



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
DOUTORADO EM NUTRIÇÃO

SONÁLLE CAROLINA ALBUQUERQUE DE ANDRADE

NANOCÁPSULAS QUITOSANA- GOMA ARABICA CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Origanum vulgare*: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO,
ESTABILIDADE TÉRMICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA EM ATUM AZUL
(*Thunnus thynnus*)

RECIFE

2020

SONÁLLE CAROLINA ALBUQUERQUE DE ANDRADE

**NANOCÁPSULAS QUITOSANA-GOMA ARABICA CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Origanum vulgare*: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO,
ESTABILIDADE TÉRMICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA EM ATUM AZUL
(*Thunnus thynnus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Nutrição. Área de concentração Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Thayza C. M. Stamford

Coorientadores: Profa. Dra. Marciane Magnani

Prof. Dr. Francisco H. Xavier Junior

RECIFE

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Elaine Freitas, CRB4: 1790

A553n

Andrade, Sonálle Carolina Albuquerque de

Nanocápsulas quitosana- goma arábica contendo óleo essencial de *origanum vulgare*: preparação, caracterização, estabilidade térmica e ação antimicrobiana em atum azul (*Thunnus thynnus*) / Sonálle Carolina Albuquerque de Andrade. – 2020.

163 f.; il., tab.

Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford.

Coorientadores: Marciane Magnani e Francisco Humberto Xavier Junior.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Polímeros. 3. Biotecnologia. 4. Produtos pesqueiros. 5. Conservação de alimentos. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (orientadora). II. Magnani, Marciane (coorientadora). III. Xavier Junior, Francisco Humberto (coorientador). IV. Título.

613 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2021 - 014)

SONÁLLE CAROLINA ALBUQUERQUE DE ANDRADE

**NANOCÁPSULAS QUITOSANA-GOMA ARABICA CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Origanum vulgare*: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO,
ESTABILIDADE TÉRMICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA EM ATUM AZUL
(*Thunnus thynnus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Nutrição. Área de concentração Ciências dos Alimentos.

Aprovada em: 31/08/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Junior – Biotec./ UnP
Universidade Potiguar

Profa. Dra. Lúcia Raquel Ramos Berger – PPGPA/UFRPE
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Fábio Correia Sampaio – DO/ UFPB
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Thatiana Stamford Arnaud
Doutora em Ciência dos Materiais

Prof. Dra. Tânia Lucia Montenegro Stamford – DN/ UFPE
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico

Á Deus, pela fé que me mantém viva e fiel à vida honesta;

À minha família, que entendeu a minha ausência nos muitos momentos desde que ingressei na vida acadêmica, até a conclusão desta tese;

Aos meus verdadeiros e queridos amigos por todo companheirismo e palavras de carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proteger, me abençoar e me guiar em todos os momentos da minha vida, principalmente nos de dificuldade.

A minha família que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim em qualquer decisão tomada. Agradeço a compreensão por todos os momentos de ausência.

A minha orientadora, prof^a. Dra. Thayza Stamford pela oportunidade concedida, pela confiança em mim depositada, por todas as orientações na pesquisa e na vida.

Ao prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Junior, não tenho palavras para agradecer todo acolhimento, auxílio, amizade e força para execução desse projeto.

À prof^a. Dra. Marciane Magnani e a prof^a. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães responsáveis pelos Laboratórios de Processos Microbianos em Alimentos – CT – UFPB e de Bioquímica - LIKA – UFPE, por disponibilizarem os laboratórios para execução das análises que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições deixadas na leitura desse trabalho.

A todos os técnicos que me auxiliaram na condução das análises Dr. Sócrates Golzio dos Santos (LMCA- UFPB), Rafael Padilha (LIKA- UFPE) e seu Gilvandro (LPMA- UFPB).

Aos meus amigos que sempre estão comigo, me aconselhando, dando injeções de ânimo para nunca desanimar e dividindo comigo todas as alegrias, mesmo que distantes. As companheiras que se fizeram mais presentes nessa jornada Laênia, Francieli e Bernadete.

À Pós-Graduação em Nutrição da UFPE pela oportunidade cedida para obtenção do título de Doutora. À Cecília e Andrea, pela disponibilidade sempre que precisei dos serviços da Secretaria da Pós-Graduação.

À CAPES, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa de doutorado.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muitíssimo obrigada!

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar. ”
(Josué 1:9).

RESUMO

O pescado é a proteína animal mais produzida no mundo, no entanto é susceptível à deterioração microbiana. Tecnologias emergentes para conservação de alimentos têm sido propostas, com destaque para nanoencapsulação de produtos naturais biocompatíveis e bioativos para uso como conservante. Diante do exposto, objetivou-se elaborar, caracterizar e otimizar nanocápsulas contendo óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV) utilizando quitosana (QUI) e goma arábica (GA) como material de recobrimento, bem como avaliar a eficácia da aplicação das nanocápsulas (NQGA-OEO) no controle de bactérias patogênicas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) em atum azul (*Thunnus thynnus*). Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da nanocápsula (NQGA-OEO) frente ao inóculos. O OEOV foi caracterizado, e nanoencapsulado em QUI e GA pela técnica de coacervação complexa. A produção das NQGA-OEO foi otimizada pelo desenho experimental (Box-Behnken) de três níveis e duas variáveis, tendo como variáveis independentes OEOV, Tween e QUI/GA e variáveis dependentes o tamanho e o potencial zeta das nanocapsulas. As nanocapsulas e os polímeros foram analisados por calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria (DSC/TG). Morfologicamente, as NQGA-OEO foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM). As NQGA-OEO otimizadas, apresentaram superfície lisa, com formato uniforme e esférico, um diâmetro médio de 323 ± 22 nm, a distribuição unimodal com um índice de polidispersão (PDI) de $0,20 \pm 0,02$ e potencial zeta $+ 34,8 \pm 0,8$ mV. A eficiência de encapsulação de OEOV foi de 95%. Verificou-se que a formulação favoreceu a estabilidade térmica das NQGA-OEO nas diferentes temperaturas (4, 25, 40 °C) com relação ao tamanho, potencial Zeta e PDI. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) da NQGA-OEO para *S. aureus* e *L. monocytogenes* foi de $10 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e de $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente. A inibição das bactérias pelo tempo de exposição foi realizada em caldo BHI e no atum azul pré-infectado. Foi verificada redução da viabilidade de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, testes pelas NQGA-OEO entre 1,2 a 2,7 log (CIM/2) e de 2,6 a 3,5 log (CIM), variando com o tempo de exposição. As reduções de células viáveis das bactérias no atum azul foram menores comparado com o caldo BHI. Os resultados sugerem que NQGA-OEO obteve boa eficiência e estabilidade, além de serem efetivas para controlar bactérias patogênicas em atum azul.

Palavras chave: Materiais biocompatíveis. Polímeros. Biotecnologia. Produtos pesqueiros. Conservação de alimentos.

ABSTRACT

Fish is the most produced animal protein in the world, however it is susceptible to microbial deterioration. Emerging technologies for food preservation have been proposed, with emphasis on nanoencapsulation of natural biocompatible and bioactive products for use as a preservative. Given the above, the objective was to elaborate, characterize and optimize nanocapsules containing essential oil of *Origanum vulgare* (OEOV) using chitosan (CHI) and gum arabic (GA) as covering material, as well as to evaluate the effectiveness of the application of nanocapsules (NQGA- OEO) in the control of pathogenic bacteria (*Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) in bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the nanocapsule (NQGA-OEO) was determined against the inoculum. The OEOV was characterized, and nanoencapsulated in CHI and GA by the complex coacervation technique. The production of NQGA-OEO was optimized by the experimental design (Box-Behnken) of three levels and two variables, having as independent variables OEOV, Tween and CHI/ GA and dependent variables the size and zeta potential of the nanocapsules. The nanocapsules and polymers were analyzed by differential scanning calorimetry and thermogravimetry (TG / DSC). Morphologically, NQGA-OEO were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). The optimized NQGA-OEO had a smooth surface, uniform and spherical in shape, with an average diameter of 323 ± 22 nm, unimodal distribution with a polydispersion index (PDI) of 0.20 ± 0.02 and zeta potential $+ 34, 8 \pm 0.8$ mV. The OEOV encapsulation efficiency was 95%. It was found that the formulation favored the thermal stability of NQGA-OEO at different temperatures (4, 25, 40 °C) with respect to size, Zeta potential and PDI. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of NQGA-OEO for *S. aureus* and *L. monocytogenes* was $10 \mu\text{L.mL}^{-1}$ and $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$, respectively. The inhibition of bacteria by the exposure time was carried out in BHI broth and pre-infected blue tuna. There was a reduction in the viability of *S. aureus* and *L. monocytogenes*, tests by NQGA-OEO between 1.2 to 2.7 log (MIC / 2) and from 2.6 to 3.5 log (MIC), varying with the exposure time. Reductions of viable bacteria cells in bluefin tuna were less compared to BHI broth. The results suggest that NQGA-OEO achieved good efficiency and stability, in addition to being effective for controlling pathogenic bacteria in bluefin tuna.

Key words: Biocompatible materials. Polymers. Biotechnology. Fishery products; Food preservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Estudos que relatam a eficácia antimicrobiana do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. frente <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i> .	30
Figura 1 -	Consumo mundial médio de peixe per capita entre os anos de 2013 à 2015.	20
Figura 2 -	Estruturas das nanocápsulas poliméricas	32
Figura 3 -	Representação da estrutura do biopolímero quitosana	33
Figura 4 -	Representação da estrutura química da goma arábica	36
Figura 5 -	Modelo esquemático da encapsulação por coacervação complexa	38
Figura 6 -	Perfil cromatográfico de (A) carvacrol; (B) óleo de orégano (C) nanocápsula quitosana-goma arábica- óleo essencial de orégano por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.	54
Figura 7 -	Curva analítica do carvacrol apresentando a regressão linear	55
Figura 8 -	Variação do tamanho da partícula e potencial Zeta da solução de quitosana (10 mg.mL ⁻¹) e das várias concentrações de goma arábica (30 a 60 mg.mL ⁻¹)	57
Figura 9 -	Efeito da relação de carga de polieletrólitos no tamanho e na carga dos complexos formados	59
Figura 10 -	Gráfico de Pareto apresentando o efeito dos fatores sobre o (A) tamanho e (B) potencial Zeta das nanocápsulas de óleo de orégano	62
Figura 11 -	Gráfico de superfície de resposta relacionando o tamanho da nanocapsula, e o efeito do óleo de orégano, do polímero, e do surfactante	60
Figura 12 -	Gráfico de superfície de resposta relacionando o potencial Zeta, e o efeito do óleo de orégano, do polímero, e do surfactante	62
Figura 13 -	Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das: A- nanocápsulas de quitosana- goma arábica-óleo	67

essencial de oregano (NQGA-OEO) B- goma arabica (GA) e C- quitosana (QUI)

- Figura 14** - Curvas de termogravimétrica (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) onde A: goma arábica (GA); B: nanocápsulas de quitosana-goma arábica-óleo essencial de oregano (NQGA-OEO); C: quitosana (QUI) 70
- Figura 15** - Imagens Microscopia Eletronica de Varredura (MEV) ($\times 100$) mostrando a morfologia das nanocápsulas de óleo essencial de orégano produzidas a partir de polímeros de quitosana e goma arábica 70
- Figura 16** - Medições AFM de nanocápsulas contendo óleo de orégano produzidas a partir de polímeros de goma arábica e quitosana 71
- Figura 17** - Cromatograma do doseamento de carvacrol na NQGA-OEO (A) e da nanocápsula (B) 73
- Figura 18** - Valores de tamanho (A) e Potencial Zeta (B) das nanocápsulas armazenados a 4 °C, 25 °C e 40 °C por 4 meses. 74
- Figura 19** - Contagem de células viáveis de *L. monocytogenes* (A) e *S. aureus* (B) em caldo BHI a 37 ° C em função da concentração de nanocápsulas de quitosana-goma arábica-óleo essencial de orégano (NQGA-OEO): (A) (●): 0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (■) 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (▲): 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (◆): 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. (B) (●): 0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (■) 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (▲): 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (◆): 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Limite de detecção do teste: 2 log UFC.mL⁻¹ 77
- Figura 20** - Contagem de células viáveis de *L. monocytogenes* (A) e *S. aureus* (B) em modelo de peixe a 7 °C em função da concentração de nanocápsulas de quitosana-goma arábica-óleo essencial de orégano (NQGA-OEO): (A) (●): 0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (■) 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (▲): 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (◆): 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. (B) (●): 0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (■) 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (▲): 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (◆): 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Limite de detecção do teste: 2,0 log UFC.mL⁻¹ 79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Bactérias patogênicas presentes no pescado, com seus devidos modos de infecção, estabilidade térmica da toxina e valores mínimos da dose infectante 25
- Tabela 2 -** Constituintes identificados no óleo essencial de *Origanum vulgare* L 52
- Tabela 3 -** Resultados dos ensaios de acurácia e precisão expressos em média, DV e CV (%). 56
- Tabela 4 -** Variáveis e os níveis do Planejamento experimental do tipo Box-Behnken. 61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	PESCADOS	20
2.2	<i>Staphylococcus Aureus</i>	24
2.3	<i>Listeria Monocytogenes</i>	26
2.4	ÓLEO DE ORÉGANO	28
2.5	NANOCÁPSULAS	31
2.5.1	Material nanoencapsulante	32
2.5.1.1	<i>Quitosana</i>	32
2.5.1.2	<i>Goma Arábica</i>	35
2.5.2	Técnica de coacervação complexa	37
3	HIPÓTESE	40
4	OBJETIVOS	41
4.1	OBJETIVO GERAL	41
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5	MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO CARVACROL	42
5.2	MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	42
5.3	OBTENÇÃO DA MATRIZ ALIMENTAR EXPERIMENTAL	44
5.4	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO OEOV	43
5.5	VALIDAÇÃO DO CARVACROL	43
5.5.1	Método de validação	43
5.5.2	Especificidade / Seletividade	44
5.5.3	Linearidade	44
5.5.4	Determinação do limite de detecção e quantificação	44
5.5.5	Exatidão	45
5.5.6	Precisão	45
5.6	ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE QUITOSANA E GOMA ARÁBICA: FORMAÇÃO DE NANOPARTICULAS	45

5.7	PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS QUITOSANA- GOMA ARÁBICA-ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (NQGA-OEO)	46
5.8	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOCÁPSULAS (NQGA-OEO)	48
5.9	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS (NQGA-OEO)	47
5.9.1	Análise do tamanho de partículas	47
5.9.2	Determinação do potencial zeta	47
5.9.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	47
5.9.4	Análise térmica	48
5.9.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
5.9.6	Microscopia de Força Atômica (AFM)	48
5.10	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ENCAPSULAMENTO (% EE)	49
5.11	ESTUDO DE ESTABILIDADE À TEMPERATURA	49
5.12	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	50
5.13	INFLUÊNCIA DAS NANOCÁPSULAS SOBRE A VIABILIDADE DAS CEPAS BACTERIANAS	50
5.14	EFEITO DAS NANOCÁPSULAS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA BACTERIANA EM ATUM AZUL	50
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1	IDENTIFICAÇÃO DO OEOV CONSTITUINTES	52
6.2	VALIDAÇÃO DO CARVACROL	53
6.3	INTERAÇÃO ENTRE OS BIOPOLÍMEROS E PREPARAÇÃO DAS NANOCAPSULAS	56
6.4	PLANEJAMENTO FATORIAL	60
6.5	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	67
6.6	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	68
6.7	MORFOLOGIA DAS NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA-ÓLEO ESSENCIAL DE OREGANO (NQGA-OEO)	70
6.8	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE%)	72

6.9	ESTABILIDADE DA TEMPERATURA	73
6.10	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	75
6.11	INFLUÊNCIA DAS NANOCÁPSULAS SOBRE A VIABILIDADE DAS CEPAS BACTERIANAS	76
6.12	EFEITO DAS NANOCÁPSULAS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA BACTERIANA EM ATUM AZUL	78
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE A - ARTIGO: OPTIMIZATION OF <i>ORIGANUM</i> <i>VULGARE</i> ESSENTIAL OIL- LOADED CHITOSAN/ GUM ARABIC NANOCAPSULES BY COMPLEX COACERVATION USING BOX- BEHNKEN DESIGN: PREPARATION, PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION, AND THERMAL STABILITY	104
	APÊNDICE B - ARTIGO: GC-MS METHOD FOR DOSING OF CARVACROL IN OREGANO OIL: DEVELOPMENT AND VALIDATION	141

1 INTRODUÇÃO

O pescado é a proteína animal mais produzida no mundo. Segundo estimativas da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), a produção mundial de pescado em 2017 obteve uma média de 171 milhões de toneladas (FAO, 2018). Tanto a produção quanto o consumo de pescado no Brasil vêm crescendo a cada ano. Dados da Associação Brasileira da Piscicultura (PeixeBR) apontam que em 2019 foram 758 mil toneladas de peixe produzidos. De acordo com o Ministério da Agricultura, o consumo médio de pescado no Brasil é de 10,5 kg por habitante/ano, abaixo do recomendado pela Organização Mundial da Saúde, que é de 12 quilos. A escolha dos consumidores por ingestão de pescado resulta principalmente da conscientização sobre a importância da manutenção de hábitos alimentares saudáveis (SIQUEIRA, 2018).

Entre os pescados, os de águas geladas como atum azul (*Thunnus thynnus*) representam os produtos com maior susceptibilidade ao processo de deterioração. Isso se deve, principalmente, pela quantidade de ácidos graxos na sua composição. Contudo, outros fatores também influenciam na susceptibilidade de degradação microbiana, tais como a elevada atividade de água dos tecidos, o teor elevado de nutrientes que podem facilmente ser utilizados pelos microrganismos, a rápida ação destrutiva das enzimas naturais presentes nos tecidos, a alta taxa de atividade metabólica da microbiota e pH próximos à neutralidade (SOARES; GONÇALVES, 2014).

Listeria monocytogenes e *Staphylococcus aureus* estão envolvidas em muitos surtos de origem alimentar em produtos cárneos em todo o mundo sendo consideradas perigosas ameaças à segurança de alimentos frescos ou processados (CDC, 2018a). No Brasil, em 2018, patógenos relacionados com doenças que tiveram por origem o pescado, frutos do mar e seus derivados, representaram 0,80% do total de surtos. Os principais agentes relatados foram, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *Bacillus cereus*, *Coliformes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella Enteritidis*, e *L. monocytogenes* (BRASIL, 2018b).

A necessidade de um método que conserve o pescado por um tempo mais prolongado vem sendo pesquisado, e a utilização de substâncias naturais com características bioativas e biocompatíveis para aplicação como antimicrobianos em alimentos tem se mostrado uma forma promissora como método de conservação.

Especial interesse da indústria de alimentos tem sido dado ao potencial de ação da aplicação de óleos essenciais de plantas, devido às suas propriedades antimicrobianas. Estudos realizados demonstraram que o óleo de orégano (OEOV) apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro frente a microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes de alimentos (AZERÊDO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; BARROS et al., 2009).

Óleos essenciais de plantas são considerados produtos “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS) nas doses normalmente utilizadas em alimentos, aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para uso como flavorizantes em alimentos (FDA, 2016). No entanto, é de fundamental importância considerar o impacto da aplicação de óleos essenciais sobre as características organolépticas e físico-químicas dos produtos alimentícios, e o seu tempo de ação antimicrobiano durante o armazenamento do alimento (GUTIERREZ et al., 2009). Considerando estes aspectos, o uso de óleos essenciais nanoencapsulados em alimentos tem sido objeto de investigação e aperfeiçoamento, pois auxilia na manutenção das propriedades bioativas do óleo, melhora a biocompatibilidade, assim como, promove a liberação controlada do mesmo.

A nanotecnologia é uma área inovadora, cujas aplicações são extensas, tornando-a cada vez mais aplicável no setor de alimentos. Neste contexto destaca-se o desenvolvimento de nanopartículas com polímeros naturais, de modo a melhorar suas propriedades físico-químicas (MOURA et al., 2011). O uso de quitosana (QUI), um polissacarídeo natural produzido pela desacetilação de quitina, é particularmente promissor devido à sua biocompatibilidade e bioatividade, sendo considerada pela FDA como ingrediente alimentar seguro (XIA, LIU, ZHANG, CHEN, 2011; MUJTABA et al., 2020). Já a goma arábica (GA), um polímero biodegradável, é amplamente utilizado em encapsulações de produtos farmacêuticos orais e tópicos, como também em formulações alimentares como agente de suspensão e emulsão (PHILLIPS; PHILLIPS, 2011).

