* and their major constituents. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, Bombay, v. 75, n. 4, p. 457, 2013.

JOSHI, Rajesh K. Antioxidant Activity Influenced by Seasonal Variation of Essential Oil Constituents of *Ocimum gratissimum* L. **ACS Food Science & Technology**, Washington, 2021.

JU, Jian *et al.* The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food. **Critical reviews in food science and nutrition**, United States, v. 59, n. 20, p. 3281-3292, 2019.

KARAMKHANI, M.; ANVAR, S. A. A.; ATAEE, M. The use of active edible coatings made from a combination of *Lepidium sativum* gum and Carvacrol to increase shelf life of farmed shrimp kept under refrigerator condition. **Iranian Journal of Aquatic Animal Health**, [s. l.] v. 4, n. 2, p. 55-72, 2018.

KAROUI, Romdhane; HASSOUN, Abdo. Efficiency of rosemary and basil essential oils on the shelf-life extension of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) fillets stored at 2 C. **Journal of AOAC International**, England, v. 100, n. 2, p. 335-344, 2017.

KAUR, Khushwinder *et al.* Physicochemical and cytotoxicity study of TPGS stabilized nanoemulsion designed by ultrasonication method. **Ultrasonics sonochemistry**, [s. l.], v. 34, p. 173-182, 2017.

KIM, Jin-Hee; HONG, Woo-sung; OH, Se-Wook. Effect of layer-by-layer antimicrobial edible coating of alginate and chitosan with grapefruit seed extract for shelf-life extension of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) stored at 4 C. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 120, p. 1468-1473, 2018.

KIMBUATHONG, Netchanok; LEELAPHIWAT, Pattarin; HARNKARNSUJARIT, Nathdanai. Inhibition of melanosis and microbial growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using high CO₂ modified atmosphere packaging. **Food Chemistry**, Barking, v. 312, p. 126114, 2020.

KOMAIKO, Jennifer; MCCLEMENTS, David Julian. Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: Hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. **Journal of colloid and interface science**, United States, v. 425, p. 59-66, 2014.

KOROCH, Adolfina R.; SIMON, James E.; JULIANI, H. Rodolfo. Essential oil composition of purple basil, their reverted green varieties (*Ocimum basilicum*) and their associated biological activity. **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 107, p. 526-530, 2017.

KOSKER, Ali Rıza. The effects of nanoemulsions based on citrus essential oils on the formation of biogenic amines in trout fillets stored at $4\pm 2^{\circ}$ C. **Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. e12762, 2020.

KUJUR, Anupam *et al.* Microencapsulation of Gaultheria procumbens essential oil using chitosan-cinnamic acid microgel: Improvement of antimicrobial activity, stability and mode of action. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 86, p. 132-138, 2017.

KUMAR, Ashish; LAL, Raj Kishori. The consequence of genotype \times environment interaction on high essential oil yield and its composition in clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). **Acta Ecologica Sinica**, Beijing, 2021.

KUMAR, Manish *et al.* Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: a review. **Preventive nutrition and food science**, Pusan, v. 24, n. 3, p. 225, 2019.

LAHIDJANI, Leila Khoshbouy; AHARI, Hamed; SHARIFAN, Anousheh. Influence of curcumin-loaded nanoemulsion fabricated through emulsion phase inversion on the shelf life of *Oncorhynchus mykiss* stored at 4 C. **Journal of Food Processing and Preservation**, United States, v. 44, n. 8, p. e14592, 2020.

LANDRY, Kyle S. *et al.* Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157: H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 187, p. 15-21, 2014.

LAORENZA, Yeyen; HARNKARNSUJARIT, Nathdanai. Carvacrol, citral and α -terpineol essential oil incorporated biodegradable films for functional active packaging of Pacific white shrimp. **Food Chemistry**, Barking, v. 363, p. 130252, 2021.

LEMOS, Janine de Aquino *et al.* Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 55-58, 2005.

LI, Jinglei *et al.* Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. **Food Hydrocolloids**, United States, v. 60, p. 138-147, 2016.

LI, Li *et al.* Antibacterial activity of leaf essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum*. **International journal of clinical and experimental medicine**, United States, v. 7, n. 7, p. 1721, 2014.

LI, Po-Hsien; LU, Wen-Chien. Effects of storage conditions on the physical stability of d-limonene nanoemulsion. **Food Hydrocolloids**, United States, v. 53, p. 218-224, 2016.