Mediante o exposto, esta pesquisa objetivou elaborar, caracterizar e otimizar nanocápsulas contendo óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV) utilizando quitosana (QUI) e goma arábica (GA) como material de recobrimento, bem como avaliar a eficácia da aplicação das nanocápsulas (NQGA-OEO) no controle de bactérias patogênicas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) em atum azul (*T. thynnus*). A consolidação desta pesquisa trará novos dados acerca do tema de estudo, e

possibilitará o desenvolvimento e a fundamentação metodológica para o planejamento e execução de pesquisas com ênfase em nanoencapsulação de óleos essenciais em matrizes alimentares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PESCADOS

Pescados é um termo genérico utilizado para referenciar peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos, sendo excluídos mamíferos aquáticos, répteis, algas marinhas e outras plantas aquáticas (FAO, 2018). Pescados representam importantes fontes de proteínas na alimentação do ser humano, além disso, os valores de vitamina A, cálcio e fósforo são superiores na carne de peixe, quando comparados a outras fontes proteicas animais (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008). Este alimento apresenta alta digestibilidade, e é rico em aminoácidos essenciais, sendo que a lisina constitui mais de 10% da proteína do pescado (SANTOS, 2006). Pode ser utilizado como base para a produção de alimentos funcionais, por reduzir o risco de doenças cardiovasculares crônicas (GONÇALVES, 2011).

A demanda mundial por pescado tem sofrido um significativo incremento nas últimas décadas, principalmente em função do crescimento populacional e da busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis. Neste contexto, segundo a FAO a produção mundial de pescados no ano de 2018 foi de 171 milhões de toneladas, tendo a pesca contribuído com 90,9 milhões de toneladas e a aquicultura com 80,4 milhões de toneladas. Sendo 80 milhões de toneladas de pescado para alimentação. A produção da pesca foi 87,2% de origem marinha e 12,8% de água doce, enquanto o pescado advindo da aquicultura foi 62,9% de água doce e 37,1% de ambiente marinho. Deste total, 136,2 milhões de toneladas foram destinadas ao consumo humano e 21,7 milhões de toneladas transformadas em óleo e farinha de peixe, yyygprodutos não comestíveis utilizados na nutrição animal (FAO, 2018). Dentre os países com maior potencial para a aquicultura, o Brasil tem papel de destaque, em especial por sua disponibilidade hídrica, clima favorável e ocorrência natural de espécies aquáticas que compatibilizam interesse zootécnico e mercadológico (ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA, 2019)

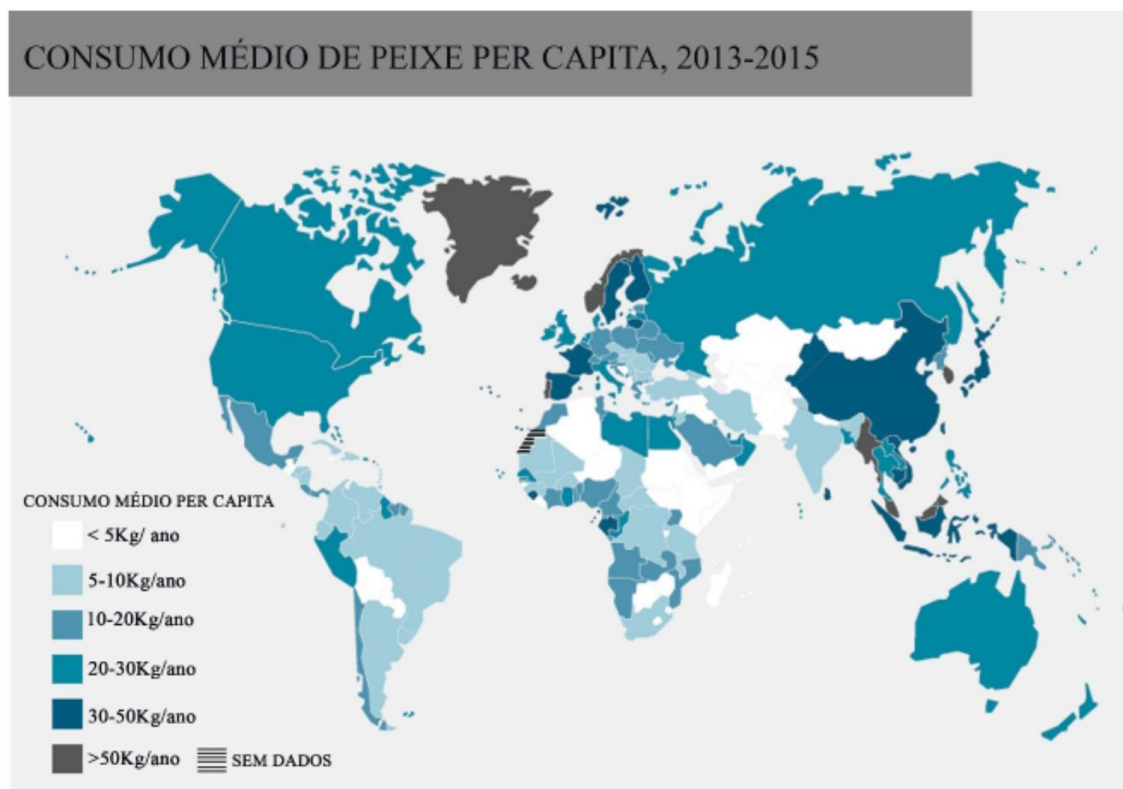
A produção brasileira de pescado em 2017 foi de 1,2 milhões de toneladas, sendo a pesca responsável por 580 mil toneladas e a aquicultura por 582,7 mil toneladas, o que lhe rendeu a 22ª e a 13ª colocação nos rankings mundiais, respectivamente. A maior parcela da produção de peixe ficou concentrada na região Sul, seguida da região Norte, Centro-oeste, Nordeste e Sudeste (BRASIL, 2018). Nas

regiões Nordeste, Norte e Sudeste, a produção da pesca é maior do que a aquicultura, enquanto no Sul, a aquicultura assumiu papel de destaque em relação as outras regiões (SEAFOOD BRASIL, 2017).

A região Nordeste do Brasil apresentou uma produção de 111,4 mil toneladas de pescado no ano de 2017, devido a situação climática em alguns Estados, como Ceará e Rio Grande do Norte, impedindo maior crescimento da produção de peixes cultivados na região. O desempenho total obteve saldo positivo com acréscimo de 6,4% na produção anual. Porém, como a atividade tem boas condições de desenvolvimento na região, o avanço ficou aquém do esperado. No entanto, outros Estados absorveram os produtores que migraram do Ceará, principalmente para o Piauí, Bahia e Pernambuco, sendo os principais polos da região o Lago de Itaparica nos Estados da Bahia e de Pernambuco. Os canais de comercialização de pescado mais expressivos foram os atacadistas ou intermediários, a venda direta ao consumidor final e os supermercados (BRASIL, 2018).

Estima-se que o pescado represente 16,7% de toda a proteína animal consumida por humanos no planeta e 6,5% de toda a proteína, considerando as duas origens, animal e vegetal. Estes valores são superiores ao das carnes de suíno, frango, bovino, ovino e caprino, as mais consumidas na sequência (FAO, 2018). Nos países em desenvolvimento, o consumo per capita anual de pescado cresceu de 5,2 kg em 1961 para 19,2 kg em 2018, enquanto nos países de baixa renda com déficit de alimento, o aumento foi de 4,9 kg em 1961 para 10,6 kg em 2018. Na figura 1 está ilustrada a média per capita de consumo de peixes pelo mundo, pode-se verificar que os países mais desenvolvidos, como os Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Japão, Austrália e países Europeus têm um consumo superior de peixes do que países menos desenvolvidos, como Colômbia, Venezuela, Brasil, Paraguai, Uruguai. Desta forma, uma parcela considerável do pescado consumido nos países desenvolvidos é oriunda de importações, visto que apresentam uma demanda relativamente estável, incapaz de ser atendida por suas produções pesqueira e aquícola. As importações também têm impactado o consumo de pescado nos países em desenvolvimento, em especial na diversificação de produtos, porém a base ainda é formada pelo pescado disponível localmente (FAO, 2018).

Figura 1 - Consumo mundial médio de peixe per capita entre os anos de 2013 a 2015.



Fonte: FAO, 2018.

No âmbito mundial, entre um quarto e um terço dos alimentos produzidos anualmente para o consumo humano se perde ou é desperdiçado. Isso equivale a cerca de 1,300 bilhões toneladas de alimentos, o que inclui 30% dos cereais, entre 40 e 50% das raízes, frutas, hortaliças e sementes oleaginosas, 20% da carne e produtos lácteos e 35% dos peixes. A FAO calcula que esses alimentos seriam suficientes para alimentar dois milhões de pessoas (FAO, 2018).

Na pesca, as perdas de qualidade são muitas vezes mais importantes do que as perdas materiais. Os principais mercados de peixe exigem mais rastreabilidade na cadeia alimentar, especialmente após os recentes escândalos em matéria de rotulagem enganosa dos produtos. A melhoria dos métodos de manipulação, de processamento e de adição de valor poderia superar os aspectos técnicos deste problema, mas também é essencial desenvolver as boas práticas, estabelecer parcerias, sensibilizar e desenvolver capacidades, políticas e estratégias (FAO, 2018).

O pescado é altamente susceptível aos processos de deterioração devido à sua composição química, atividade de água elevada, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, ao pH próximo da neutralidade. Essas

características aliadas ao tamanho do peixe (peixes pequenos se deterioram mais rapidamente), ao tipo de microbiota contaminante, ao tipo de pesca realizada, as práticas inadequadas de preservação e processamento contribuem para a depreciação do produto e para o consequente aumento das perdas pós captura (MELLO et al, 2009).

Os peixes quando pescados já vem acompanhados de uma carga relativamente elevada de microrganismos, isto em consequência da própria microbiota natural do pescado bem como, do nível de contaminação das águas. O pescado pode ser contaminado por um amplo e variado grupo de microrganismos, bem como por resíduos de produtos químicos, através de águas contaminadas ou poluídas dos estuários e das bacias pesqueiras. O pescado vivo, por sua vez, apresenta contaminação bacteriana principalmente na pele, brânquias e escamas, passando aos demais tecidos após a morte do animal (FAO, 2017). Ao ser capturado, ele sofre um aumento significativo no número de microrganismos, muitas vezes oriundos principalmente dos lastros das embarcações. O número de bactérias presentes neste momento chega a atingir 10^5 a 10^6 /cm do pescado. Pode-se considerar esta contaminação resultante das condições de pesca muitas vezes insatisfatórias (SILVA-JUNIOR; BARBOSA, 2013).

Muitas fontes de contaminação podem alterar a microbiota original do peixe, aumentando o número de bactérias antes do peixe chegar à mesa do consumidor. Essas fontes de contaminação incluem recipientes com gelo, aparelhos ou equipamentos sem assepsia adequada, transporte e manipulação pelo homem em mercados, peixarias, entre outros (SILVA-JUNIOR; BARBOSA, 2013). Dessa forma, o alimento é um importante elo na cadeia epidemiológica de doenças transmissíveis. Sua conservação em condições não adequadas favorece a multiplicação de microrganismos que podem ocasionar alterações e/ou produzir sintomas de toxinfecções alimentares nos seus consumidores (SANTIAGO et al., 2013).

Várias doenças de origem alimentar resultam de contaminação biológica. No entanto, esse tipo de contaminação também é capaz de produzir intoxicações alimentares e causar a deterioração dos alimentos. Muitos microrganismos patogênicos são responsáveis pela intoxicação alimentar resultante tanto do consumo de alimentos contendo microrganismos patogênicos quanto da intoxicação alimentar após a ingestão de um alimento contaminado com uma toxina produzida por microrganismos que se multiplicaram dentro do próprio alimento (BHUNIA, 2018).

Staphylococcus aureus é um dos patógenos oportunistas detectados repetidamente em produtos pesqueiros (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, GALVÃO, OETTERER, 2018).

2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é o agente responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo, cuja contaminação pode ocorrer durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana (CUNHA NETO et al., 2012). Essa bactéria gram-positiva pertencente à família Micrococcaceae, gênero *Staphylococcus*, apresenta células esféricas (0,5 – 1,5 µm), que podem ser encontradas isoladas, aos pares e em grupamentos irregulares; são imóveis; não esporulados; anaeróbios facultativos; e quimiorganotróficos, com metabolismo fermentativo e respiratório (oxido-redução). A sua temperatura ótima de multiplicação é de 30 - 37°C (LIMA et al., 2015). Este microrganismo é um membro comum da microbiota natural da pele e fossas nasais de humanos (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, GALVÃO, OETTERER, 2018).

Como um potencial patógeno, *S. aureus*, pode afetar negativamente a saúde humana e animal, causando lesões necróticas graves, abscessos, endocardite e bacteremia (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013; FERREIRA et al., 2014). *S. aureus* podem gerar várias enterotoxinas quando crescem em alimentos. Estas enterotoxinas pré-formadas quando ingeridas são responsáveis por gastroenterite estafilocócica (intoxicação alimentar) (GALLO, 2020).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais enterotoxinas, as quais são produzidas somente por algumas espécies e linhagens de *S. aureus*. Este microrganismo tem sido frequentemente encontrado em superfícies de plantas de processamento de alimentos e reconhecido como sendo responsável por surtos associados à ingestão de alimentos *in natura* e processados (MARQUES et al., 2017). Os alimentos comumente associados com intoxicação alimentar estafilocócica são carnes, produtos à base de carnes, saladas, produtos de padaria recheados e produtos lácteos (HUANG, 2015).

A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* é considerada como uma das mais frequentes doenças transmitidas por alimentos em diversos países, sendo relatada como a terceira maior causa de envenenamento alimentar confirmado em todo o mundo (EFSA, 2016; KADARIYA et al., 2014). Faz-se necessário ressaltar, que

as infecções causadas por *S. aureus* podem conduzir a uma patologia de alta severidade para muitos órgãos e sistemas, muitas vezes com o seu tratamento dificultado pela ação de cepas com características de resistência a maioria, ou mesmo a totalidade dos antibióticos convencionais (VENKATESH, 2018).

Há evidências substanciais de que peixes e outros frutos do mar estão no topo da lista de alimentos associados a surtos de origem alimentar, globalmente (ONJONG et al., 2021). Nos EUA, surtos de doenças transmitidas por alimentos relacionados a patógenos e doenças associadas a surtos como resultado do consumo de peixes em 2017 foram 30 e 101, respectivamente (CDC, 2019). A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar e o Centro Europeu de Controle de Prevenção de Doenças documentaram um total de 69 surtos, 429 casos humanos e 26 hospitalizações relacionadas ao consumo de peixes e frutos do mar contaminados com *L. monocytogenes*, enterotoxinas estafilocócicas, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Y. Enterocolitica* (EFSA; ECDC, 2018).

Na China, a vigilância regional de *S. aureus* em alimentos RTE de vinte e quatro cidades entre 2011 e 2014 relatou que 12,5% foram positivos para *S. aureus*, incluindo cepas de MRSA identificadas como ST9, ST59, ST339 e ST3239 (YANG et al., 2016).

Segundo Gallo et al. (2020) muitos são os pontos críticos nos processos de produção de alimentos e que podem representar riscos reais de contaminação ou de produção de alimentos inseguros para os consumidores. Assim, devido as diversas etapas de obtenção e processamento de pescados, pesquisas relatam que o peixe pode ser veiculador de uma variedade de microrganismos patogênicos e/ou enterotoxinas ao homem (Tabela 1).

Tabela 1 - Bactérias patogênicas presentes no pescado, com seus devidos modos de infecção, estabilidade térmica da toxina e valores mínimos da dose infectante.

Bactérias	Modo de infecção		E. térmica da toxina	Valores mínimos
	Infecção	Toxina		
<i>Clostridium botulinum</i>		+	Baixa	-
<i>Vibrio</i> spp.	+			Alta
<i>V. parahaemolyticus</i>				(>10 ⁶ g)
Outros vibrios				-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+			Não conhecida

<i>Listeria monocytogenes</i>	+		Não conhecida
<i>Salmonella spp.</i>	+		Desde $<10^2$
<i>Shigella spp.</i>	+		10^1 - 10^2
<i>Escherichia coli</i>	+		10^1 - 10^3
<i>Staphylococcus aureus</i>		+	Alta -

Fonte: FAO, 2008

Além de *S. aureus*, outra bactéria que é considerada como patógeno emergente em produtos cárneos, incluindo pescados, e que está relacionada com surtos de gastroenterite bacteriana é *Listeria monocytogenes* (Almeida-Filho 2004; HEREDIA, GARCIA 2018).

2.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um bacilo gram-positivo que pode crescer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (FRANCO, 2008). Essa bactéria é capaz de sobreviver e crescer em diversas condições de ambiente como temperaturas de refrigeração, baixo pH e altas concentrações de sal (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

L. monocytogenes, a causa da listeriose, constitui um importante patógeno de origem alimentar com problemas significativos de saúde pública e segurança alimentar. A listeriose tem consequências clínicas graves devido à sua alta taxa de mortalidade em pessoas com sistema imunológico enfraquecido, incluindo crianças, mulheres grávidas e idosos (KAYODE et al., 2019; MAIA et al., 2019). A principal via de transmissão é o consumo de alimentos contaminados (EFSCA; ECDC, 2017). No entanto, a infecção também pode ser transmitida, embora muito raramente, através do contato com animais infectados, manifestando-se inicialmente como uma infecção cutânea em indivíduos cujas profissões são de risco (PITA, 2012; IRANZO et al., 2015).

As principais síndromes clínicas causadas por *L. monocytogenes* incluem gastroenterite febril, infecções perinatais e infecções no sistema nervoso central, com ou sem bacteremia (DREVETS; BRONZE, 2008). A dose infectante depende de diversos fatores, incluindo o estado imunológico do hospedeiro, número de bactérias ingeridas e as características da cepa (sorovares) em questão (IRANZO et al., 2015). Em adultos saudáveis e imunocompetentes, as doses de *L. monocytogenes* que causam listeriose variam entre 10^5 até 10^9 ufc/g ou ml. No entanto, para os grupos de

risco, as doses infetantes são mais baixas, variando entre < 10 a 10^4 ufc/g (BORTOLUSSI, 2018).

Vários autores relataram que peixes e produtos à base de pescado representam um excelente sistema para a multiplicação de microrganismos patogênicos psicrotróficos, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, e dessa forma, podem representar um risco para a saúde dos consumidores (EUROPEAN COMMISSION, 2017; SKOWRON et al., 2018; WAMBUI et al., 2020; DOGRUYOL; COSANSU, 2020). Estudos realizados demonstraram a presença de *Listeria spp.* e de *L. monocytogenes* em peixes defumados a frio e embalado a vácuo, queijo fresco, carne bovina moída crua, presunto cozido e mussarela fatiados congelados (CABAL et al., 2019; LY et al., 2019; NICHOLS et al., 2019). Os riscos provenientes da contaminação de *L. monocytogenes* em alimentos são atribuídos à ampla ocorrência e capacidade dessa bactéria de sobreviver, persistir e proliferar em vários tipos de alimentos e em ambientes de processamento e produção associados a alimentos (BUCUR et al., 2018; RODRÍGUEZ- LÓPEZ et al., 2018). A contaminação de produtos prontos para o consumo com *L. monocytogenes* pode ocorrer em vários estágios, por meio de manipuladores de alimentos, no local de processamento, durante a adição de ingredientes crus, ou após tratamento de letalidade na área de embalagem de alimentos (JAMI et al., 2014; RICCI et al., 2018).

Uma das formas de se controlar a multiplicação de microrganismos indesejáveis nos alimentos é o uso de conservantes químicos sintéticos. No entanto, a utilização desses agentes não é compatível com a imagem de produtos “naturais”, de grande apelo comercial atualmente. Além disso, alguns conservantes adicionados aos alimentos, visando o aumento da segurança e da vida útil podem levar a formação de compostos com efeito danoso/tóxico ao organismo humano (PRANOTO; RAKSHIT; SALOKHE, 2015).

Muitas pesquisas têm buscado desenvolver alternativas estratégicas para a redução do uso de aditivos e conservantes químicos sintéticos na cadeia de produção de alimentos. Neste contexto, a utilização de compostos naturais, como os óleos essenciais, que possuem propriedades antimicrobianas tem surgido como uma opção interessante. A atividade antibacteriana e antifúngica dos óleos essenciais tem por muito tempo sido reconhecida, entretanto a indústria de alimentos tem direcionado maior atenção à sua aplicação como antioxidantes naturais (PLOOY; REGNIER; COMBRINCK, 2009; FUJISAWA, 2014). Os óleos essenciais são reconhecidos por

apresentar atividade inibitória frente a uma ampla variedade de microrganismos, incluindo vírus, fungos, protozoários e bactérias (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

2.4 ÓLEO DE ORÉGANO

Óleos essenciais são metabolitos secundários obtidos de diferentes partes de plantas, principalmente de folhas, através de vapor ou hidrodestilação. Se caracterizam como uma complexa mistura, principalmente, de terpenóides, monoterpenos e sesquiterpenos, em soma a uma variedade de fenóis aromáticos, óxidos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas que determinam o aroma e odor característico da planta (BATISH et al., 2008; OZOGUL et al 2020). Os compostos e suas porcentagens presentes nos óleos essenciais variam de acordo com a espécie considerada, as condições climáticas, de coleta e extração e as partes da planta utilizadas para a extração (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

A atividade antimicrobiana exercida por terpenos e derivados têm sido descritas através de pesquisas envolvendo diversas espécies de plantas e microrganismos-alvo. Em revisão, Greay e Hammer (2011) citam alguns dos mecanismos por meio dos quais estes compostos atuam sobre as células bacterianas. Monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. A exposição a terpenos pode interferir com a expressão de genes codificadores de fatores de virulência, como quando consideradas linhagens de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas (QIU et al., 2011); e com a expressão de proteínas citoplasmáticas e de membrana em *Salmonella* entérica (DI PASQUA et al., 2010).

Segundo Marino; Bersani; Comi, (2001) e Turina et al. (2006), os possíveis mecanismos de ação dos OEs são: alteração da bicamada lipídica da membrana celular microbiana, com aumento da permeabilidade e posterior liberação de constituintes intracelulares vitais, além de danos causados nos sistemas enzimáticos do microrganismo. Os danos causados a integridade celular podem interferir na manutenção do estoque energético das células e, conseqüentemente, nos processos dependentes de energia, tais como transporte de solutos, regulação do metabolismo, síntese de macromoléculas, como toxinas extracelulares; e motilidade (SILVA et al., 2010; COX et al., 2001; TRUMPOWER; GENNIS, 1994).

Óleos essenciais têm atraído interesse científico pelo fato de caracterizarem-se como produtos naturais reconhecidos como seguros - GRAS, possuir amplo espectro de atividade antimicrobiana, e apresentar eficácia no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes de importância em vegetais (GUTIERREZ et al., 2009; OMIDEYGI et al., 2007). Duas principais características são atribuídas aos óleos essenciais como agentes antimicrobianos de possível uso em alimentos: a) sua origem natural, o que significa mais segurança para os consumidores e para o meio ambiente; e b) são considerados de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana (DAFERERA et al., 2003). A segunda característica citada toma como base o fato de que os óleos essenciais são compostos por uma grande variedade de constituintes, os quais, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, tornando, desta forma, mais difícil uma possível adaptação dos microrganismos frente a sua ação (MARINELLI et al., 2012).

Dentre os OEs investigados quanto a atividade biológica, aquele obtido das folhas de orégano *Origanum vulgare* L. tem se revelado como possuidor de propriedades antioxidantes (CASTILHO et al., 2012; ALBANO; MIGUEL, 2011), antibacteriana (SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2010; MOREIRA et al., 2005; NOSTRO et al., 2004), antifúngica e antimutagênica (FARÍAS et al., 2010; FIGIEL et al., 2010; ÖZBEK et al., 2008; YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006). Souza et al. (2007) em estudo inicial sobre o potencial antimicrobiano de diferentes OEs de especiarias de origem brasileira, verificou propriedade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* L. (OEOV) sobre uma variedade de bactérias patogênicas e deteriorantes de interesse em alimentos. O OEOV consiste em uma fonte rica de monoterpenos lipofílicos dos quais os principais responsáveis por sua atividade antimicrobiana são os isômeros carvacrol e timol (SILVA et al., 2010). Segundo Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008), essas diversas combinações de constituintes químicos apresentadas pelos óleos essenciais, podem controlar a oxidação de alimentos e as bactérias que apresentam resistência consistentemente elevada a agentes antimicrobianos, tais como *Salmonella Cholerasuis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Diversos estudos têm relatado inibição do crescimento e/ou sobrevivência de microrganismos de interesse em alimentos pela ação do OEOV, particularmente *S. aureus* e *L. monocytogenes*, como apresentado no Quadro 1. Além da inibição do

crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, sabe-se que a exposição ao OEOV também é capaz de alterar o metabolismo (atividade enzimática e ou de produção de toxinas) de *S. aureus* (BARROS et al., 2009; SOUZA et al., 2013; SOUZA, 2015) e causar a morte celular de *L. monocytogenes* devido a liberação de material intracelular e deslocamento da parede celular a partir da membrana plasmática (AZERÊDO et al., 2012).

Quadro 1 - Estudos que relatam a eficácia antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Microrganismos teste	Estudo/Referência
<i>Staphylococcus Aureus</i>	BARROS et al., 2009
	SOUZA, et al., 2010
	BARROS et al., 2012
	MARQUES et al., 2015
	FRATINI et al., 2017
	RODRIGUES et al., 2018
<i>Listeria monocytogenes</i>	AZERÊDO et al., 2012
	LUZ et al., 2012
	MAZZARRIN et al., 2015
	SOUZA et al., 2016
	CHO et al., 2019
	BARBOSA et al., 2020

Diante da possibilidade de utilização dos óleos essenciais para aumentar a conservação, prolongar a validade de alimentos e diminuir o uso de agentes antimicrobianos sintéticos. Estudos têm demonstrado os potenciais promissores desses compostos no combate às bactérias patogênicas e aos radicais livres, tornando o emprego desses metabólitos uma alternativa viável ecológica e economicamente (ANDRADE et al., 2012; BURT, 2004; EBRAHIMABADI et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2008; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; JOSHI et al., 2008; KULISIC et al., 2004).

Um aspecto importante a ser considerado para a aplicação do OEOV como antimicrobiano natural em alimentos consiste no seu impacto sensorial sobre os produtos. As alterações no sabor e odor dos alimentos podem exceder os limites aceitáveis, uma vez que estão diretamente relacionados com a concentração dos OEs

para exercer suas ações como antimicrobiano e antioxidante. Com vistas a evitar os efeitos indesejáveis sobre os atributos sensoriais, pesquisas vêm sendo realizadas utilizando nanoencapsulação do óleo essencial (OE) utilizando biopolímeros naturais e biodegradáveis (BUTSTRAEN; SALAUN, 2014).

2.5 NANOCÁPSULAS

A indústria de alimentos tem como principais desafios a melhoria constante da segurança alimentar, da qualidade dos alimentos, do seu valor nutricional, bem como a criação de novos alimentos. Assim, a manutenção ou o aumento da estabilidade química, física, microbiológica, sensorial ou nutricional dos alimentos revela-se como um objetivo fundamental a atingir, considerando que essa estabilidade está intimamente associada à aceitabilidade por parte dos consumidores. A Nanotecnologia tem sido apontada como uma das soluções com maior potencial para atingir este objetivo, existindo um interesse crescente por parte da indústria alimentar e da comunidade científica na avaliação das possibilidades da sua aplicação em produtos/processos inovadores (SILVA, CERQUEIRA; VICENTE, 2011; SANTOS et al., 2016)

A incorporação de diferentes compostos bioativos em formulações alimentícias, a fim de desenvolver alimentos funcionais e nutracêuticos aumentou consideravelmente nos últimos anos. Uma técnica que vem sendo bastante difundida na área da Ciência e Tecnologia de Alimentos é a encapsulação de compostos através da micro ou nanoencapsulação, determinadas pelo tamanho das partículas formadas na escala micro ou nanométrica, respectivamente. A nanoencapsulação ganha espaço neste cenário, pois as nanoestruturas geradas apresentam características positivas, como melhorar as características organolépticas de um produto, mascarando sabores, odores e cores indesejáveis. Além disso, pode proteger a molécula encapsulada de degradação ou perda de funcionalidade devido aos efeitos da luz, oxigênio, pH, umidade ou a interação com outros componentes da matriz alimentar (GÓMEZ-ESTACA et al., 2015; YAO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2016).

As nanocápsulas são formadas por um invólucro disposto ao redor de um núcleo (geralmente oleoso) que permitem uma liberação controlada da substância e/ou previnem o contato com outros componentes em uma mistura (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; ASSIS, et al., 2012). Segundo Assis et al. (2012) dentre as principais estruturas obtidas e estudadas na área de nanoencapsulação de alimentos

estão as nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, nanocápsulas e nanocompósitos em embalagens. A partir destas especialidades e particularidades, as nanopartículas poliméricas têm sido amplamente estudadas para liberação modificada de compostos e ingredientes alimentícios encapsulados (MADENE et al., 2006; ASSIS et al., 2012).

Figura 2 - Estruturas das nanocápsulas poliméricas



(adaptado Barbosa et al., 2009)

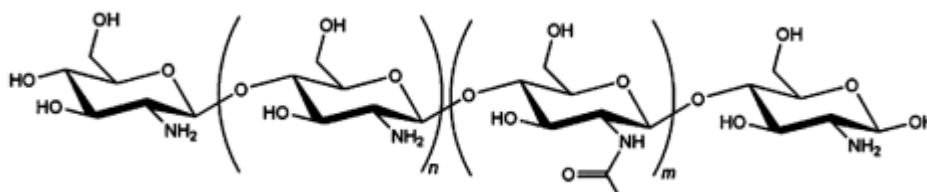
É importante salientar que na indústria alimentar é essencial a utilização de materiais aprovados para consumo humano (vulgarmente chamados *food grade*) ou para contato com alimentos. No entanto, a seleção destes materiais depende de muitos fatores, como por exemplo o tamanho das nanoestruturas a produzir, as propriedades intrínsecas do composto incorporado (por exemplo, solubilidade em água e estabilidade), as características de superfície (tais como a carga), ou as propriedades de transporte dos materiais de embalagem (por exemplo, a permeabilidade a vários gases). Quando comparados com os materiais sintéticos, os biopolímeros (polissacarídeos, proteínas, lipídeos) surgem como uma alternativa considerada segura para serem usados em alimentos devido à sua biodegradabilidade e biossegurança (KUAN et al., 2011). Vários polímeros naturais têm sido explorados para desenvolver nanocápsulas para indústria de alimentos, com destaque para a quitosana, alginato e goma arábica (GÓMEZ-MARTÍNEZ; ALTSKÄR; STADING, 2012)

2.5.1 Material encapsulante

2.5.1.1 Quitosana

Um material que vem se destacando e sendo largamente utilizado para nanoencapsulação é a quitosana, um polissacarídeo obtido através da desacetilação parcial da quitina, sendo formada por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas β (1-4), em proporções variáveis, com grupos amino disponíveis para reações (Figura 3) (DAMIAN et al., 2015; RINAUDO, 2015; BANO et al., 2017; GEORGE et al., 2006; TAGLIARI et al., 2012). A quitosana (QUI) é um biopolímero natural, abundante e atóxico. No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino, classificada como oligômero quando possui cerca de doze monômeros e como polímero quando possui mais de doze monômeros (WONG, 2009). Este biopolímero pode variar em distribuição de massa molar, conteúdo de impurezas e em grau de desacetilação de 50 a 95%, dependendo da fonte e do método de preparação (WONG, 2009; LARANJEIRA et al., 2009).

Figura 3 - Representação da estrutura do biopolímero quitosana.



Fonte: Rodrigues et al, 2012

O grau de desacetilação (GD) é uma propriedade química muito importante da quitosana, sendo um parâmetro que expressa o conteúdo médio de resíduos acetilados presentes nas cadeias desse biopolímero. Esse parâmetro é capaz de influenciar as características químicas, físicas e biológicas do biopolímero. Do ponto de vista químico, o GD da quitosana exerce influência sobre algumas de suas propriedades, tais como, hidrofobicidade, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes reticulantes, solubilidade e viscosidade de suas soluções (GONSALVES et al., 2011; MAJETI et al., 2000; GEORGE et al., 2006; BARROS et al., 2006). A quitosana atua como uma base fraca, apresentando pKa de grupos amina, variando entre 6,3 e 7,2, o qual é influenciado pelo GD e pela densidade de carga (QIN et al., 2006; GONSALVES et al., 2011).

A quitosana se degrada pela hidrólise enzimática e apresenta cinética de degradação aparentemente relacionada ao grau de cristalinidade que é controlado principalmente pelo GD. Entretanto sua resistência mecânica e sua maleabilidade são limitadas, principalmente para aplicação como filmes em bandagens, por exemplo, e por isso a mistura da mesma com outros polímeros é um procedimento utilizado para alterar ou obter as propriedades de interesse (COSTA JÚNIOR et al., 2008).

A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas, pois tem grupos amina e hidroxila reativos capazes de serem submetidos a modificações químicas. É solúvel em meios aquosos ácidos, de $\text{pH} < 6,2$, sendo os ácidos acético, fórmico e cítricos os mais usados na solubilização do biopolímero. Quando dissolvida possui carga positiva sobre os grupos $-\text{NH}_3^+$, o que facilita sua solvatação em água. Além disso, adere a superfícies carregadas negativamente, agregando-se com compostos polianiónicos e, complexa íons metálicos. São atributos da quitosana ter solubilidade em soluções ácidas e agregação com poliânions (CLEASEN et al., 2006; GONSALVES et al., 2011; SUNDAR et al., 2010).

Ao longo das últimas décadas a quitosana tem exibido potencial para diversas aplicações na medicina, cosméticos, agricultura, tratamento de água, engenharia de tecidos e sistema de liberação controlada de drogas, entre outras, sendo utilizada na forma de filmes, géis, esfera, micro/nanopartículas e membranas, pois combina propriedades como a bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, hidrofiliabilidade, atividade antifúngica, antiúlcera, antiácida, antimicrobiana, antibacteriana e é totalmente absorvível pelo organismo (YANG et al., 2004; RINAUDO, 2015; CASARIEGO et al., 2009; DALLAN, 2005; DENG, 2007; ARANAZ et al., 2009). Na liberação controlada de fármacos, a quitosana tem sido utilizada na forma de nanopartículas, devido a sua maior estabilidade, baixa toxicidade, método de preparação ser simples e por proporcionar rotas versáteis de administração (DASHA et al., 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003; LARANJEIRA et al., 2009; SUNDAR et al., 2010).

Em geral, as nanopartículas formadas à base de quitosana de baixo peso molar apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão, bem como um potencial de superfície positivo, o que facilita a interação com as membranas biológicas. No entanto, dependendo do método de preparação empregado pode se observar diferenças no tamanho, morfologia e potencial zeta das nanopartículas formadas (DASHA et al., 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003). No trabalho de Azevedo

et al. (2011), foi descrita a utilização de nanopartículas à base de quitosana/TPP (Tripolifosfato de sódio) como uma forma de encapsulação de insulina, de modo a aumentar ou prolongar o efeito hipoglicêmico, e melhorar o tratamento de pacientes com diabetes.

As nanopartículas de quitosana ganham destaque por apresentarem um alto potencial antimicrobiano. A maior área superficial e densidade das nanopartículas fazem com que elas tenham maior grau de interação com a superfície de carga negativa das células bacterianas (BLANCO, 2011). Os sistemas particulados à base de quitosana têm sido produzidos e testados para a liberação de princípio ativo, como a ampicilina, diclofenaco, hemoglobina e proteínas como insulina e albumina sérica bovina (BSA). As nanoesferas de quitosana foram usadas em outros trabalhos no encapsulamento de clotrimazol e econazol; quando reticuladas com politrifosfato e genipina encapsularam indometacina, e quando reticuladas com sulfato de sódio e revestidas com alginato foram usadas na adsorção de antígenos para uso em vacinas (PAULA et al., 2009). Mohapatra et al. (2002), avaliou o uso de quitosana como matriz de liberação de DNA, visando o desenvolvimento de vacinas. Neste estudo, o uso de nanoesferas de quitosana-DNA, administrada por via nasal, mostrou-se adequado e capaz de diminuir de forma significativa o título viral em infecções respiratórias causadas pelo vírus *sincial* respiratório.

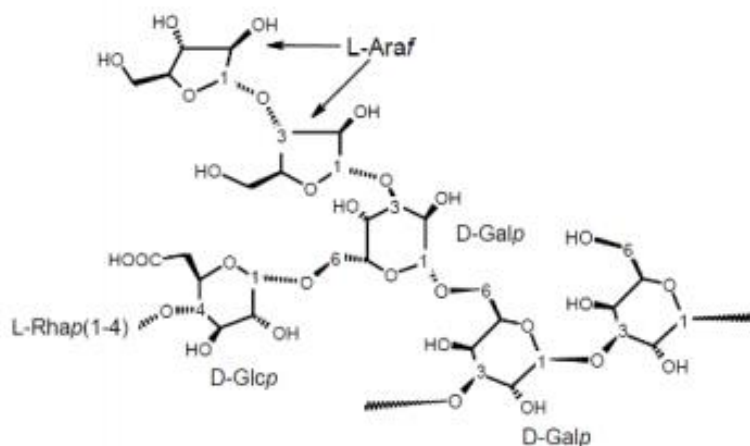
2.5.1.2 Goma Arábica

A goma arábica (GA), tem sido o agente encapsulante mais comum, principalmente, por apresentar características específicas de boa formação de filme na interface e propriedade emulsificante (GHARSALLAOUI et al., 2007). A goma arábica ou goma acácia é um produto obtido da dessecação espontânea do exsudato dos troncos e dos ramos da *Acácia senegal* (Linne) (GABAS; CAVALCANTI, 2003). A GA é um heteropolissacarídeo complexo com sua estrutura bastante ramificada (Figura 4). A cadeia principal é formada por unidades de D-galactose, unidas por ligações glicosídicas em β -D-1,3. Suas cadeias laterais são ligadas a principal por ligações β 1,6 e apresentam diferentes estruturas como D-galactose, L-ramnose, L-arabinose e ácido D-glucurônico (MUNIZ, 2015).

Possui, em base seca, de 1% a 2% de diferentes espécies de proteínas, além disso, pode apresentar substâncias associadas, como polifenóis e minerais

(magnésio, potássio, cálcio, sódio) em cerca de 3% a 4%. Embora tenha um alto peso molecular, apresenta um comportamento reológico newtoniano em meio aquoso (10% na formulação), sendo uma consequência da compactada e altamente ramificada estrutura da molécula (FOOD; INGREDIENTES, 2011).

Figura 4 - Representação da estrutura química da goma arábica



Fonte: GUILHERME, 2006

A goma arábica é amplamente utilizada devido a sua capacidade de emulsificação, formação de filme, sabor suave, ter propriedades de encapsulamento e possuir status de segurança toxicológica pelo Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (MOTLAGH et al, 2006). A goma arábica possui excelente solubilidade em água, propriedades tensoativas e produz soluções com baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos. Estas suas características têm facilitado seu grande uso como matriz encapsulante para retenção e proteção química de óleos voláteis e aromas (YE et al., 2012).

A goma arábica é um agente encapsulante muito efetivo, por que protege a funcionalidade dos colóides, além de produzir emulsões estáveis com muitos óleos sobre uma ampla faixa de pH, a qual corresponde intervalo de 2 a 10. Várias pesquisas apresentaram a goma arábica como o melhor material de revestimento para encapsulação de oleoresina de cardamomo, pimenta preta e canela, em relação à maltodextrina e amido modificado (VAIDYA; BHOSALE; SINGHAL, 2006). A goma arábica também foi o agente encapsulante mais eficiente para proteger a oleoresina de páprica encapsulada, apresentando uma boa funcionalidade e aceitação pelos provadores não- treinados (SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005).

Estudo realizado com a encapsulação de fragrâncias constituídas de frações lipídicas e aromáticas com intuito de minimizar a oxidação lipídica e a perda de voláteis apresentou eficiência à goma arábica como material de revestimento, reforçando a ampla aplicação desse polissacarídeo, a qual foi justificada pela presença de proteínas que apresentam boa capacidade emulsificante em sua composição (FUCHS et al., 2006).

Como uma das tecnologias de microencapsulação usadas na indústria de alimentos a coacervação complexa tem se destacado para encapsular aditivos ou nutrientes reativos, sensíveis ou voláteis. Isto se deve a alta eficiência de encapsulação, a liberação controlada e a proteção aprimorada dos materiais do núcleo contra condições adversas, como calor. Este método apresenta como vantagem adicional ser passível de execução com uma variedade de biopolímeros que podem ser usados como materiais de parede (GHARANJIG et al 2020; BASTOS et al., 2020).