LI, Yingchang; YANG, Zhongyan; LI, Jianrong. Shelf-life extension of Pacific white shrimp using algae extracts during refrigerated storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, England, v. 97, n. 1, p. 291-298, 2016.

LIAO, Wei *et al.* Nanoencapsulation of Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: An Overview. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 13, p. 5778, 2021.

LIMA, Tayonara S. *et al.* Cineole-containing nanoemulsion: Development, stability, and antibacterial activity. **Chemistry and Physics of Lipids**, Amsterdam, v. 239, p. 105113, 2021.

LISBOA, Cristiane F. *et al.* Chemical composition of *Lippia origanoides* Kunt. and *Ocimum gratissimum* L. essential oils stored at -20° C. **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 151, p. 112485, 2020.

LIU, Jie *et al.* Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization. **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 340, n. 1-2, p. 153-162, 2007.

LØVDAL, Trond. The microbiology of cold smoked salmon. **Food Control**, United Kingdom, v. 54, p. 360-373, 2015.

LUO, Yangchao; WANG, Qin; ZHANG, Yaqiong. Biopolymer-based nanotechnology approaches to deliver bioactive compounds for food applications: A perspective on the past, present, and future. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 68, n. 46, p. 12993-13000, 2020.

MAGONOV, S. N.; ELINGS, V.; WHANGBO, M.-H. Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. **Surface science**, [s. l.], v. 375, n. 2-3, p. L385-L391, 1997.

MALCOVA, M. *et al.* Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: identification of a new colony morphology type and the role of SGII in biofilm formation. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 3-4, p. 360-366, 2008.

MALLE, P.; TAO, S. H. Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. **Journal of Food Protection**, United States, v. 50, n. 9, p. 756-760, 1987.

MARCHESE, Anna *et al.* Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical reviews in microbiology**, England, v. 43, n. 6, p. 668-689, 2017.

MBEGBU, N. N.; NWAJINKA, C. O.; AMAEFULE, D. O. Thin layer drying models and characteristics of scent leaves (*Ocimum gratissimum*) and lemon basil leaves (*Ocimum africanum*). **Heliyon**, London, v. 7, n. 1, p. e05945, 2021.

MCCLEMENTS, David Julian *et al.* Nanoemulsion-based technologies for delivering natural plant-based antimicrobials in foods. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Switzerland, v. 5, p. 35, 2021.

MELO, Ramaiana Soares *et al.* Chemical Composition and antimicrobial effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. essential oil against multidrug-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Molecules**, Switzerland, v. 24, n. 21, p. 3864, 2019a.

MELO, Ana Paula Zapelini *et al.* Synthesis and characterization of zein nanoparticles loaded with essential oil of *Ocimum gratissimum* and *Pimenta racemosa*. **Materials Research Express**, Bristol, v. 6, n. 9, p. 095084, 2019b.

MOGHIMI, Roya *et al.* Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**, Barking, v. 194, p. 410-415, 2016.

MONTERO, Pilar; LOPEZ-CABALLERO, María Elvira; PEREZ-MATEOS, Miriam. The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). **Journal of Food Science**, Malden, v. 66, n. 8, p. 1201-1206, 2001.

MOTHÉ, Cheila G. *et al.* Cashew tree gum: a scientific and technological review. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, India, v. 2, n. 2, p. 238716, 2017.

MOURA NETO, Érico de *et al.* Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 10, p. 1953-1960, 2011.

NAGARAJU, Pramod G. *et al.* Influence of sodium caseinate, maltodextrin, pectin and their Maillard conjugate on the stability, in vitro release, anti-oxidant property and cell viability of eugenol-olive oil nanoemulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 183, p. 158-170, 2021.

NAKAMURA, Celso Vataru *et al.* In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 579-586, 2004.
NAYAK, Amit Kumar *et al.* Cashew gum in drug delivery applications. *In: Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications*. Academic Press, 2019. p. 263-283.

NDASI, Ngwasiri Pride *et al.* Comparative Preservative Potential of Essential Oils of *Ocimum gratissimum* from Bambili of the North West and Mbonge of the South West Regions of Cameroon on *Scomber scombrus*. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, India, p. 20-29, 2021.

NEJAD, Solmaz Mohammadi; ÖZGÜNEŞ, Hilal; BAŞARAN, Nursen. Pharmacological and toxicological properties of eugenol. **Turkish journal of pharmaceutical sciences**, Istanbul, v. 14, n. 2, p. 201, 2017.