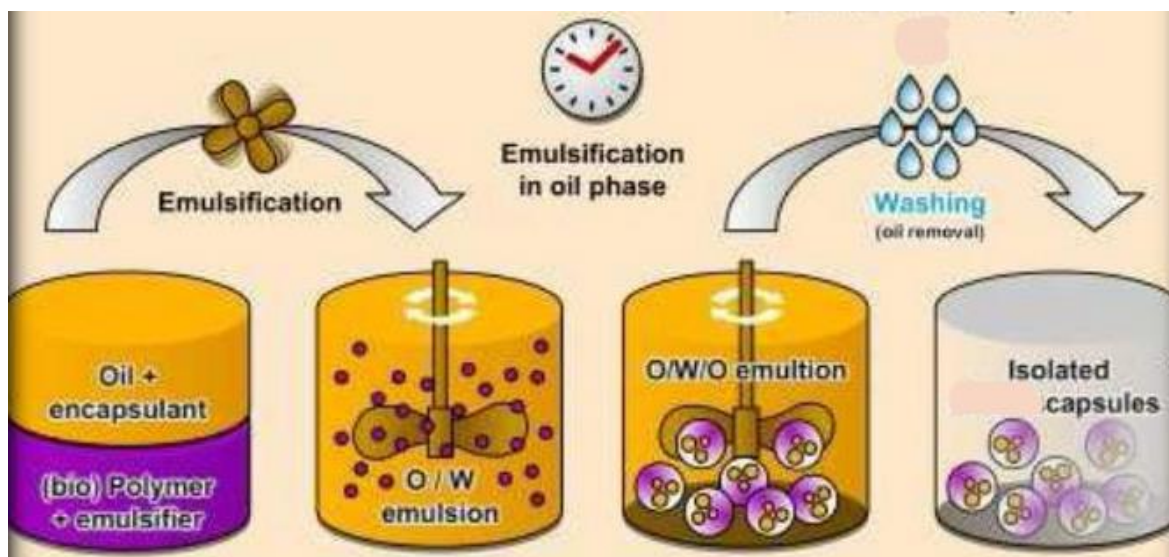
2.5.2 Técnica de coacervação complexa

A coacervação é uma interação baseada na complexação que ocorre da mistura de soluções de substâncias com cargas opostas, formando complexos, que, por repulsão do solvente, precipitam, formando duas fases: uma delas, chamada “rica em polímeros”, contendo o coacervado precipitado, e outra chamada “pobre em polímeros”, na qual permanece o solvente da solução (STRAUSS e GIBSON, 2004). A coacervação pode ser de dois tipos: simples, em que a separação da fase líquida ocorre pela adição de um eletrólito à solução coloidal, ou complexa, que resulta da neutralização mútua de dois coloides carregados com cargas opostas em solução aquosa.

A coacervação simples envolve um único polímero e ocorre pela remoção do solvente que envolve as moléculas do coloide, por meio do uso de outro composto que compete com o polímero pela água, como sais ou álcoois. Com a saída do solvente, as moléculas do polieletrólito se aproximam e formam aglomerados (VASILIU et al., 2005). A coacervação complexa é usada principalmente para encapsulação de substâncias hidrofóbicas e é baseada na interação entre diferentes polímeros com cargas opostas (Figura 5) formando complexos insolúveis. A deposição de tais complexos em torno de um núcleo hidrofóbico cria uma barreira,

permitindo assim seu encapsulamento (EZHILARASI et al., 2013). Biopolímeros que se encaixam para coacervação têm propriedades hidrofílicas coloidal; solubilidade em meio aquoso; densidade de carga adequada, e cadeias lineares (VANDERGAER, 1994). Em formulações de alimentos, polissacarídeos e proteínas são os principais biopolímeros naturais para coacervação complexa (GHARANJIG et al. 2020)

Figura 5 - Modelo esquemático da encapsulação por coacervação complexa



Fonte: Adaptada de Bhusnure (2015).

A coacervação complexa apresenta algumas vantagens frente a outras técnicas, como a possibilidade de se trabalhar com biopolímeros, a ausência de solvente orgânico e as condições brandas de temperatura no processamento. Uma das principais desvantagens da técnica de encapsulação por coacervação é o fato de que deve ser mantido um controle crítico das concentrações dos materiais poliméricos. Ou seja: a coacervação ocorrerá somente dentro de uma limitada faixa de pH, de concentração de coloide e/ou concentração de eletrólito. A coacervação pode ser controlada de modo a produzir vários diâmetros de nanocápsulas e/ou espessuras de revestimento diferentes. O diâmetro da cápsula é dependente do tamanho das gotículas de óleo que serão encapsulados. Existem alguns fatores que influenciam o tamanho das nanocápsulas, como: velocidade de agitação; teor de sólidos da fase orgânica; viscosidade da fase aquosa; viscosidade da fase orgânica;

concentração e tipo de tensoativo; configuração do vaso e do agitador; quantidade de orgânicos e fase aquosa, e perfil de temperatura durante a produção (DE KRUIF et al., 2004; TURGEON et al., 2007).

3 HIPÓTESE

As nanocápsulas de quitosana e goma arábica contendo óleo essencial de orégano, obtidas pela técnica de coacervação, apresentam alto índice de encapsulação, promovem a estabilidade térmica do óleo, e apresentam atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas encontradas em atum azul (*Thunnus thynnus*).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar, caracterizar e otimizar nanocápsulas contendo óleo essencial de *Origanum vulgare* utilizando goma arábica e quitosana como material de recobrimento e avaliar a eficácia no controle de bactérias patogênicas em atum azul (*Thunnus thynnus*).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar uma metodologia por CG-EM para detecção de carvacrol em óleo essencial de orégano livre e encapsulado;
- Determinar a melhor relação quitosana/ goma arábica para obtenção de nanocapsulas;
- Otimizar a produção de nanocápsulas contendo óleo de orégano tendo como revestimento quitosana e goma arábica
- Caracterizar e verificar a estabilidade térmica das nanocápsulas contendo óleo de orégano;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima das nanocápsulas frente as cepas de bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*;
- Avaliar o efeito inibidor das nanocápsulas contendo óleo essencial de orégano contra bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes* in vitro e in situ no e em atum azul pré-contaminado;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) pertencente a Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE; Laboratório de Processos Microbianos em alimentos, pertencente ao Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, e no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA), localizados no Campus I da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

5.1 OBTENÇÃO DOS MATERIAIS

O óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano; lote 84012, densidade a 20 °C, 0,93; índice de refração a 20 °C, 1,5) extraído por destilação a vapor, foram obtidos da empresa Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais Ltda (São Paulo, Brasil). Carvacrol foi obtido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A goma arábica foi adquirida na Synth (Diadema, SP, Brasil), a quitosana de baixo peso molecular e Tween 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (França). Ácido acético, hidróxido de sódio e acetato de etila foram fornecidos pela Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EUA). Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Millipore (Milli-Q plus, Millipore, St Quentin em Yvelines, França).

5.2 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Listeria monocytogenes ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, usadas como microrganismos teste foram cedidas pela coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil). Um inóculo de cada bactéria teste foi obtido por preparação de suspensões em solução salina estéril (NaCl a 0,85% p / v) cultivada em ágar infusão cérebro e coração (BHI) a 37 ° C por 18h. Posteriormente foram submetidas a centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavadas duas vezes em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 estéril, e resuspensas em solução salina estéril para padronização por leitura em espectrômetro, OD 625 nm, de 0,100 equivalente a contagem de células viáveis de aproximadamente 8 log de unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹) (MCMAHON et al., 2008).

5.3 OBTENÇÃO DA MATRIZ ALIMENTAR EXPERIMENTAL

O pescado utilizado no estudo como matriz experimental foi o atum azul (*Thunnus thynnus*) considerado o de maior pesca na região nordeste. O atum foi adquirido em postas de um distribuidor de pescado local de João Pessoa – PB, no dia da pesca e horário compreendido entre 06h:00min e 07h:00min horas da manhã, sendo transportadas em caixas plásticas isotérmicas até o laboratório.

5.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO OEOV

A análise da composição do OEOV foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA/UFPB). A identificação dos compostos foi determinada em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). Foi utilizado para a diluição acetato de etila adquirido pela Synth (São Paulo, BR). Os compostos foram separados em uma coluna RTX capilar ®-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm). O volume de injeção foi de 1 µL de OEOV diluído em acetato de etila (1:10). A programação da temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciada a 60 °C, com acréscimo de 3 °C por minuto até atingir 240 °C, concluindo o tempo de corrida equivalente a 60 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1mL/min. O espectrômetro de massa foi operado por impacto de elétrons com uma temperatura da fonte de 200 °C, e com energia de ionização de 70V, variação de scan de m/z 40 a m/z 500. Para a identificação dos compostos voláteis, utilizou-se o banco de espectros da própria biblioteca do CG/EM, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (Version 1.7) confirmado com a injeção do padrão de OEOV. A quantificação dos voláteis foi obtida através da normalização das áreas dos voláteis e expressos em percentual de área (%) (Barbosa et al., 2016).

5.5 VALIDAÇÃO DO CARVACROL

5.5.1 Método de validação

A validação do método cromatográfico foi realizada de acordo com as diretrizes de validação da ICH (International Conference on Harmonization (ICH) (2005) para especificidade / seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limite de detecção (LOD) e limite de quantificação. Os testes de validação seguiram as boas práticas de fabricação e todos os equipamentos volumétricos foram avaliados e calibrados antes da análise. A balança (balança analítica Sartorius MSA-224S-OOO-DU Cubis, Elk Grove, EUA) foi calibrada para um mínimo de 0,1 mg, três soluções-mãe individuais de 10 mg de carvacrol foram preparadas em acetato de etila, colocadas em um frasco hermético e armazenadas a -20 °C até o uso, concentrações variando de 5 a 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) foram preparados e utilizados para análises de validação.

5.5.2 Especificidade / Seletividade

A especificidade e a seletividade do método analítico foram confirmadas pela injeção de soluções contendo 100% da quantidade normal de trabalho com carvacrol e as nanocápsulas. Essas análises foram repetidas seis vezes. A capacidade de separar todos os compostos e de não ter interferência cromatográfica das amostras padrão foi analisada.

5.5.3 Linearidade

As curvas de calibração para o carvacrol foram preparadas através da injeção de soluções padrão variando de 5 a 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). As soluções secundárias foram preparadas por diluição apropriada das soluções padrão de carvacrol até um volume final de 1 mL e contendo 10 mg de óleo de orégano. A área de pico dos padrões foi plotada em relação às concentrações de analito. As curvas de calibração padrão para compostos foram desenvolvidas calculando a linha de regressão usando o método dos mínimos quadrados. As curvas de linearidade foram realizadas em três dias diferentes.

5.5.4 Determinação do limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) foi determinado com base na razão entre o desvio padrão da resposta e a inclinação estimada a partir da curva de calibração dos padrões multiplicada por 3. O limite de quantificação (LOQ) foi determinado como a menor quantidade de analito quantificável de forma reprodutível. Este

parâmetro foi calculado pela razão do desvio padrão da resposta e pela inclinação da curva de calibração dos padrões multiplicada por 10 (RDC 166, 2017).

5.5.5 Exatidão

A exatidão foi determinada por seis repetições das concentrações de carvacrol (variando de 5, 15 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em 1 mL de acetato de etila. As concentrações encontradas foram obtidas substituindo as razões de pico de resposta das soluções de carvacrol das concentrações adicionadas a uma equação de regressão derivada. As concentrações encontradas e adicionadas foram usadas para determinar a porcentagem absoluta de desvio em cada concentração de carvacrol contida no óleo de orégano.

5.5.6 Precisão

A precisão do método foi avaliada através da análise da variabilidade intra e inter-dia das amostras de carvacrol. A precisão intra-dia foi determinada pela quantificação das amostras de carvacrol em três concentrações diferentes (5, 15 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As amostras foram injetadas seis vezes e preparadas em um dia. A precisão inter-dia foi avaliada separadamente das áreas de pico obtidas pela injeção das mesmas três concentrações do fitoconstituente em dias diferentes. A precisão inter e intra-dia foi expressa como o desvio padrão relativo (% RSD).

5.6 ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE QUITOSANA E GOMA ARÁBICA: FORMAÇÃO DE NANOPARTICULAS

Nanopartículas de quitosana- goma arábica foram preparadas por coacervação. Para determinar a razão ótima de massa (mg) de QUI/GA para obtenção de nanopartículas de menor tamanho e com maior superfície de carga positiva foram realizadas soluções de goma arábica em diferentes concentrações e de quitosana

com concentração fixa. Resumidamente, solução de quitosana (10 mg.mL^{-1}), 15 mL, foi preparada em ácido acético a 1% sob condição de agitação magnética (1000 rpm) a 25°C , com pH ajustado para 5,0 usando NaOH 1N. Também foram preparadas 15 mL de soluções de goma arábica com diferentes concentrações (30; 35; 40; 45; 50 e 60 mg.mL^{-1} , pH 4,5-5). Para tal, a quantidade necessária de pó de goma foi dispersa em água deionizada nas mesmas condições que a quitosana. Em seguida, 1 mL de cada solução de GA foi adicionada em 1 mL de solução de QUI. As nanopartículas obtidas em cada ensaio foram caracterizadas quanto ao tamanho de partículas e ao potencial zeta. Para se verificar a interação entre os polímeros foi realizada a análise térmica da QUI, GA e das nanocápsulas.

5.7 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS QUITOSANA- GOMA ARÁBICA-ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (NQGA-OEO)

As nanocápsulas foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Alvim e Grosso (2010) com adaptações. Inicialmente 15 mL de quitosana 0,5% (m/v) foi diluída em ácido acético a 1%, a qual permaneceu sob agitação em agitador magnético por 8 horas. Óleo essencial de orégano e tween 80 foram adicionados à solução de quitosana, agitada no ultraturrax (T25 JK labortechnik) a 8000 rpm por 2 min, formando uma emulsão. Paralelamente, 15 mL de solução de goma arábica 2,5% (m/v) foi preparada sob agitação por 30 minutos. A solução de goma arábica foi adicionada, à dispersão coloidal previamente formada, por gotejamento sob agitação magnética por 60 min. Posteriormente, se procedeu a centrifugação (Kubota- KN 70) por 20 min a 4000 rpm, removendo o sobrenadante e lavando as nanocapsulas formadas três vezes com água ultra-pura (Milli-Q), seguido de ultra-som (Ciencor – USC 2800) por 5 minutos.

5.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS NANOCÁPSULAS (NQGA-OEO)

No presente estudo, um experimento fatorial incompleto (Box-Behnken Design) com pontos centrais levando a 15 corridas aleatórias experimentais foi utilizado para otimizar a formulação e os parâmetros de processo para a preparação de nanocápsulas de quitosana e goma arábica carregadas com óleo essencial de

orégano. As nanocápsulas foram preparadas conforme descrito na Seção 5.7 usando óleo de orégano, quitosana, goma arábica e Tween 80. Para a otimização das nanocápsulas foram verificadas três variáveis independentes, concentração de óleo de orégano (x1) (150; 450; 750 μL), concentração de quitosana/goma arábica (1:5) (x2) (6,6 mg QUI/ 33 mg GA; 10 mg QUI/ 50 mg GA; 13,3 mg QUI/ 66,5 mg GA) e concentração de Tween 80 (x3) (0,04; 0,09; 0,13 mg). Para cada variável, foi atribuído um valor baixo, médio ou alto (ver Tabela 2). O tamanho e o potencial zeta das nanocápsulas foram escolhidos como variáveis dependentes de resposta. O objetivo da otimização foi obter nanocápsulas com menor tamanho e com maior carga positiva de superfície.

5.9 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS (NQGA-OEO)

5.9.1 Análise do tamanho de partículas

Foi determinado as dispersões de diâmetro médio hidrodinâmico e distribuição de tamanho das nanocápsulas a 25 ° C por dispersão de luz quase elástica usando um Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Orsay, França). O ângulo disperso foi fixado a 90 °. As amostras foram diluídas 1:100 com água Milli® Q antes da análise. Cada medida foi realizada em triplicata, o que significa que a média foi calculada a partir de 9 valores.

5.9.2 Determinação do potencial zeta

O potencial Zeta das nanocápsulas foi realizado através da medição da determinação da mobilidade eletroforética por eletroforese laser doppler (Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Orsay, França). As dispersões de nanocápsulas foram diluídas (1:100) com NaCl a 1 mmol.L⁻¹. Esta medição foi realizada a uma temperatura de 25 °C sendo os resultados expressos em mV. Os valores foram apresentados como resultado das medidas realizadas em três amostras replicatas.

5.9.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A interação entre QUI, GA na obtenção das nanocápsulas foram avaliadas por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As amostras foram preparadas em discos KBr e a transmitância foi medida de 500 a 4000 cm^{-1} usando um espectrômetro FT/IR-4600 (Jasco, Maryland, EUA).

5.9.4 Análise térmica

As curvas termogravimétricas (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas usando equipamento de análise térmica simultânea (Perkin Elmer Pyris 6). Amostras de cerca de 5 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio selados com tampas perfuradas. As medições foram feitas a partir da temperatura ambiente até 400 °C usando uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

Os sensores e cadinhos estavam sob fluxo constante de nitrogênio (70 mL.min⁻¹) durante o experimento.

5.9.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5600LV, PAIS). As amostras foram fixadas em um suporte metálico com auxílio de uma fita dupla-face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro. A visualização foi realizada em aumentos de 300 a 2200 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 a 15 kV (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002).

5.9.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As micrografias por AFM foram obtidas no microscópio SPM-9700® (Shimadzu, Japão), operando no modo de contato intermitente em temperatura ambiente. As amostras de nanocápsulas foram depositadas em superfície de mica e secas em temperatura ambiente durante 48 h. A sonda de silicone (Pointprobe®, NanoWorld AG, Suíça) foram utilizados para obter as imagens, usando uma constante de mola na faixa de 21-78 N/m. A frequência de ressonância foi ajustada para 320 kHz, e a taxa de escaneamento foi de 1 Hz. Uma área de 5 μm x 5 μm foi analisada para cada amostra.

5.10 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ENCAPSULAMENTO (% EE)

As nanocapsulas foram diluídas em 1mL de acetato de etila, sonicadas por 15 minutos e centrifugado (centrífuga Eppendorf 5418, Rotor FA-45-18-11, Hamburgo, Alemanha) a 15000 rpm por 20 min para remover possível precipitado. As amostras foram diluídas conforme necessário com fase móvel para uma concentração final de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e filtrado através de um filtro Millipore de $0,22 \mu\text{m}$ antes da análise de CG-EM. O conteúdo do óleo essencial nas nanocápsulas foi determinado usando a curva padrão do carvacrol (XAVIER-JUNIOR et al.,2018).

5.11 ESTUDO DE ESTABILIDADE TÉRMICA

Para a realização do estudo da estabilidade térmica, as nanocápsulas foram acondicionadas em frascos de vidro em temperatura ambiente (25°C), refrigeração (4°C) com umidade relativa de 53 %, e em sala climatizada a 45°C (SANSONE et al., 2011b; QV; ZENG; JIANG, 2011). O teste de estabilidade foi realizado por 180 dias, sendo avaliadas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias, onde foi avaliado tamanho e potencial zeta das NQGA-OEO.

5.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) das nanocápsulas foi determinada através do método de microdiluição em caldo BHI em microplaca de 96 poços de acordo com a padronização do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2006; WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

Inicialmente, um volume de $50 \mu\text{L}$ do inóculo (10^6 UFC.mL^{-1}) foi adicionado a cada poço contendo $50 \mu\text{L}$ de Caldo BHI adicionado de diferentes concentrações das nanocápsulas, variando de $0,625$ a $80 \mu\text{L.mL}^{-1}$. Simultaneamente, foi preparado o controle de crescimento (positivo), contendo caldo BHI e inóculo bacteriano, e de esterilidade (negativo), apenas caldo BHI. O sistema foi agitado suavemente por 30 segundos, e incubado a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados $30 \mu\text{L}$ de resazurina (Inlab), preparada em solução aquosa (0,01%), em todos os

poços e reincubadas a 37 °C por 20 minutos, quando então foi realizada a leitura visual (MONTE et al., 2014).

A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que é utilizado para avaliar a viabilidade celular bacteriana. A permanência da cor azul nos poços é interpretada como ausência do crescimento bacteriano, enquanto o desenvolvimento de cor rosa ou incolor, como presença de crescimento bacteriano. A CIM é definida como a menor concentração do bioativo capaz de inibir o crescimento microbiano. O teste foi realizado em triplicata.

5.13 INFLUÊNCIA DAS NANOCÁPSULAS SOBRE A VIABILIDADE DAS CEPAS BACTERIANAS

Os ensaios de interferência das nanocápsulas sobre a viabilidade das cepas bacterianas foram realizados pelo método de contagem de células viáveis (BARROS et al., 2009). Para isso, 4 mL de caldo BHI foram inoculados com 1 mL da suspensão bacteriana de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538 (10^6 UFC.mL⁻¹), em seguida foram adicionados 5 mL da suspensão das nanocápsulas e suavemente agitada por 30 segundos. O sistema foi incubado a 37 °C, em diferentes intervalos de tempos (0, 2, 4, 8, 12 e 24 h) uma alíquota de 1 mL da suspensão, em cada tempo, foi seriadamente diluída (1:10 v/v) de 10^{-1} a 10^{-5} em solução salina e uniformemente inoculada em placas de Petri estéreis contendo ágar Nutriente (Himedia, Índia) por 24 h a 37 °C. No experimento controle, as nanocápsulas foram substituídas por 5 mL de água destilada estéril. Após o término do período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, expressa em log de UFC.mL⁻¹.

5.14 EFEITO DAS NANOCÁPSULAS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM ATUM AZUL

Porções de 10 g das postas de atum azul, pescados no dia do experimento, conforme descrito no tópico 5.3, foram acondicionados em frascos Erlenmeyer com tampas, e em seguida submetidos à autoclavagem (121 °C por 15 minutos, 1 atm). Depois disso, as postas foram inoculadas por imersão em 50mL de uma suspensão microbiana de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538 a 10^6 UFC/mL.

A suspensão microbiana foi preparada em solução salina estéril 85% e padronizada conforme descrito no tópico 5.2. Subsequentemente, as porções de peixe foram submersas em 50 mL soluções de nanocápsulas durante 5 min (grupo 1) e 10 min (grupo 2) a 25 °C. Em seguida, amostras de 5 g do peixe foram obtidas, assepticamente, transferidas para um saco Stomacher estéril contendo 25 mL de solução salina estéril (0,85 g/100 mL) e homogeneizada durante 60 s. Em seguida foram realizadas diluições decimais no mesmo diluente, e sendo realizada a contagem bacteriana por “spread plate” em agar seletivo estéril durante 24-48 h a 37 °C (Azerêdo et al, 2011 e Sousa et al, 2012). Como controle negativo foi utilizado água destilada esterilizada. Os resultados foram expressos como a redução nas contagens bacterianas- RCB (redução de ciclos de log) em relação à população bacteriana inicial no tempo zero, segundo equação 2.

$$RCB = \text{Log } N_0 - \text{Log } N \quad \text{Eq. 2}$$

Sendo: N_0 a contagem de bactérias inicial no tempo zero e N a contagem de bactérias finais, após o período de incubação.

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (comparação de médias) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. Para o tratamento estatístico foi utilizado o software Sigma Stat. 3.1. No planejamento experimental os efeitos das variáveis estudadas foram interpretados graficamente e estatisticamente usando o software Statistic (versão 7.0, StatSoft Inc., EUA) para validar o desenho estatístico. Gráficos de superfície de resposta foram gerados para visualizar o efeito simultâneo de cada variável em cada parâmetro de resposta. Os dados de FTIR, TG e DSC foram processados no (Origin 8, OriginLab Northampton, EUA) e os gráficos finais plotados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO OEOV

Para investigar a composição química do OEOV, realizou-se a caracterização pela técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada com Espectrometria de Massas (CG-EM). Um total de 24 constituintes foram identificados no OEOV utilizado neste estudo. Os constituintes detectados em quantidades superiores a 0,30% no OEOV estão descritos na (Tabela 2).

Tabela 2 - Constituintes identificados no óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

Pico	T. de retenção	Constituintes	Composição %
1	3.779	α -pinene	0,46
2	4.522	Myrcene	0,35
3	5.241	<i>p</i> -cymene	10,45
4	5.917	γ -terpinene	5,69
5	6.772	Linalol	1,47
6	10.775	Thymol methyl ether	0,50
7	12.265	Thymol	1,23
8	12.793	Carvacrol	78,82
9	16.384	β -caryophyllene	0,73
Total			99,70

Resultados expressos em porcentagem (%) da área total para constituintes com área percentual > 0,3%.

O teor de carvacrol do óleo essencial de *O. vulgare*, analisado foi de 78,82%. Esse resultado está de acordo com os estudos anteriores, revelando que o carvacrol é o composto mais abundante no óleo essencial de *O. vulgare* (GOVARIS et al., 2010; KHAN et al., 2018; LAOTHAWEEERUNGSAWAT et al., 2020). O *p*-cimeno (10,45%), γ -terpineno (5,69%), linalol (1,47%) e timol (1,23%) foram detectados como outros compostos mais presentes após o carvacrol. Demais constituintes, como α -pineno (0,46%), mirceno (0,35%), β -cariofileno (0,73%) e timol metil éter (0,50%) foram detectados em quantidades menores. As variações das composições químicas de óleos essenciais são devido a vários fatores, incluindo condições ambientais (por

exemplo, altitude, temperatura, precipitação e distribuição geográfica), variação sazonal e variações diurnas em diferentes estágios de desenvolvimento da planta (GHAFFARI et al., 2018; BURT, 2004; KHAN et al., 2018).

Sabe-se que os compostos majoritários presentes nas plantas são aqueles que determinam as propriedades biológicas dos seus óleos essenciais (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). O carvacrol é comumente relatado como o componente majoritário presente no óleo essencial de orégano. Trata-se de um composto fenólico hidrofóbico com atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos já relatada em estudos científicos (BURT, 2004; DOGRUYOL, et al. 2020), além de exercer efeito antioxidante (BASER, 2008), o que indica o potencial promissor do composto quando empregado em alimentos, visando estender a vida-de-prateleira e obter a estabilidade microbiológica dos produtos (RUBILAR et al., 2013). Pesquisadores sugerem que os demais compostos majoritários presentes nos óleos essenciais também influenciam na bioatividades dos óleos. Isto pode explicar por que os compostos isolados muitas vezes apresentam bioatividade inferior ao óleo essencial propriamente dito (TEIXEIRA et al., 2013; CALO et al., 2015).

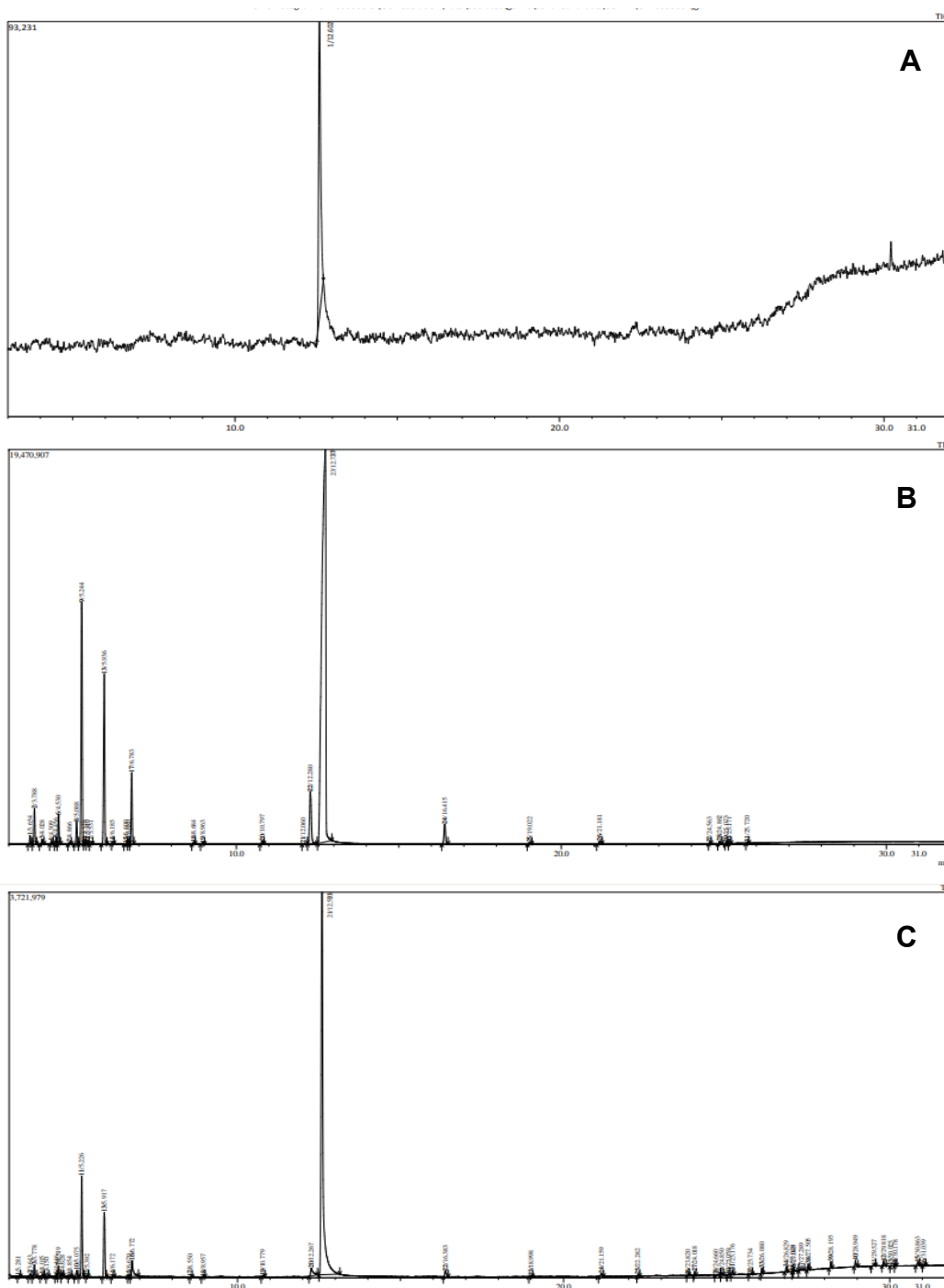
6.2 VALIDAÇÃO DO CARVACROL

6.2.1 Seletividade

Estudos envolvendo a composição de óleos essenciais e seus constituintes têm mostrado que há grande diversidade de substâncias voláteis presentes nessas amostras, o que dificulta a separação e identificação dos compostos de interesse (CASTELLAR et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017). Desta forma, a utilização da cromatografia gasosa tem sido uma importante ferramenta devido a sua praticidade e grande eficiência na separação de amostras complexas principalmente quando associada a detectores, tais como o espectrômetro de massas. A seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja originário exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (PASCHOAL et al., 2008). Para isso, foi realizada cromatograma do carvacrol, do óleo de orégano e da nanocapsula (goma arábica- quitosana- óleo essencial de orégano) a fim de avaliar a possível interferência destes compostos na quantificação do carvacrol contido no óleo essencial de orégano.

O perfil cromatográfico é mostrado na Figura 6 e foi obtido após análise prévia do carvacrol.

Figura 6 - Perfil cromatográfico de (A) carvacrol; (B) óleo essencial de orégano (C) nanocápsula quitosana-goma arábica- óleo essencial de orégano por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

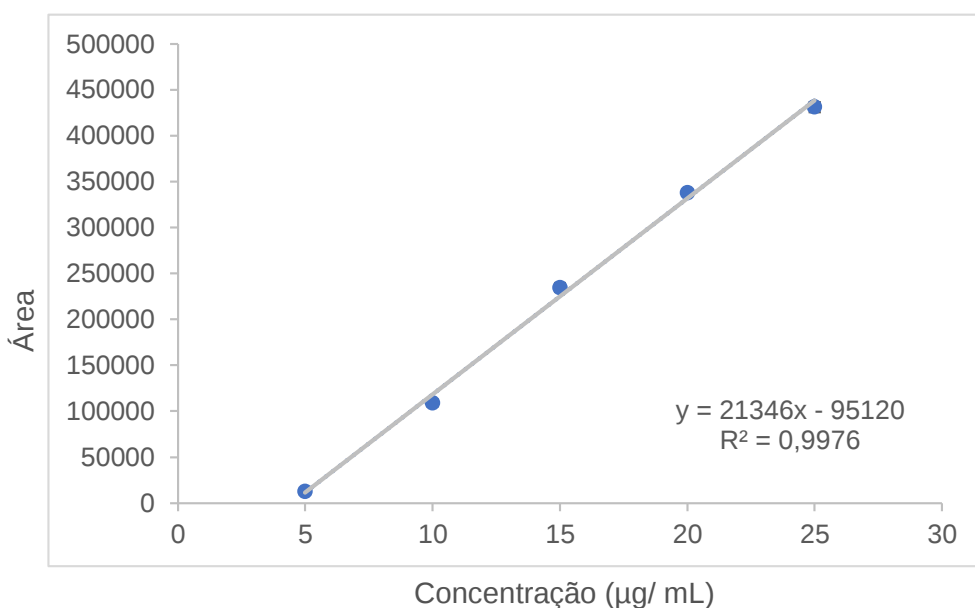


pois não apresentam compostos na mesma razão de massa do carvacrol demonstrando que o método de quantificação é seletivo (SANTOS et al., 2017).

6.2.2 Linearidade

O método proposto apresentou linearidade na faixa de concentração de 5 a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A linearidade está expressa pelo coeficiente de correlação da curva analítica, como está representado na figura 7.

Figura 7 - Curva analítica do carvacrol apresentando a regressão linear.



A equação da reta, determinada através do método dos mínimos quadrados, obteve como resultado: $y = 21.346x - 9.5120$, onde x foi a concentração de carvacrol em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e y a área ambos obtidos por CG - EM, apresentando um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9976. Este coeficiente é um parâmetro que permite estimar a qualidade da curva obtida, pois valores superiores a 0,99 indicam a existência de uma resposta linear na faixa de concentração trabalhada (BRASIL, 2003). Assim, os resultados encontrados demonstram que a curva analítica pode ser utilizada para quantificar amostras contendo carvacrol, conferindo a validade do método de acordo com a linearidade.

6.2.3 Limite de detecção e de quantificação

Quanto ao limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), o método

apresentou um valor de LD de $0,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e LQ de $0,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Demonstrando limites satisfatórios, uma vez que os resultados foram inferiores à menor concentração utilizada na construção da curva de linearidade ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

6.2.4 Exatidão e Precisão

A exatidão do carvacrol foi de 99 a 102%, com um valor de RSD de 3,59%. A precisão foi estimada pelo intra-dia (repetibilidade) e pela precisão inter-dia. A precisão intra-dia foi investigada injetando-se amostras em triplicado de soluções de carvacrol em três concentrações diferentes (5 , 15 e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A precisão inter-dia foi determinada pela avaliação da repetibilidade do método analítico, se reproduzido no mesmo laboratório, mas em outro dia. Os resultados obtidos para os estudos de precisão intra e inter-dia são apresentados na Tabela 3. Baseado em nesses resultados, o método foi considerado satisfatório, apresentando baixos erros aleatórios ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Resultados dos ensaios de acurácia e precisão expressos em média, DV e CV (%).

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Carvacrol		
	Concentração medida		
	Média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DV	CV (%)
Variação intra-dia			
5	5	0,05	1
10	15,2	0,16	1,06
25	24,7	0,26	1,04
Variação inter-dia			
5	5	0,05	0,95
10	15,5	0,18	1,22
25	24,7	0,26	1,06

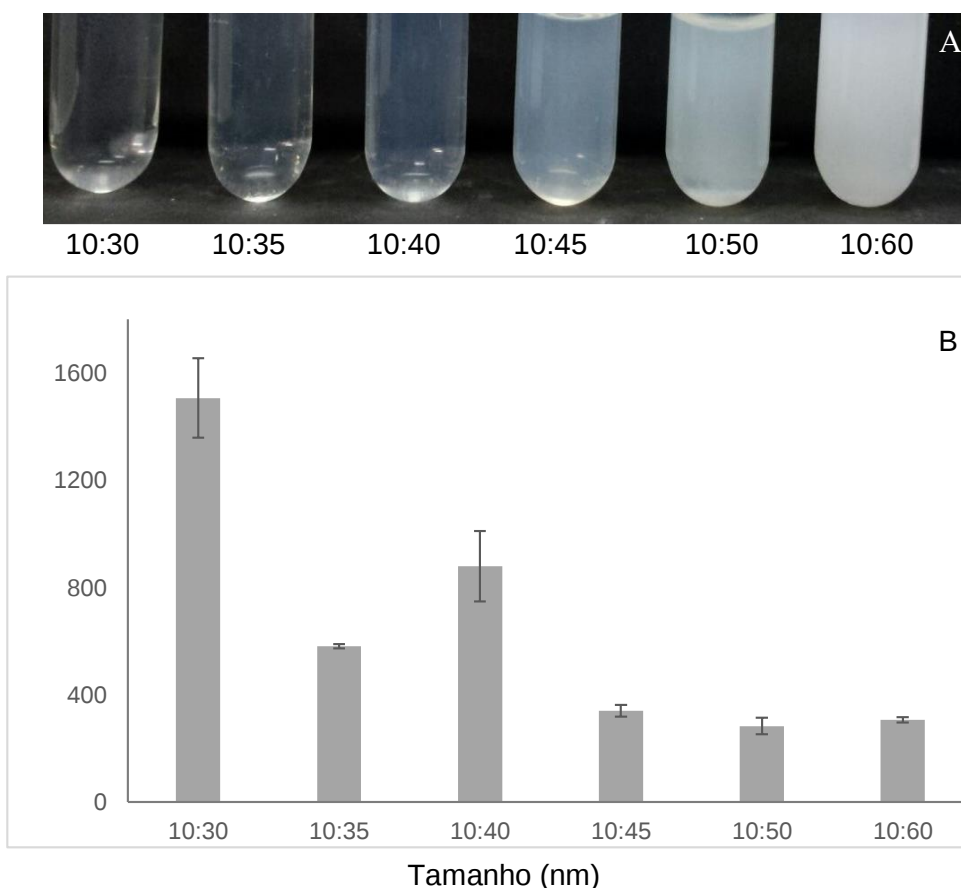
6.3 INTERAÇÃO ENTRE OS BIOPOLÍMEROS E PREPARAÇÃO DAS NANOCAPSULAS

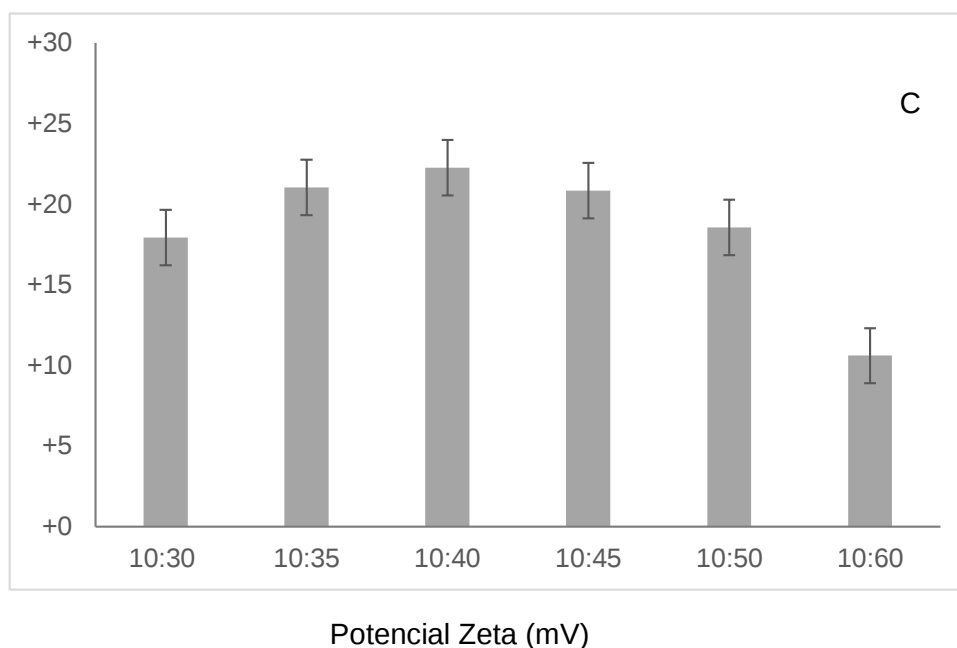
A nanocápsula foi preparada utilizando a técnica de coacervação complexa. O processo inclui duas etapas principais, o passo de emulsão que determina o tamanho

e a distribuição das nanocápsulas; e a formação do invólucro polimérico ao redor das cápsulas. O passo de emulsificação pode ser influenciado por vários parâmetros físicos, tais como a configuração do aparelho, a taxa de agitação, a relação volumétrica das duas fases e as propriedades físico-químicas, como tensão interfacial, viscosidade, densidade e a composição químicas das duas fases. O segundo passo é regido pela capacidade dos dois biopolímeros de se complexarem por possuir cargas opostas. A complexação depende da densidade de carga de ambos os biopolímeros, e estão relacionadas ao pH, à força iônica, à concentração total e à relação dos dois polímeros (ZHANG et al., 2012; BASTOS et al., 2020).