NGUEFACK, J. *et al.* Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 329-334, 2004.

NICOLAU, Lucas AD *et al.* Cashew gum, a biopolymer, topically protects oesophageal mucosa in non erosive reflux disease: A promising translational study. **Carbohydrate polymers**, England, v. 226, p. 115205, 2019.

NIRMAL, Nilesh Prakash *et al.* Undesirable enzymatic browning in crustaceans: Causative effects and its inhibition by phenolic compounds. **Critical reviews in food science and nutrition**, United States, v. 55, n. 14, p. 1992-2003, 2015.

NIRMAL, Nilesh Prakash; BENJAKUL, Soottawat. Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. **Food Chemistry**, Barking, v. 116, n. 1, p. 323-331, 2009.

NJOKU, Obioma U. *et al.* Antioxidant properties of ocimum gratissimum (scent leaf). **New York Science Journal**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 98-103, 2011.

NOORDIN, Wan Norhana Md *et al.* The effects of essential oils and organic acids on microbiological and physicochemical properties of whole shrimps at refrigerated storage. **Current Research in Nutrition and Food Science**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 273, 2018.

NOORDIN, Wan Norhana Md *et al.* The Effects of Garlic Oil and Tartaric Acid on the Quality of Shrimp Stored at 4° C. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, Indonesia, v. 16, n. 1, p. 11-18, 2021.

NYANGENA, Decrah M.; WANGILA, Phanice T.; CHERUTOI, Jackson K. Effect of Manihot esculenta Edible Coating Blended with African Basil (*Ocimum gratissimum*) Essential Oil on the Shelf-Life of Mango Fruits. **Asian Journal of Applied Chemistry Research**, [s. l.] v. 9, n. 4, p. 17-30, 2021.

OCAÑO-HIGUERA, V. M. *et al.* Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. **Food Chemistry**, Barking, v. 116, n. 4, p. 933-938, 2009.

OKOYE, Ebere I.; ONYEKWELI, Anthony O.; FATOKI, Omotola O. Evaluation of LD50 of cashew gum and the comparative study of its functionality in cotrimoxazole granule and tablet formulations. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 156-164, 2012.

OKPALA, Charles Odilichukwu R.; CHOO, Wee Sim; DYKES, Gary A. Quality and shelf life assessment of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) freshly harvested and stored on ice. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 55, n. 1, p. 110-116, 2014.

OLIVEIRA BARBOSA, Celma *et al.* Chemical composition and antioxidant potential of essential oils from different *Ocimum* species (Basil). **Brazilian Journal of Development**, São José dos Pinhais, v. 7, n. 3, p. 24422-24442, 2021.

OLIVEIRA CARDOSO, K. N. *et al.* Modelagem Molecular: O Uso De Novas Tecnologias Como Ferramentas Complementares no Ensino e Aprendizagem de Química Orgânica. *In: 53° Congresso Brasileiro de Química*. 2013, Rio de Janeiro. **Anais [...]**. Rio de Janeiro: CBQ, 2013. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/6/2534-16651.html>. Acesso em: 10 dez. 2021.

OLIVEIRA, Antônia Carla de Jesus *et al.* Solvent-free production of phthalated cashew gum for green synthesis of antimicrobial silver nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, England, v. 213, p. 176-183, 2019.

OLIVEIRA, Erick F.; PAULA, Haroldo CB; DE PAULA, Regina CM. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Netherlands, v. 113, p. 146-151, 2014.

OLIVEIRA, L. B. S. *et al.* Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, p. 511-523, 2016.

OLIVEIRA, Marília A. *et al.* Packaging with cashew gum/gelatin/essential oil for bread: Release potential of the citral. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 23, p. 100431, 2020.

ONYEBUCHI, Confidence; KAVAZ, Doğa. Chitosan and N, N, N-Trimethyl chitosan nanoparticle encapsulation of *Ocimum gratissimum* essential oil: Optimised synthesis, in vitro release and bioactivity. **International journal of nanomedicine**, Auckland, v. 14, p. 7707, 2019.

OOSTENBRINK, Chris *et al.* A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of computational chemistry**, New York, v. 25, n. 13, p. 1656-1676, 2004.

OOSTENBRINK, Chris *et al.* Validation of the 53A6 GROMOS force field. **European Biophysics Journal**, Berlin, v. 34, n. 4, p. 273-284, 2005.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE PADRONIZAÇÃO - ISO. **Nanotechnologies, Vocabulary Part 1**. Core terms, 2015. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:en>. Acesso em: 10 out. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Food safety. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 28 nov. 2021.