Cada etapa foi analisada observado a influência dos polímeros sobre o tamanho da partícula, carga de superfície e o mecanismo de formação da nanocápsula. Assim, para determinar as condições ideais para a síntese de nanocápsulas QUI/GA contendo óleo de orégano, o estudo se baseou na determinação da proporção da quantidade de QUI/GA para produzir uma coacervação ideal, como pode ser visualizado na Figura 8, na qual se relaciona as proporções de polímeros com o tamanho e potencial zeta da partícula.

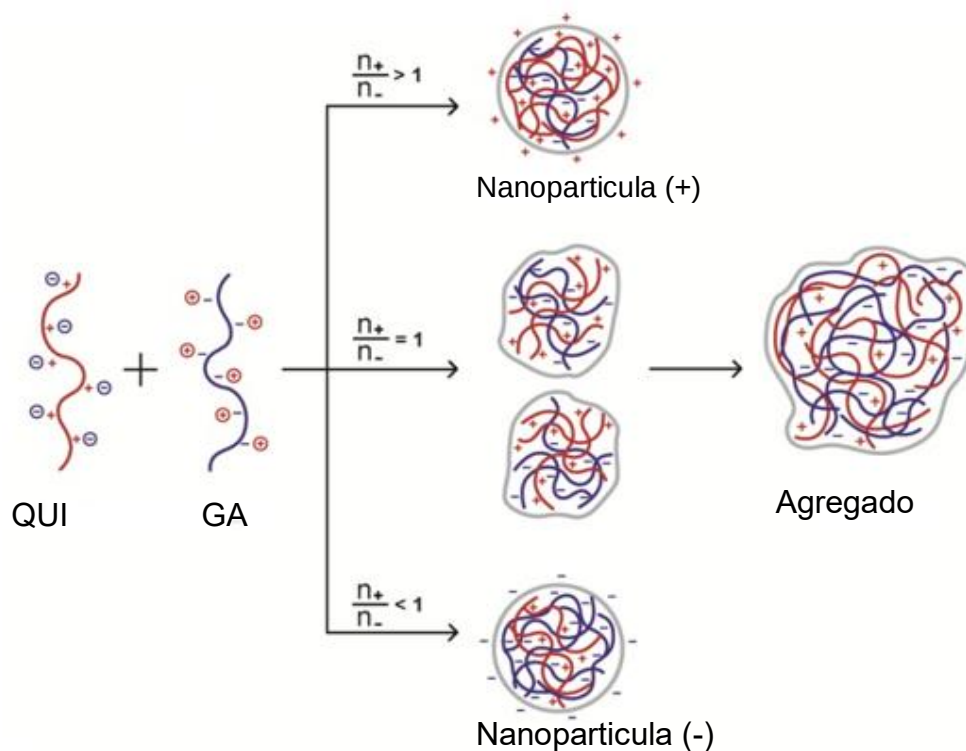
Figura 8 - Variação do tamanho da partícula e potencial Zeta da solução de quitosana (10 mg.mL^{-1}) e das várias concentrações de goma arábica (30 a 60 mg.mL^{-1}).





As formulações mostraram uma pequena variação em termos de tamanho de partícula, porém a relação QUI/GA (10/30 e 10/40 mg.mL^{-1}) foi discrepante em relação ao tamanho médio, estando acima da escala nanométrica. Quando a quantidade GA foi aumentada, um pico único de distribuição de partículas foi obtido indicando dispersão uniforme com baixo índice de polidispersividade. O potencial zeta sempre foi positivo acima de +10 mV, independentemente da concentração de GA (Figura 8 C). Quando a proporção, em massa (mg), de GA foi muito alta (QUI:GA 10/60), foi observada uma redução do potencial zeta devido ao excesso de carga negativa do polissacarídeo aniônico. Esses resultados confirmam a hipótese de que as interações eletrostáticas são a principal força motriz para formar pequenas nanopartículas de QUI/GA dispersas homogeneamente. Além disso, as cargas positivas da QUI são posicionadas na superfície do invólucro das nanopartículas, como demonstradas na figura 9.

Figura 9 - Efeito da relação de carga de polieletrólitos no tamanho e na carga dos complexos formados.



(Adaptado de QUIÑONES, PENICHE, PENICHE, 2018).

A GA possui muitos grupos de ácidos carboxílicos em seu monômero principal (β -D-galactopiranosose ligado à 3,6 substituído na posição 6 por cadeias laterais da α -1-arabinofuranose 3 ligada) que possui um pKa próximo a 3,5, desenvolvendo cargas negativas em todo os intervalos de pH (GONÇALVES et al., 2018). Por outro lado, a QUI possui unidades de glucosamina (2-amino-2-desoxi- β -D-glicose) e esses grupos aminos levam a um alto valor de pKa de 6,8 e, ao contrário da maioria dos polissacarídeos, desenvolvem cargas positivas em uma ampla faixa de pH, sendo mais alto em pHs ácidos. Pesquisas também sugerem que relação na formação de nanopartículas ocorre devido a interações eletrostáticas entre QUI e GA de baixo peso molecular, resultando em uma dispersão coloidal leitosa (USMIATI et al., 2014; QUIÑONES, PENICHE, PENICHE, 2018). Assim, quando a interação de ambos os polieletrólitos é estabelecida, várias interações eletrostáticas são geradas nas cadeias de QUI, levando a uma complexação polieletrólítica positiva, como descrito na figura acima (CIRO et al., 2020).

Tomados em conjunto, a razão QUI/GA a 10:50 foi selecionada devido ao menor tamanho de partícula e maior carga positiva das nanopartículas

individualizadas com tamanhos variando de 290 a 315 nm e potencial zeta de $+15,89 \pm 4$ mV. Esses resultados corroboram com os relatados por Butstraen e Salaun (2014), que obtiveram uma ótima relação QUI/GA de 1:5 para produzir micropartículas carregadas de migliol. Em contrapartida Rajabi et al. (2019) encontraram uma melhor relação QUI/GA de 2:1 para encapsular extrato de açafrão corroborando com Avadi et al. (2010) que utilizaram a mesma proporção para encapsular insulina. O que permite aos autores sugerir que as proporções dos biopolímeros podem variar por diversos motivos, tais quais: o método de preparação, o tipo e a concentração do material do núcleo, a razão de peso dos materiais da parede, o peso molecular e o tamanho das moléculas. Estes são os fatores que afetam diretamente no tamanho e no potencial zeta das nanopartículas.

6.4 PLANEJAMENTO FATORIAL

Com base nos resultados obtidos na primeira etapa de preparações de nanopartículas, foi realizada a otimização das condições de preparação das nanocápsulas quitosana- goma arábica contendo óleo essencial de orégano. A abordagem do projeto experimental usado neste estudo com limitação do número de experimentos a serem realizados, portanto, reduzindo materiais e tempo. Assim, a otimização foi realizada seguindo uma abordagem de planejamento experimental do tipo Box-Behnken (BBD), uma classe de modelo de segunda ordem com base em três níveis de delineamento fatorial incompleto. Foram consideradas três variáveis independentes, incluindo o óleo de orégano (X1), polímeros (QUI/GA) (X2) e surfactante (Tween 80) (X3) (Tabela 4). Os parâmetros ótimos escolhidos foram aqueles que produziram nanocápsulas de menor tamanho com maior carga positiva de superfície.

Tabela 4 - Variáveis e os níveis do Planejamento experimental do tipo Box-Behnken.

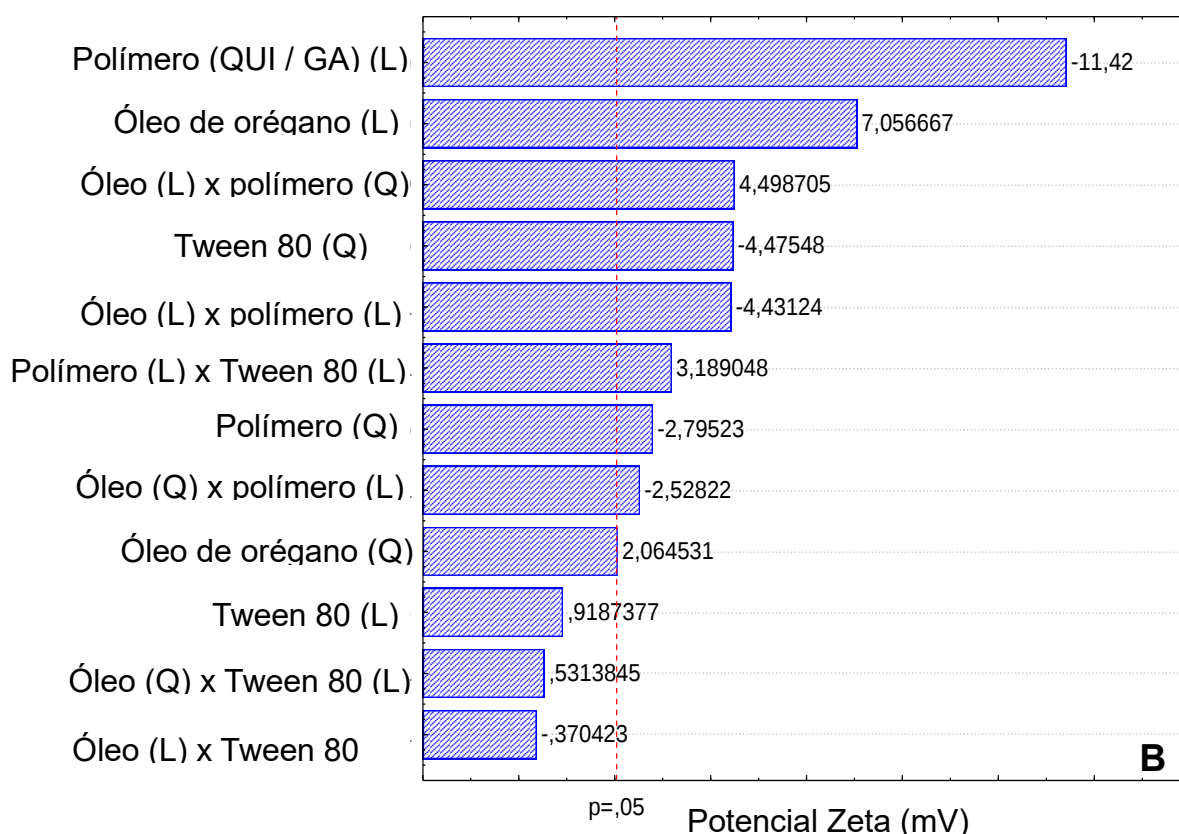
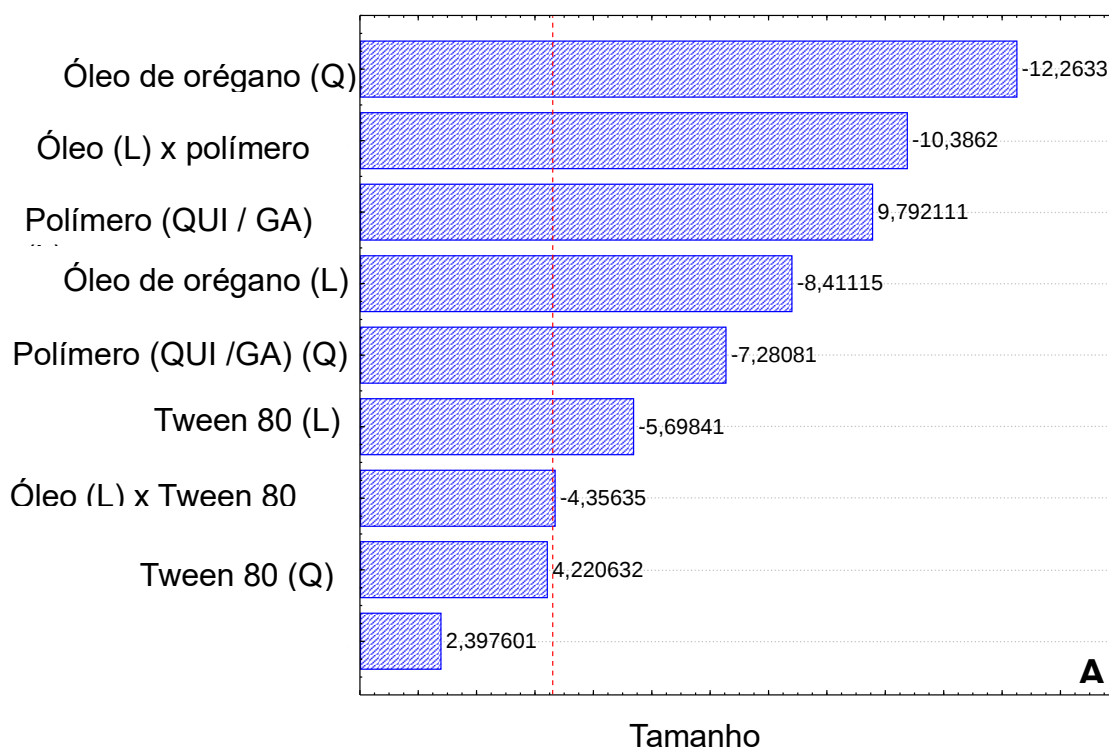
Variáveis Independentes (%)	Níveis		
	-1	0	+1
X1	0,5	1,5	2,5
X2	2	3	4
X3	0,15	0,3	0,45
Variáveis Dependentes			Limites
Y1			Mínimo
Y2			Máximo

Onde, X1= Concentração de Óleo essencial de orégano; X2= Concentração de quitosana/goma arábica (1:5); X3= Concentração de Surfanctante não iônico (Tween 80); Y1= Tamanho de Partícula; Y2= Potencial Zeta.

gráfico de Pareto (Figura 10) fornece uma importante relação dos efeitos individuais e de interação das variáveis independentes (óleo essencial de orégano, QUI/GA e Tween 80) sobre as variáveis dependentes (tamanho de partícula e potencial zeta das nanocápsulas). Além disso, com essa análise, foi possível identificar variáveis estatisticamente significantes (valor $p < 0,05$). O comprimento de cada barra no gráfico indicou o efeito padronizado da variável correspondente na resposta. Valores negativos indicam efeito desfavorável ou antagonista para o desenvolvimento de nanocápsulas com as características desejadas, isto é, menor tamanho e potencial zeta positivo, enquanto os coeficientes positivos mostraram um efeito favorável ou sinérgico (Xavier-Junior et al., 2018).

Assim, todas as variáveis foram estatisticamente significantes para produzir nanocápsulas com tamanho reduzido de partícula ($r^2 = 0,998$, $r^2_{adj} = 0,985$). As variáveis independentes com exceção da concentração de surfactante (X3) foram significativa para aumentar os valores de potencial zeta ($r^2 = 0,913$, $r^2_{adj} = 0,881$).

Figura 10 - Gráfico de Pareto apresentando o efeito dos fatores sobre o (A) tamanho e (B) potencial Zeta das nanocápsulas de óleo de orégano.



O fator que exerceu maior influência positivamente sobre o tamanho das nanocápsulas foram os polímeros utilizados (QUI/GA) seguido do tween 80, um surfactante não iônico. Já nanocápsulas maiores estão relacionadas principalmente

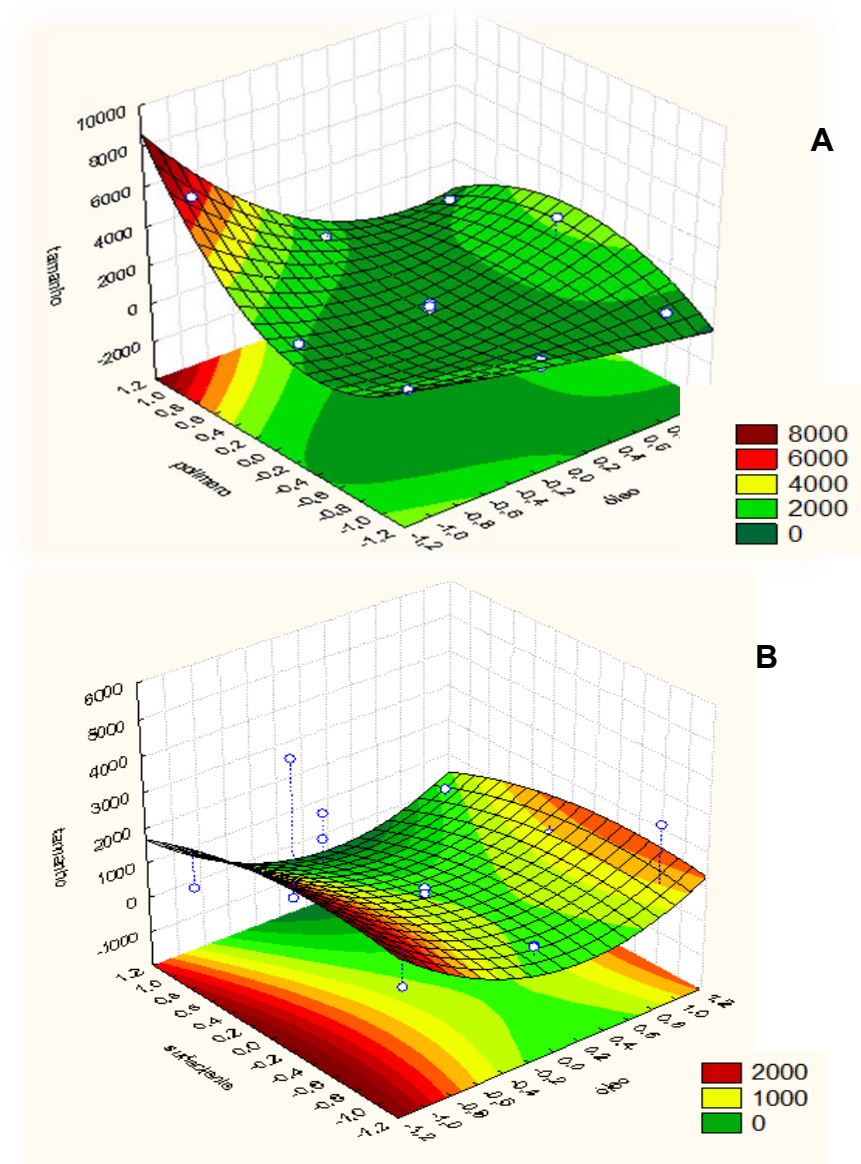
com o óleo essencial de orégano. A elevada carga elétrica das nanocápsulas desenvolvidas no estudo sugere boa estabilidade da suspensão, pois quanto maior o potencial zeta, tanto positivo quanto negativo, maiores são as interações repulsivas, diminuindo assim a frequência das colisões e possibilidade de precipitação (MALHEIROS et al., 2010).