OTWELL, W. S.; MARSHALL, M. R. Screening alternatives to sulphating agents to control shrimp melanosis (black spot). **Florida Sea Grant Technical Paper**, [s. l.], v. 46, p. 1-20, 1986.

OZOGUL, Yesim *et al.* Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 36, p. 100635, 2020.

ÖZOGUL, Yesim *et al.* Comparative study of nanoemulsions based on commercial oils (sunflower, canola, corn, olive, soybean, and hazelnut oils): Effect on microbial, sensory, and chemical qualities of refrigerated farmed sea bass. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 33, p. 422-430, 2016.

OZOGUL, Yesim *et al.* Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 75, p. 677-684, 2017b.

OZOGUL, Yesim *et al.* The combined impact of nanoemulsion based on commercial oils and vacuum packing on the fatty acid profiles of sea bass fillets. **Journal of Food Processing and Preservation**, United States, v. 41, n. 6, p. e13222, 2017a.

ÖZTÜRK, Bengü. Nanoemulsions for food fortification with lipophilic vitamins: Production challenges, stability, and bioavailability. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 119, n. 7, p. 1500539, 2017.

PANDIYAN, Praveenkumar; SONI, Ajeet; ELUMALAI, Preetham. Effects of Lemon and Pomelo peel extracts on quality and melanosis of Indian white prawn during chilled storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, United States, p. e15952, 2021.

PATEL, Aakash; GHOSH, Vijayalakshmi. Thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil-based antimicrobial nanoemulsion formulation for fruit juice preservation. *In: SADHUKHAN P., PREMI S. (eds) Biotechnological Applications in Human Health*. Springer, Singapore, p. 107-14, 2020.

PATEL, Mrunali R. *et al.* Investigating effect of microemulsion components: in vitro permeation of ketoconazole. **Pharmaceutical development and technology**, London, v. 16, n. 3, p. 250-258, 2011.

PATHAK, M. Nanoemulsions and their stability for enhancing functional properties of food ingredients. *In: Nanotechnology applications in food*. Academic Press, 2017. p. 87-106.

PAUL, Sujata; EL BETHEL LALTHAVEL HMAR, James H.; ZOTHANTLUANGA, Hemanta Kumar Sharma. Essential oils: a review on their salient biological activities and major delivery strategies. **Microcirculation**, [s. l.], v. 5, p. 9, 2020.

PAULA PESSOA, Pedro F. Adeodato de Paula; BANDEIRA, Clódion Torres. **Goma do cajueiro**: nova alternativa de renda para a cajucul tura nordestina. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1993.

PAULA, Haroldo CB *et al.* Protective effect of cashew gum nanoparticles on natural larvicide from *Moringa oleifera* seeds. **Journal of applied polymer science**, [s. l.], v. 124, n. 3, p. 1778-1784, 2012.

PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, England, v. 26, n. 3, p. 177-181, 1995.

PAULA, Regina CM; HEATLEY, Frank; BUDD, Peter M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**, London, v. 45, n. 1, p. 27-35, 1998.

PAVONI, Lucia *et al.* An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. **Nanomaterials**, Switzerland, v. 10, n. 1, p. 135, 2020.

PENG, Jie *et al.* Effect of high-pressure homogenization preparation on mean globule size and large-diameter tail of oil-in-water injectable emulsions. **Journal of food and drug analysis**, Taiwan, v. 23, n. 4, p. 828-835, 2015.

- PITOMBEIRA, Nadia AO *et al.* Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, England, v. 117, p. 610-615, 2015.
- PONGSUMPUN, Puntipa; IWAMOTO, Satoshi; SIRIPATRAWAN, Ubonrat. Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. **Ultrasonics sonochemistry**, Amsterdam, v. 60, p. 104604, 2020.
- PORTO, Bruna Castro; CRISTIANINI, Marcelo. Evaluation of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.) emulsifying properties. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 59, n. 2, p. 1325-1331, 2014.
- PORTO, Bruna Castro; FURTADO, Roselayne Ferro; CRISTIANINI, Marcelo. Caracterização de emulsão de goma de cajueiro modificada quimicamente para o microencapsulamento de D-limoneno. **Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2017.
- PRAKASH, Bhanu *et al.* Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. **Food Research International**, Canada, v. 49, n. 1, p. 201-208, 2012.
- PRAKASH, Bhanu *et al.* Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B1 contamination of spices. **Food Research International**, Canada, v. 44, n. 1, p. 385-390, 2011.
- QUELEMES, Patrick V. *et al.* Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate polymers**, England, v. 157, p. 567-575, 2017.
- RAJIVGANDHI, Govindan *et al.* Enhanced anti-cancer activity of chitosan loaded *Morinda citrifolia* essential oil against A549 human lung cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 164, p. 4010-4021, 2020.
- RAO, Jiajia; CHEN, Bingcan; MCCLEMENTS, David Julian. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. **Annual review of food science and technology**, Palo Alto, v. 10, p. 365-387, 2019.
- REHMAN, Abdur *et al.* Development of active food packaging via incorporation of biopolymeric nanocarriers containing essential oils. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 101, p. 106-121, 2020.
- REZAEI, F. *et al.* The effect of carboxymethyl cellulose coating incorporated with clove oil nanoemulsion on quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Iran, v. 22, n. 2, p. 129, 2021.
- RIBEIRO, António J. *et al.* Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate polymers**, England, v. 147, p. 188-200, 2016.

RIBEIRO, Fábio de Oliveira Silva *et al.* Anti-proliferative profile of *Anacardium occidentale* polysaccharide and characterization by AFM. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 156, p. 981-987, 2020.

RIBEIRO-SANTOS, Regiane *et al.* Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 61, p. 132-140, 2017.

RODENAK-KLADNIEW, B. *et al.* Design of magnetic hybrid nanostructured lipid carriers containing 1, 8-cineole as delivery systems for anticancer drugs: Physicochemical and cytotoxic studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Netherlands, v. 202, p. 111710, 2021.

RODRIGUES, A. P.; ANDRADE, L. H. C. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Inhamã, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, p. 721-730, 2014.

RODRIGUES, Fernando VS *et al.* Preparation and characterization of nanoemulsion containing a natural naphthoquinone. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, p. 756-761, 2018.

SAEIDI, Z.; AHARI, H.; ANVAR, S. A. A. Study of Antimicrobial Properties of Nano Chitosan with Marjoram Essential Oil in Increasing the Shelf-Life of Shrimp (Nephropidae) at Refrigerated Temperature. **Journal of Food Biosciences and Technology**, New York, v. 11, n. 2, p. 85-98, 2021.

SAE-LEAW, Thanasak; BENJAKUL, Soottawat. Prevention of quality loss and melanosis of Pacific white shrimp by cashew leaf extracts. **Food Control**, United Kingdom, v. 95, p. 257-266, 2019.

SAE-LEAW, Thanasak; BENJAKUL, Soottawat; SIMPSON, Benjamin K. Effect of catechin and its derivatives on inhibition of polyphenoloxidase and melanosis of Pacific white shrimp. **Journal of food science and technology**, United States, v. 54, n. 5, p. 1098-1107, 2017.

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y. C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. **Materials Today: Proceedings**, Cambridge, v. 27, p. 454-459, 2020.

SALVIA-TRUJILLO, Laura *et al.* Edible nanoemulsions as carriers of active ingredients: A review. **Annual review of food science and technology**, Palo Alto, v. 8, p. 439-466, 2017.

SALVIA-TRUJILLO, Laura *et al.* Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 105, p. 8-16, 2015.

SAYYARI, Zahra *et al.* The Effect of Nanocomposite Edible Coating Enriched with *Foeniculum vulgare* Essential Oil on the Shelf Life of *Oncorhynchus mykiss* Fish Fillets during the Storage. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, United States, v. 30, n. 5, p. 579-595, 2021.

SCHAICH, K. M[†]; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of functional foods**, London, v. 14, p. 111-125, 2015.

SCHERER, Rodrigo; GODOY, Helena Teixeira. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

SCHULZ, Hartwig *et al.* Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 249-256, 2005.

SENAPATI, S. R. *et al.* Melanosis and quality attributes of chill stored farm raised whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Applied and Natural Science**, India, v. 9, n. 1, p. 626-631, 2017.

SEOW, Yi Xin *et al.* Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical reviews in food science and nutrition**, United States, v. 54, n. 5, p. 625-644, 2014.

SERRANO, Lopes; PESSOA, Pedro Paula. Aspectos econômicos da cultura do cajueiro. *In*: SERRANO, Luiz Augusto Lopes (Ed.). **Sistema de Produção do caju**. Embrapa Informação Tecnológica, 2017, p. 2-10.