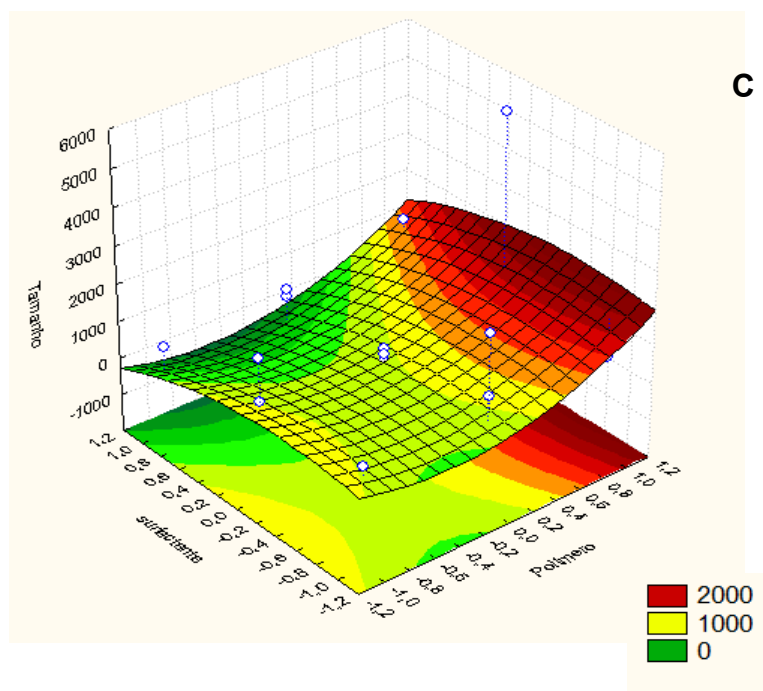
Nanopartículas de zeína, proteína do glúten do milho, carregadas com timol e estabilizadas com caseinato de sódio e cloridrato de quitosana foram preparadas e caracterizadas no estudo realizado por Zhang et al. (2014). Na ausência de caseinato de sódio o tamanho das partículas e o potencial zeta foram de 118,30 nm e +28,10 mV, respectivamente. Após revestimento das nanopartículas com caseinato de sódio, houve inversão do sinal do potencial zeta, que passou de positivo para negativo, na faixa de -33,60 a -38,95 mV, enquanto o tamanho passou para cerca de 200 nm. Os tensoativos utilizados, o pH do meio, concentração, força iônica da solução e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o tamanho e o potencial zeta (CRUCHO; BARROS, 2017).

O potencial zeta é medido utilizando técnicas de eletroforese e está relacionado com a carga de superfície da partícula (CLOGSTON; PATRI, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003). Esse parâmetro é tido como um dos indicadores de estabilidade de uma solução de nanopartículas, sendo valores mais altos considerados um indício de maior estabilidade, já que as partículas se repelem com mais vigor, diminuindo as chances de aglomeração (FRANCO et al., 2013; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Visando o exame direto das variáveis experimentais, gráficos de superfície de resposta foram desenhados tridimensionalmente. A Figura 11 (A, B, C) mostra um gráfico de superfície de resposta relacionado ao tamanho da nanocápsulas. A região de interesse possui coloração verde escuro, uma vez que corresponde aos menores tamanhos de nanocápsulas. Através da superfície plotada, observa-se que quanto maior a quantidade de óleo essencial de orégano e surfactante e menor a quantidade de polímero menores são os tamanhos encontrados para as nanocápsulas. A resposta considerando o tamanho da nanocápsulas variaram linearmente com cada uma das variáveis demonstrando que houve interações consideráveis entre cada uma das variáveis independentes e o tamanho das nanocápsulas obtidas das diferentes condições testadas.

Figura 11 - Gráfico de superfície de resposta relacionando o tamanho da nanocapsula, e o efeito do óleo de orégano, do polímero, e do surfactante.



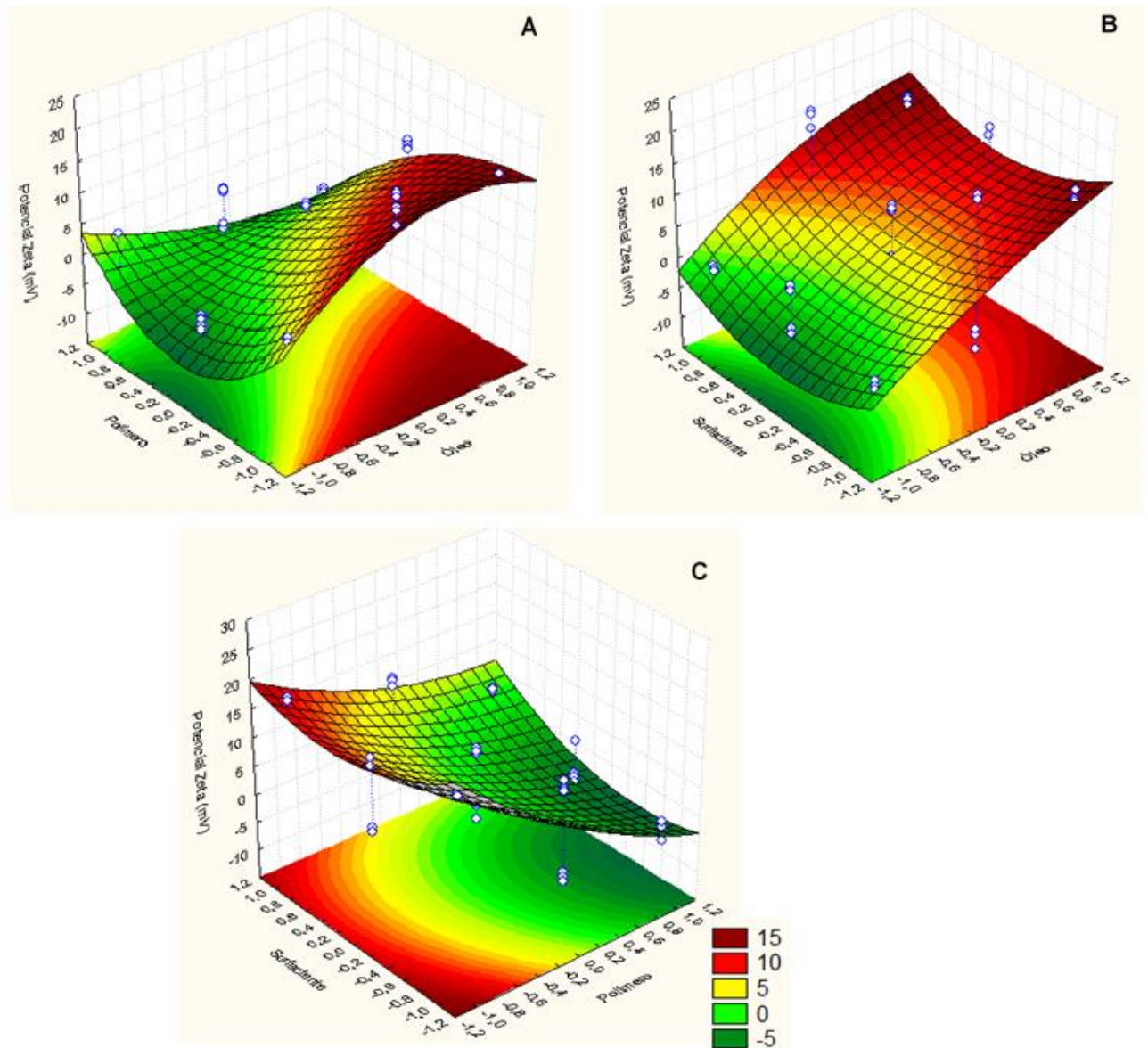


As nanocápsulas de óleo de orégano apresentaram valores de potencial zeta variando de + 15 a + $34,8 \pm 0,8$ mV. A figura 12 apresenta a superfície de resposta relacionado ao potencial Zeta das nanopartículas ($r^2 = 0,913$, $r^2_{adj} = 0,881$). A concentração de surfactante não foi uma variável significativa para aumentar o valor do potencial zeta.

A região de interesse possui coloração vermelho escuro, uma vez que corresponde a maior carga positiva de potencial Zeta das nanocápsulas. Através da superfície plotada, observa-se que quanto maior a quantidade de óleo essencial de orégano e de polímero maiores são os valores positivos para o potencial zeta encontrados para as nanocápsulas. Esse valor se deve a cadeia de quitosana que é positiva e por sua vez as nanopartículas formadas continuam com essa carga.

Alishahi et al (2011) prepararam nanopartículas de quitosana, diluída em ácido acético, reticulada com tripolifosfato (TPP) adosridas com gentamicina e vitamina C e obtiveram potencial zeta de +49,3 mV. Os autores relatam que o potencial zeta diminuiu a medida que a razão entre a solução tampão de fosfato (PBS) e a quitosana aumentou, apresentando aglomeração significativa em pH 7,4 (ALISHAHI et al., 2011). Ji et al (2011), também obtiveram nanopartículas de quitosana de maneira semelhante ao estudo de Alishahi et al (2011) e descreveram potencial zeta de +42,18 mV, devido a presença de grupamentos amino protonados na superfície das nanopartículas.

Figura 12 - Gráfico de superfície de resposta relacionando o potencial Zeta, e o efeito do óleo de orégano, do polímero, e do surfactante



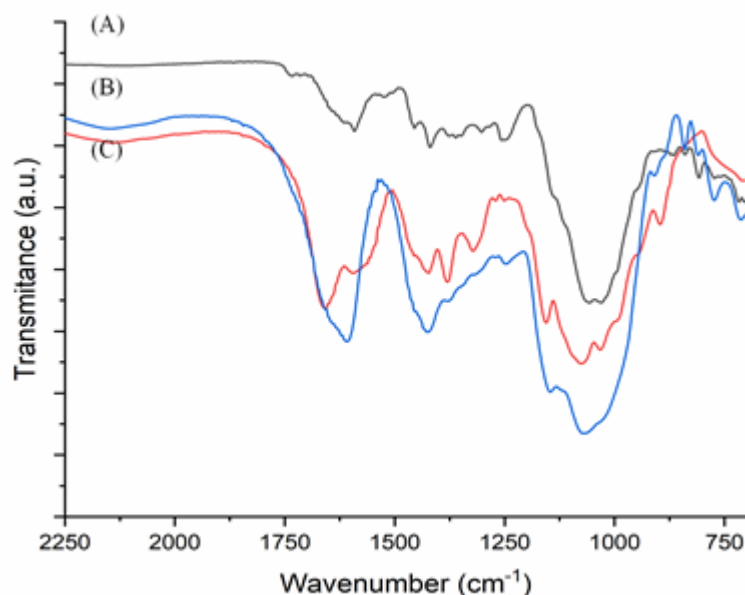
O resultado do estudo de otimização seguindo um projeto experimental do tipo Box-Behnken (BBD) permitiu identificar condições ideais para a preparação de nanocápsulas nos padrões desejados para o presente estudo. A formulação otimizada consistiu em 470mg de óleo de orégano, 659mg de quitosana/goma arábica (1:5) e 0,13mg de surfactante. Esta formulação apresentou tamanho de partícula de $323 \pm 22\text{nm}$, distribuição do tamanho unimodal com índice de polidispersão de $0,20 \pm 0,02$ e e potencial zeta acima $+15,8 \pm 0,8\text{mV}$, respectivamente.

6.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O espectro de FTIR da goma arábica (Figura 13) mostram picos característicos a partir de 1600 até 750 cm^{-1} que são correspondentes ao alongamento de $-\text{OH}$, assimétrico $-\text{COO}$, $-\text{COO}$ simétrico e $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de ligação glicosídica (NAYAK; DAS; MAJI, 2012). Os picos característicos da quitosana são aproximadamente entre 1630 -1650 cm^{-1} correspondem à vibração de CO do carbonil; 1500 cm^{-1} é devido a uma combinação de deformação $-\text{NH}$ e alongamento $-\text{CN}$; 1375 cm^{-1} está associado a $-\text{CH}_3$ no grupo amida; 1300 cm^{-1} representa a vibração de alongamento $-\text{CH}_2$ devido ao anel de piranose e as bandas específicas dos alongamentos de glicósido β ($1 \rightarrow 4$) CO e COC absorvendo por volta 1050 -1130 cm^{-1} foram observadas, características da estrutura polissacarídica (ATAY; ÇELIK, 2017; BOBU et al., 2011).

Foi observada uma tendência um pouco diferente no espectro de FTIR das nanocápsulas. Como resultado das interações entre os biopolímeros, a região carbonilamida foi alterada, de modo que a vibração de flexão do NH ficou por volta de 1450 cm^{-1} e o pico de absorbância da amida II por volta 1250 cm^{-1} . Isso pode ser causado pela interação eletrostática entre os grupos funcionais negativos da GA e os positivos da QUI (SAH et al., 2016; ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010).

Figure 13 - Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das: A- nanocápsulas de quitosana- goma arábica-óleo essencial de oregano (NQGA-OEO) B- goma arabica (GA) e C- quitosana (QUI).



6.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A análise termogravimétrica (TG) é utilizada para investigar reações relacionados estabilidade térmica e decomposição, desidratação e oxidação (XIAO et al.,2014). A TG mede variações da massa de uma amostra em função da temperatura e do tempo durante o aquecimento (TENGGU-ROZAINA; BIRCH 2019). São observados geralmente, três eventos térmicos na QUI referentes a desidratação da amostra, decomposição do polímero e geração de material carbonizado. Os resultados quantitativos indicam que as amostras contem aproximadamente 12% de água, envolvendo vários tipos de hidratação, como por exemplo adsorção ou ligação fraca entre as moléculas de água, e hidrogênios do polímero (PAWLAK; MUCHA 2003).

O primeiro estágio se iniciou por volta de 50 °C (Figura 14 A) e seguiu até 250 °C, com perda de massa de ~12%. O segundo estágio (260 °C - 320 °C), refere-se a perda de água do interior da estrutura polimérica, podendo ser atribuído ao início da degradação da cadeia principal do polímero, com perda de massa de 40%. O terceiro estágio de degradação térmica refere-se à despolimerização e decomposição da estrutura do polissacarídeo, ocorrendo na faixa de temperatura de 350 °C a 500 °C. A despolimerização das cadeias da quitosana, reações de decomposição e abertura do anel glicopiranosídico acontecem nessa etapa (ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010).

Em seu estudo com nanopartículas de quitosana Duarte Junior (2010) e colaboradores encontraram resultados parecidos de análise termogravimétrica para quitosana. Outro estudo que corroboramos com os resultados obtidos, são os de Sousa et al. (2016) que encontraram três estágios de decomposição para a quitosana pura e apenas dois estágios para a membrana de quitosana com extrato aquoso de rama-branca o que provavelmente, está relacionado com a decomposição térmica de hidratos de carbono e outros compostos orgânicos presentes no extrato.

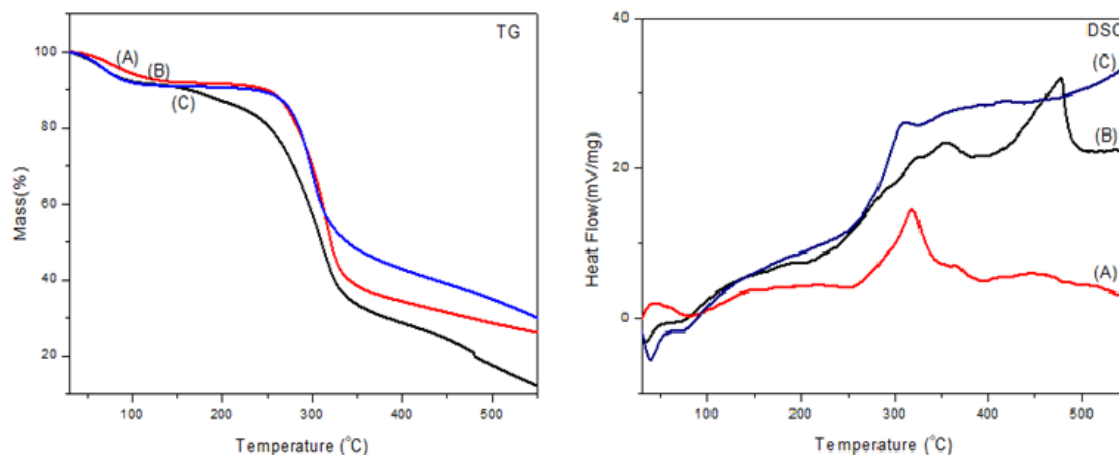
A GA inicia a desidratação logo após os 50 °C, no entanto, a partir dos 300 °C que atinge seu pico máximo o que se refere a degradação da rede polimérica, que reflete cerca de 65% da perda de massa. Alexandre et al. (2019) relataram valor de degradação a 313 °C, ao analisar micropartículas de goma arábica, gelatina e ácido tânico.

O pico da perda de peso da nanocápsula ocorreu por volta 250 °C e quase nenhum material residual permaneceu a 550 °C, sugerindo que o núcleo da nanocápsula sofreu volatilização causada pela decomposição. Xiao et al. (2014) ao produzirem micropartículas de óleo de lavanda por coacervação complexa, tendo como material de parede GA e gelatina observaram pico de GA muito próximo aos resultados obtidos neste estudo. Esses autores realizaram, também, análise termogravimétrica apenas do óleo de lavanda e foi constatado que abaixo dos 150 °C havia degradado completamente.

Com relação a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (Figura 14B) da QUI verifica-se um pico endotérmico em 50 °C referente a perda de água adsorvida do polímero, e um exotérmico em 300 °C correspondente à degradação da QUI. Valores de pico endotérmico parecidos foram encontrados por Pedro (2017) quando analisou QUI comerciais, desacetilada e modificada (62, 70, 75 °C), sobre o segundo evento térmico Martins et al., (2016) observou pico exotérmico ao redor de 270 – 290 °C que atribui a decomposição estrutural relacionada a degradação das unidades de glucosaminas na estrutura da quitosana. Na GA é observado uma ampla faixa de tendência exotérmica, com pico entre 250 °C. A formulação que contém o óleo de orégano mostra apenas o pico a 400 °C, indicando degradação oxidativa dos compostos voláteis.

Figura 14 - Curvas de termogravimétrica (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) onde A: goma arábica (GA); B: nanocápsulas de quitosana-goma arábica-óleo

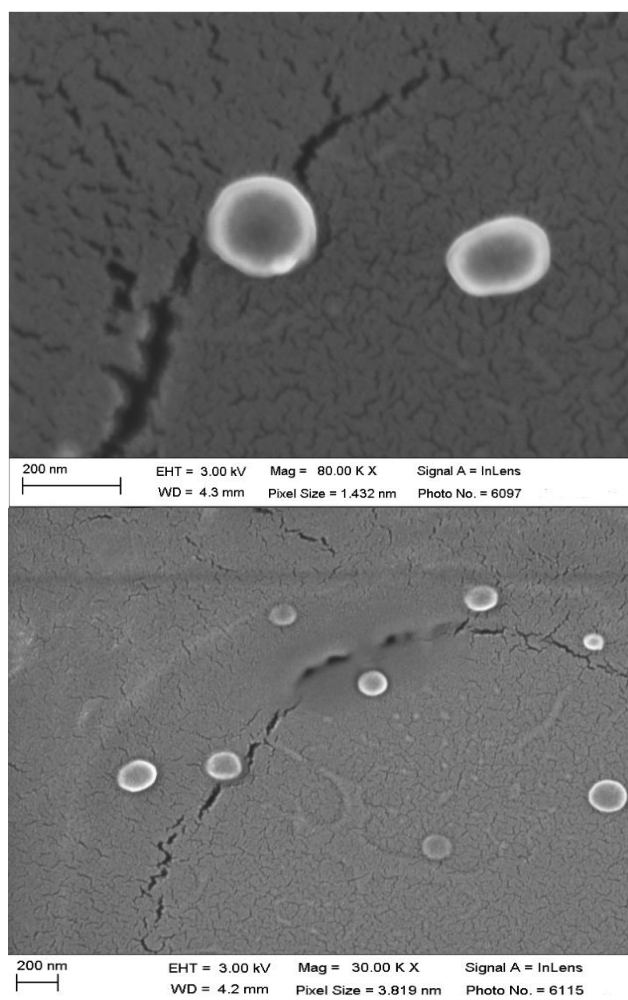
essencial de oregano (NQGA-OEO); C: quitosana (QUI).