SHADMAN, Shabnam *et al.* Evaluation of the effect of a sunflower oil-based nanoemulsion with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the physicochemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during cold storage. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 79, p. 511-517, 2017.

SHAO, Ying *et al.* Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate polymers**, England, v. 193, p. 144-152, 2018.

SHARIF, Hafiz Rizwan *et al.* Formulation, characterization and antimicrobial properties of black cumin essential oil nanoemulsions stabilized by OSA starch. **Journal of food science and technology**, United States, v. 54, n. 10, p. 3358-3365, 2017.

SHARIFIAN, Salim *et al.* Effect of phlorotannins on melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. **Food Chemistry**, Barking, v. 298, p. 124980, 2019.

SHARIFIMEHR, Shahrzad; SOLTANIZADEH, Nafiseh; HOSSEIN GOLI, Sayed Amir. Effects of edible coating containing nano-emulsion of Aloe vera and eugenol on the physicochemical properties of shrimp during cold storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, England, v. 99, n. 7, p. 3604-3615, 2019.

SHARMA, Shubham *et al.* Nanostructured materials for food applications: spectroscopy, microscopy and physical properties. **Bioengineering**, Switzerland, v. 6, n. 1, p. 26, 2019.

SHIEKH, Khursheed Ahmad; BENJAKUL, Soottawat; SAE-LEAW, Thanasak. Effect of Chamuang (*Garcinia cowa* Roxb.) leaf extract on inhibition of melanosis and quality changes

of Pacific white shrimp during refrigerated storage. **Food Chemistry**, Barking, v. 270, p. 554-561, 2019.

SHOKRI, Sajad *et al.* Application an edible active coating based on chitosan-Ferulago angulata essential oil nanoemulsion to shelf life extension of Rainbow trout fillets stored at 4 C. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 153, p. 846-854, 2020.

SILVA GÜNDEL, Samanta *et al.* Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 46, p. 378-383, 2018.

SILVA, Daiany Priscilla Bueno *et al.* Chemical characterization and pharmacological assessment of polysaccharide free, standardized cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 213, p. 395-402, 2018.

SINGH, Yuvraj *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of controlled release**, Amsterdam, v. 252, p. 28-49, 2017.

SIRENO, Marcelo *et al.* Propriedades físico-químicas, sensoriais e bacteriológicas de camarões (*Litopenaeus brasiliensis*) irradiados e armazenados sob refrigeração. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 17, n. 2, 2010.

SMAOUI, Slim *et al.* Recent advancements in encapsulation of bioactive compounds as a promising technique for meat preservation. **Meat Science**, England, p. 108585, 2021.

SOLANS, Conxita; SOLÉ, Isabel. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current opinion in colloid & interface science**, London, v. 17, n. 5, p. 246-254, 2012.

SRIVASTAVA, Madhu Prakash; FATIMA, Aafreen. Essential Oils (Eos) as the Advantages of its Micro-encapsulation in Cosmetic Industry. **G-Journal of Environmental Science and Technology**, Bareilly, v. 8, n. 2, p. 28-42, 2021.

SUGUMAR, Saranya *et al.* Essential oil-based nanoemulsion formation by low-and high-energy methods and their application in food preservation against food spoilage microorganisms. *In: Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Academic Press, 2016. p. 93-100.

SUNDARARAJAN, Balasubramani *et al.* Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). **Microbial pathogenesis**, England, v. 125, p. 475-485, 2018.

TAYEL, Saadia Ahmed *et al.* Promising ion-sensitive in situ ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: design, in vitro characterization and in vivo estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits. **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 443, n. 1-2, p. 293-305, 2013.

TAYLOR, Steve L.; HIGLEY, Nancy A.; BUSH, Robert K. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. **Advances in food research**, New York, v. 30, p. 1-76, 1986.

TONGNUANCHAN, Phakawat; BENJAKUL, Soottawat. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, Malden, v. 79, n. 7, p. R1231-R1249, 2014.

UEDA-NAKAMURA, Tânia *et al.* Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology international**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.

VAKILI, Shirin; YASINI ARDAKANI, Seyyed Ali. Antioxidant effect of orange peel extract on chemical quality, sensory properties, and black spots of farmed white shrimp. **Journal of Nutrition and Food Security**, Iran, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2018.

VALENÇA, Anita Rademaker; MENDES, George Nilson. O metabissulfito de sódio e seu uso na carcinicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 85, n. 5, 2004. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-metabissulfito-de-sodio-e-o-seu-uso-na-carcinicultura/>. Acesso em: 29 nov. 2021.

VALLY, Hassan; MISSO, Neil LA. Adverse reactions to the sulphite additives. **Gastroenterology and hepatology from bed to bench**, v. 5, n. 1, p. 16, 2012.

VASCONCELOS, Andreanne G. *et al.* Cytotoxic activity of poly- ϵ -caprolactone lipid-core nanocapsules loaded with lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) on breast cancer cells. **Food Research International**, Canada, v. 136, p. 109548, 2020.

VASCONCELOS, Sarah Carvalho *et al.* Composição química, atividade bactericida e antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *Ocimum basilicum* e *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 10, n. 8, p. e51810817109-e51810817109, 2021.

VELU, Selvi *et al.* Inhibition of Melanosis, Microbial and Quality Changes of White Shrimp (*Penaues vannameii*) via Effect of Key Lime Juice and Vacuum Packaging at $2\pm 1^{\circ}\text{C}$. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, United States, v. 28, n. 4, p. 427-437, 2019.

VIEIRA, Roberto F.; SIMON, James E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic botany**, Bronx, v. 54, n. 2, p. 207-216, 2000.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, Germany, v. 72, n. 12, p. 1084-1087, 1970.

WALKER, Rebecca M.; DECKER, Eric A.; MCCLEMENTS, David J. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size. **Journal of Food Engineering**, [s. l.] v. 164, p. 10-20, 2015.

WAN, Jing *et al.* Influence of oil phase composition on the antifungal and mycotoxin inhibitory activity of clove oil nanoemulsions. **Food & function**, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 2872-2882, 2018.

WOJTUNIK-KULESZA, Karolina A. *et al.* Natural monoterpenes: Much more than only a scent. **Chemistry & biodiversity**, Switzerland, v. 16, n. 12, p. e1900434, 2019.

WU, Jianan *et al.* Preparation, characterization, and antibacterial effects of chitosan nanoparticles embedded with essential oils synthesized in an ionic liquid containing system. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 66, n. 27, p. 7006-7014, 2018.

XIMENES, Luciano Feijão. **Produção de pescado no Brasil e no Nordeste brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 5, n.150. jan. 2021.

YANG, Jisheng *et al.* Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate polymers**, England, v. 123, p. 53-66, 2015.

YAZGAN, Hatice *et al.* Effects of oil-in-water nanoemulsion based on sunflower oil on the quality of farmed sea bass and gilthead sea bream stored at chilled temperature (2±2 C). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, United States, v. 26, n. 8, p. 979-992, 2017.

YAZGAN, Hatice; OZOGUL, Yesim; KULEY, Esmeray. Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 306, p. 108266, 2019.

YUAN, Gaofeng *et al.* Effect of chitosan coating combined with green tea extract on the melanosis and quality of Pacific white shrimp during storage in ice. **CyTA-Journal of Food**, England, v. 14, n. 1, p. 35-40, 2016.

ZAKARIA, Mat B.; RAHMAN, Zainiah Ab; MAHMOOD, N. N. A. N. Solution properties of polysaccharides from *Anacardium occidentale*. **Pertanika Journal of Science & Technology**, Malaysia, v. 5, n. 1, p. 69-76, 1997.

ZHANG, Chuangnian *et al.* Doxorubicin-loaded glycyrrhetic acid-modified alginate nanoparticles for liver tumor chemotherapy. **Biomaterials**, Netherlands, v. 33, n. 7, p. 2187-2196, 2012.

ZHANG, Liang-Liang *et al.* Comparison study on antioxidant, DNA damage protective and antibacterial activities of eugenol and isoeugenol against several foodborne pathogens. **Food & nutrition research**, Sweden, v. 61, n. 1, p. 1353356, 2017.

ZHAO, Ran *et al.* Development of edible composite film based on chitosan nanoparticles and their application in packaging of fresh red sea bream fillets. **Food Control**, United Kingdom, v. 132, p. 108545, 2021.

ZINOVIADOU, Kyriaki; KOUTSOUMANIS, Konstantinos P.; BILIADERIS, COSTAS G. Biopolymer-based antimicrobial packaging systems: Physical properties and function. *In: Bioactive Food Packaging: strategies, quality, safety*. DEStech Publications, 2016.

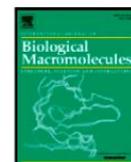
ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO

International Journal of Biological Macromolecules 150 (2020) 904–913



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Chitosan-loaded nanoemulsion containing *Zataria Multiflora* Boiss and *Bunium persicum* Boiss essential oils as edible coatings: Its impact on microbial quality of turkey meat and fate of inoculated pathogens

Kobra Keykhosravi^a, Saeid Khanzadi^{a,*}, Mohammad Hashemi^{b,c}, Mohammad Azizzadeh^d^a Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran^b Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran^c Department of Nutrition, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran^d Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2019

Received in revised form 6 February 2020

Accepted 10 February 2020

Available online 11 February 2020

Keywords:

Chitosan

Nanoemulsion

Microbial quality

Zataria Multiflora Boiss*Bunium persicum* Boiss

ABSTRACT

This study was targeted to investigate the effect of chitosan-loaded nanoemulsion enriched with two types of essential oils on the microbial quality of turkey meat. To this end, the effects of essential oils of *Zataria Multiflora* Boiss (ZEO) and *Bunium persicum* Boiss (BEO) were evaluated at two concentrations (0.5% and 1% (w/v)) during 18 days of storage at 4 °C. Initially, in vitro evaluations were performed on the prepared nanoemulsions, namely essential oil nanoemulsions and chitosan-loaded nanoemulsions containing essential oils, using micro-dilution method and agar diffusion methods, respectively. Meat samples were analyzed for microbial indicators and inoculated *salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* during 3-day intervals. The highest reduction rate of total viable bacteria (2.06 log CFU/g), total psychrophilic (2.59 log CFU/g), *Pseudomonas* spp. (2.07 log CFU/g), *Enterobacteriaceae* (2.51 log CFU/g), lactic acid bacteria (2.51 log CFU/g), and yeast and mold count (2.10 log CFU/g) were observed in chitosan-loaded nanoemulsion containing ZEO 1%, in comparison with control samples. Moreover, the shelf life significantly increased due to the application of chitosan-loaded nanoemulsions (15–18 days), compared to that of the control group (6 days). Therefore, the edible chitosan-based nanoemulsion could play an effective role in the preservation of the microbial qualities of turkey meat.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Meat is regarded as the main animal-derived foods source with high nutritional and clarifying value. Among different kinds of meat, the turkey meat is high importance due to its low-fat, low level of cholesterol, and high level of protein/cal. Turkey meat is rich in B-group vitamins such as B₁, B₂, B₆, B₁₂ and minerals, such as calcium, phosphorous, and potassium [52]. On the other hand, turkey meat is one of the most perishable types of food, which can act as both of matrix for the growth of pathogenic bacteria (e.g., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, and *Campylobacter jejuni*) and spoilage-induced bacteria, including *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, and lactic acid bacteria ([41,44]; Silva et al., 2017). Microbial growth and lipid oxidation are the major factors leading to meat spoilage during refrigerated storage [10,24]. Different methods and approaches have been developed to control the bacterial contamination of meat during storage process [38,50]. A large number of studies have

paid great attention to the use of natural preservatives in foods [11]. Recent use of biopolymer coatings has recently gained popularity. The reason their good moisture barrier and low oxygen permeability properties which can effectively extend shelf life [38]. The common biopolymers used for edible coating purposes are proteins and polysaccharides [5] (Aminzare et al., 2017). Chitosan is a natural, linear, and cationic polyaminosaccharide obtained from the alkaline deacetylation of chitin in varying degrees [39]. Chitosan is more useful than chitin since it possesses a higher number of functional groups, including free amino groups [45,50]. The important factors affecting the mechanism of chitosan action include the interactions of its amino groups (NH₂) with negatively charged microbial cell membranes resulting in the leakage of cellular proteins and electrolytes, its oxygen barrier performance, and the chelating of nutrients and essential metals [18,25]. Recently, edible coating as a delivery system for essential oils (EOs) has emerged as a food safety hurdle technology; however, they may raise some issues [19]. The hydrophobic and volatile features of these EOs, as well as their sensitivity toward oxygen and light, reduce their stability during processing and storage. The addition of EOs to the food leads to their interactions with hydrophobic components of food (e.g., fat and protein), which minimizes their sanitizing effect and/or efficiency against

* Corresponding author at: Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Azadi Square, Mashhad, Iran.
E-mail address: khanzadi@um.ac.ir (S. Khanzadi).