6.7 MORFOLOGIA DAS NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA-ÓLEO ESSENCIAL DE OREGANO (NQGA-OEO)

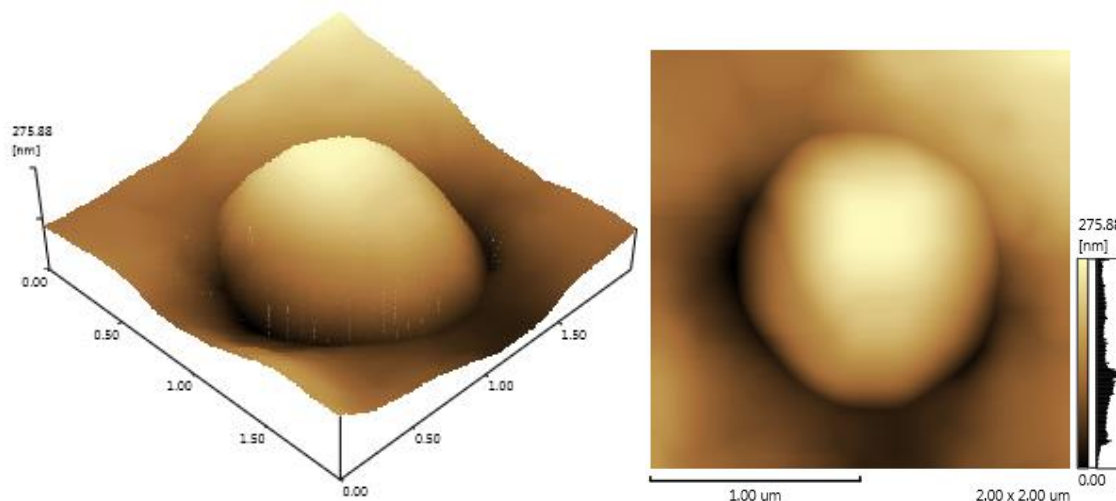
As imagens MEV das nanocápsulas são mostradas na figura 15. Elas fornecem informações úteis sobre o tamanho de partícula e a morfologia. Estudos morfológicos das nanocápsulas fornecem uma perspectiva valiosa relacionada às partículas e aos fatores químicos e físicos da estrutura. As nanocápsulas, como esperado, tem forma esférica e bem individualizada, sendo visualizadas imagens típicas de nanocápsulas compostas de um núcleo oleoso cercado por um involucro de polímero, cujo tamanho médio foi encontrado abaixo de 300 nm, o que foi satisfatório estando dentro da escala nanométrica. Natrajan et al. (2015) obtiveram nanocápsulas de alginato, quitosana e óleo de capim-limão de tamanho e morfologia semelhantes.

Figura 15 - Imagens Microscopia Eletronica de Varredura (MEV) ($\times 100$) mostrando a morfologia das nanocápsulas de óleo essencial de orégano produzidas a partir de polímeros de quitosana e goma arábica.



A morfologia da superfície das nanocápsulas foram estudadas usando uma microscopia de força atômica (AFM) (Figura 16). Imagens de AFM mostraram de forma tridimensional aparência esférica e superfície lisa. O mesmo padrão foi observado na superfície dos nanosistemas de quitosana e carragenina (HALPERIN et al., 2016). O tamanho da nanocápsulas por AFM foi $275 \pm 0,8$ nm, corroborando com as outras medidas obtidas.

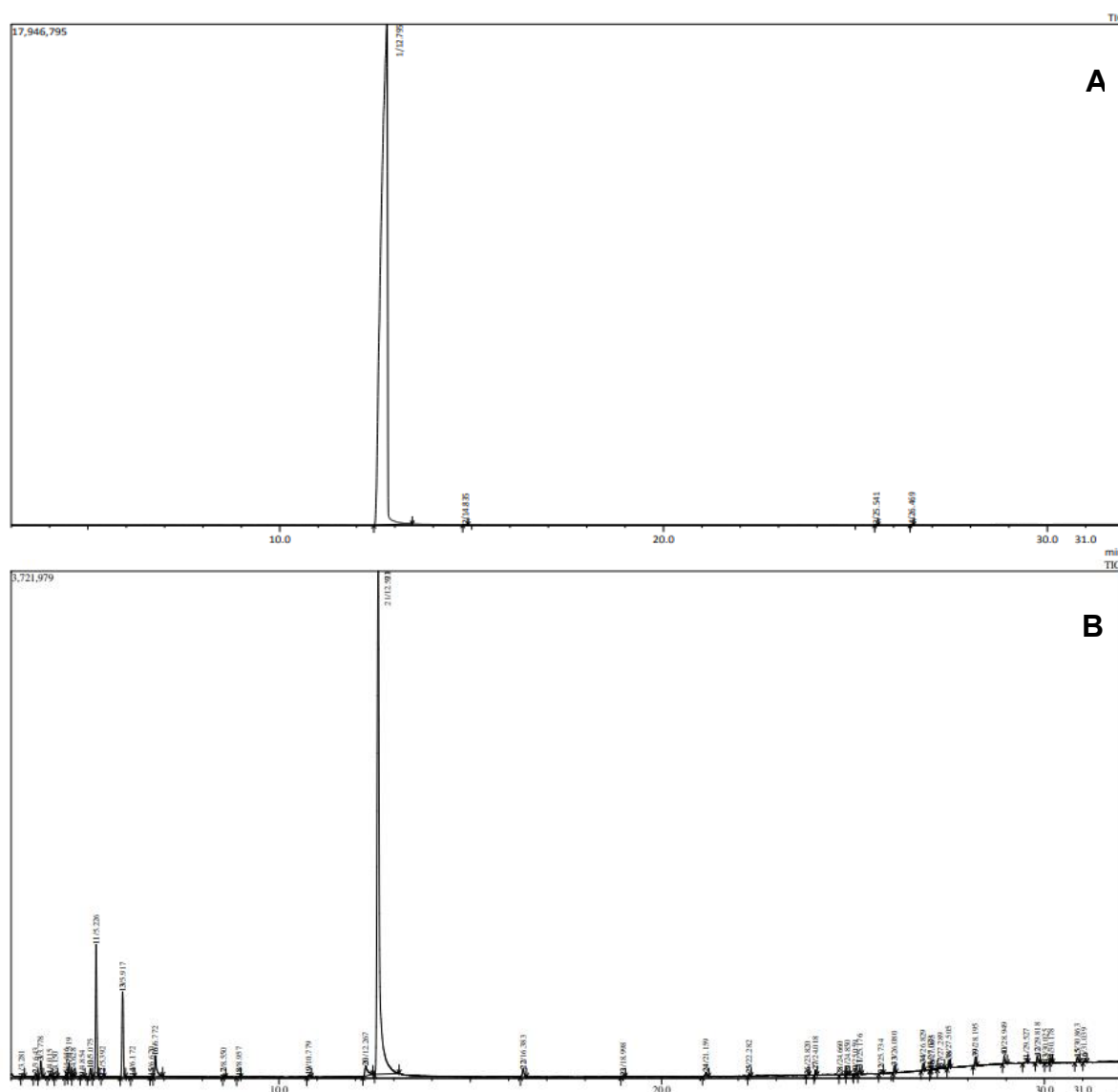
Figura 16 - Medições AFM de nanocápsulas contendo óleo de orégano produzidas a partir de polímeros de goma arábica e quitosana.



6.8 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE%)

No presente estudo obtivemos uma eficiência de encapsulação do óleo essencial de orégano nas nanocapsulas de quitosana- goma arábica de $95\% \pm 0,7$ (Figura 17). Estes resultados indicam que o processo de nanoencapsulação preservou completamente a composição do óleo, na figura 17 A temos o doseamento do carvacrol a partir da metodologia validada, e a figura 17 B apresenta os compostos do óleo de orégano após a encapsulação. A manutenção da composição do óleo durante o processo de nanoencapsulação é um parâmetro importante na avaliação uma vez que óleo essencial contém componentes biologicamente ativos que se acredita que promovem um efeito sinérgico quando acoplados aos polímeros encapsulantes. Muitos pesquisadores relataram que EE% depende do tipo e composição do material da parede, razão entre material do núcleo e material da parede, estabilidade e propriedades físico-químicas dos nanosistemas coloidais (HOSSEINI et al., 2017; GRANATA et al., 2018). Os resultados indicaram que uma quantidade muito pequena de óleo essencial foi perdida durante a preparação das nanocápsulas. Alguns autores mostraram que os resultados de EE% para microcápsulas de óleo essencial de tangerina revestido com maltodextrina e goma arábica foram superiores a 98% (BRINGAS-LANTIGUA et al., 2011). Altos valores de EE% são uma característica desejável na técnica de encapsulamento, pois aumentam a vida útil do óleo nas nanocápsulas (GRANATA et al., 2018).

Figura 17 - Cromatograma do doseamento de carvacrol na NQGA-OEO (A) e da nanocápsula (B).



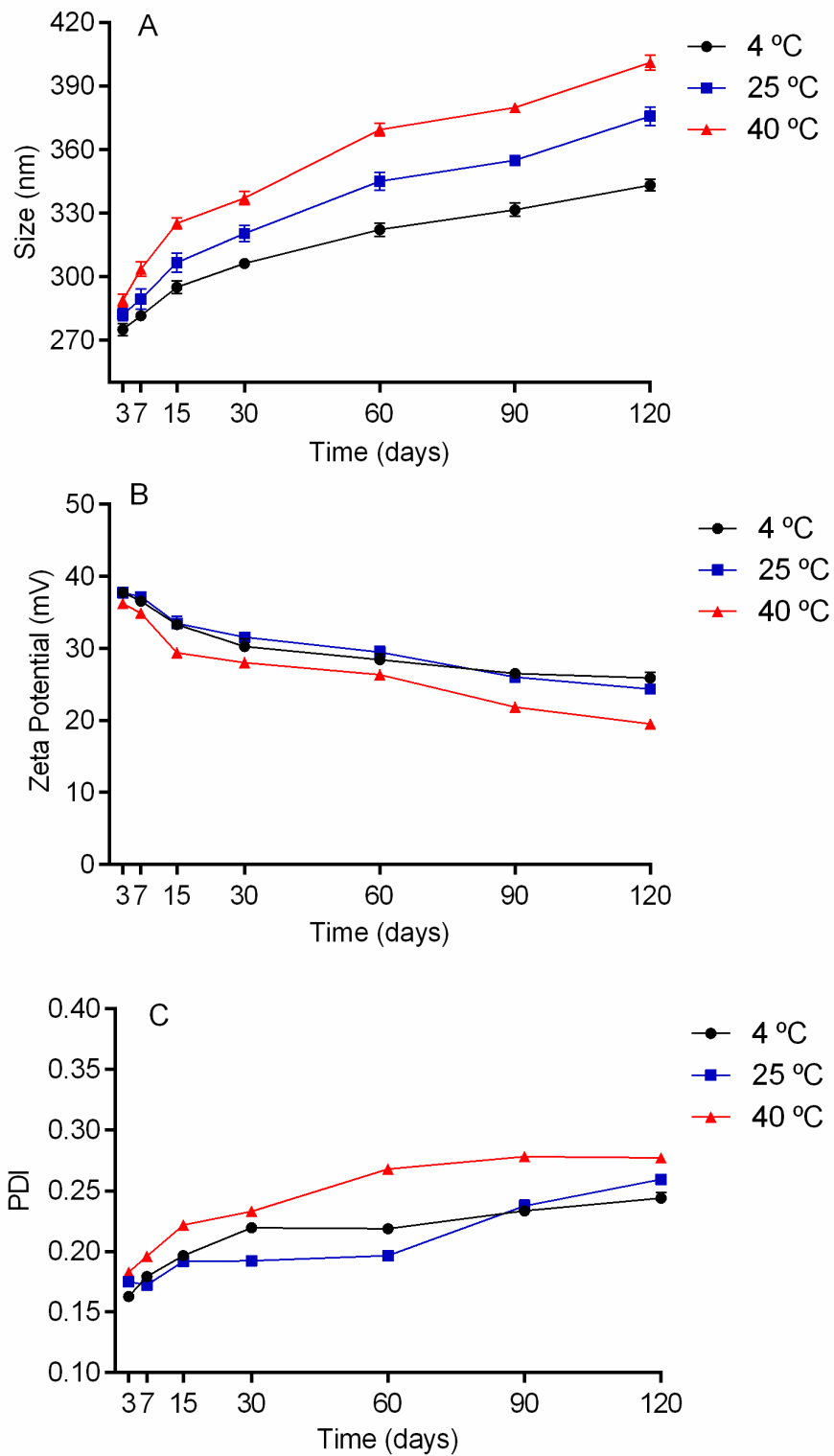
6.9 ESTABILIDADE DA TEMPERATURA

A estabilidade das suspensões de nanocápsulas foi avaliada por parâmetros de monitoramento como tamanho, polidispersão (PDI) e potencial zeta ao longo do tempo (Figura 18). Em particular, as amostras foram analisadas aos 3, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias (de armazenamento (4 °C, 25 °C, 40 °C)). Foram observadas que as formulações apresentaram excelentes propriedades de estabilidade, manifestadas por alterações muito pequenas e insignificantes no tamanho das partículas ($p > 0.05$). Semelhantemente valores de potencial zeta e PDI não houve variação estatisticamente significativa.

As curvas de distribuição de tamanho da partícula, das amostras preparadas e armazenadas a 4 °C, 25 °C e 40 °C por 120 dias foram aumentando ao longo do armazenamento. Esse comportamento é chamado de auto-agregação, devido principalmente aos polímeros o que não altera a qualidade dos nanosistemas (KARAM et al., 2020).

Em todos os experimentos, os valores de PDI foram inferiores a 0,3 confirmando uma boa homogeneidade das nanoformulações (GRILLO et al., 2012). Testando em condições experimentais as nanocápsulas em altas temperaturas, foi possível observar que não há variação do comportamento das nanocápsulas nos primeiros dias de incubação, sendo viáveis para estudos utilizando altas temperaturas. A capacidade das nanocápsulas reterem óleos essenciais, variando o tempo e as condições de armazenamento, é um índice de estabilidade (GRANATA et al., 2018).

Figura 18 - Valores de tamanho (A) e Potencial Zeta (B) das nanocápsulas armazenados a 4 °C, 25 °C e 40 °C por 4 meses. Os desvios padrão são iguais ou menores que o tamanho dos símbolos.



6.10 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM exibida pelas NQGA-OEO em relação a *L. monocytogenes* e *S. aureus*

foram de 10 e 20 $\mu\text{L} / \text{mL}$, respectivamente. As CIMs das NQGA-OEO contra os patógenos analisados foram maiores do que as verificadas em estudos anteriores com OEOV contra *L. Monocytogenes* e *S. aureus* (CIM 2,5 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$) (SOUZA et al., 2016) e nanoencapsulado em policaprolactona (CIM 1 e 0.5 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$) no entanto, esses valores eram da quantidade do óleo incorporado na nanocápsula, o que difere do nosso estudo sendo contabilizado as nanocápsulas (GRANATA et al., 2018).

Os efeitos inibitórios observados das NQGA-OEO podem estar correlacionados principalmente com as altas quantidades de carvacrol, p-cimene, timol em suas composições. Esses compostos são conhecidos pela atividade antibacteriana e seu modo de ação foi extensivamente estudado. Eles são capazes de interagir com a membrana celular externa, aumentando a fluidez e a permeabilidade e causar danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática (HYLDGAARD et al., 2012).

6.11 INFLUÊNCIA DAS NANOCÁPSULAS SOBRE A VIABILIDADE DAS CEPAS BACTERIANAS

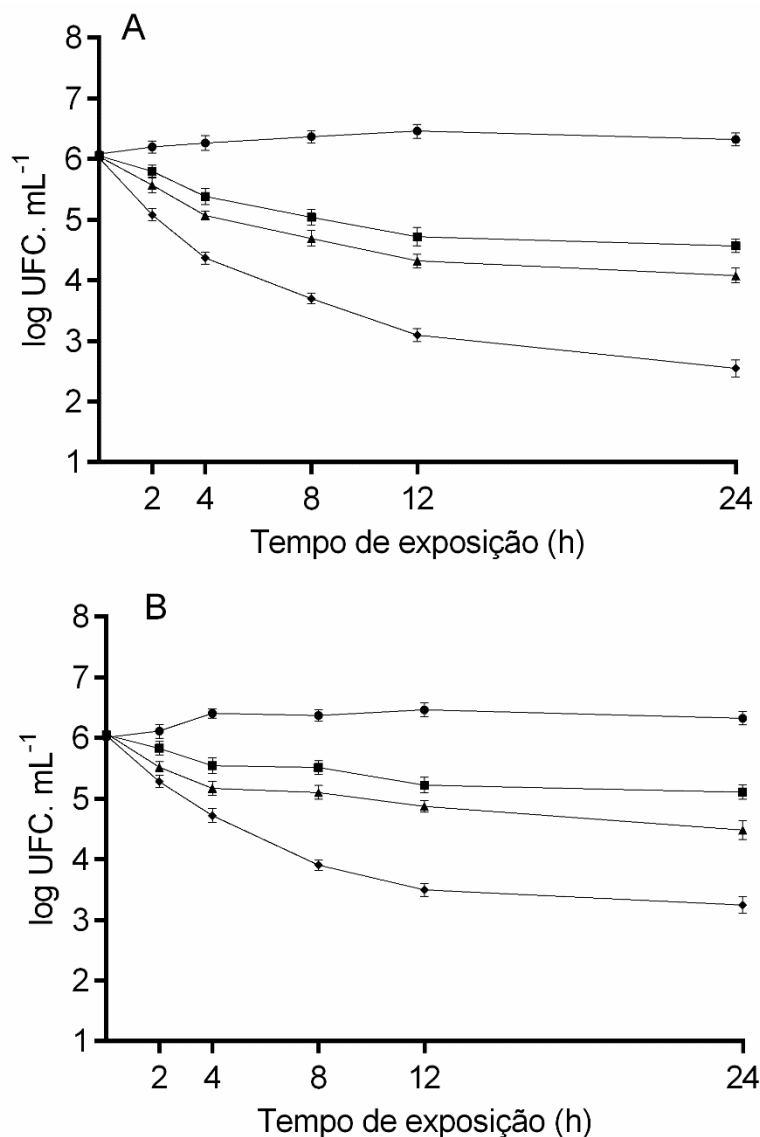
Como os OEs podem afetar negativamente as características sensoriais, os ensaios de inativação bacteriana contendo as sub-CIM das nanocápsulas foram realizados em caldo BHI durante 24h a 37 °C, os resultados são mostrados na figura 19.

O efeito da NQGA-OEO de 2,5 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ na viabilidade celular de *L. monocytogenes* em caldo BHI obteve redução de aproximadamente 1 log UFC. mL^{-1} (Figura 18 A). NQGA-OEO na concentração de 5 $\mu\text{L} / \text{mL}$ foi capaz de reduzir 1 log UFC. mL^{-1} apenas com 24 h de exposição (Figura 18 B) para *S.aureus*. Quando a NQGA-OEO foi adicionada ao caldo BHI nas concentrações de CIM/2 5 e 10 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, observou-se uma diminuição nas contagens de 1,2 log UFC. mL^{-1} e 1,7 log UFC. mL^{-1} para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente, após 24 horas de exposição ao tratamento. Quando a NQGA-OEO foi adicionada na concentração 10 $\mu\text{L}.\text{mL}$, as contagens de *L. monocytogenes* apresentaram uma queda acentuada ao longo do tempo, diminuindo a contagem da cultura inicial em 2 log UFC. mL^{-1} após 8 h de exposição, e uma redução de 3,5 log UFC. mL^{-1} do ciclo da população inicial (> 99,9%) após 24 h de exposição. Para *S. aureus* a concentração de 20 $\mu\text{L}.\text{mL}$ de NQGA-OEO foi capaz de reduzir 2 log UFC. mL^{-1} da cultura inicial após 8 h de exposição,

semelhante ao encontrado para *L. monocytogenes*, no entanto após as 24 h de exposição a redução foi de 2,6 log UFC.mL⁻¹ em relação ao ciclo da população inicial (> 99,9%). Sistemas contendo NQGA-OEO apresentaram consistentemente contagens de células viáveis mais baixas ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo em comparação com ensaio controle. As células bacterianas cultivadas em sistemas de controle apresentaram um ligeiro aumento nas contagens ao longo do intervalo de tempo avaliado (aumento de 0,3 log após 24 h em comparação com contagens iniciais - tempo zero).

A exposição de microrganismos a concentrações sub-letais de desinfetantes químicos pode favorecer ou suprimir mecanismos de expressão gênica, adaptando suas respostas ao estresse causado pelo antimicrobiano (BRASCHI et al., 2018). Sousa et al. (2016) demonstraram uma redução de 3,3 e 3,7 log UFC.mL⁻¹ quando *S.aureus* e *L. Monocýtogenes* foram expostas ao óleo de orégano na concentração 5 µL.mL⁻¹ em caldo a base de queijo. Em outro estudo, Barbosa et al. (2016) observaram uma redução de 3 log UFC.mL⁻¹ nas contagens viáveis de *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Enteritidis* após o contato com óleo essencial de orégano (0,6 µL.mL⁻¹) em vegetais folhosos. Cacciatore et al (2020) demonstraram redução de 2 log UFC.mL⁻¹ em 6 h para *L. mocytoenes* e *S. aureus* utilizando nanocápsulas de carvacrol, e após as 24 h houve redução de 4 log UFC.cm² e 3,5 log UFC.cm², respectivamente.

Figura 19 - Contagem de células viáveis de *L. monocytogenes* (A) e *S. aureus* (B) em caldo BHI a 37 ° C em função da concentração de nanocapsulas quitsoana- goma arábica-óleo essencial de orégano (NQGA-OEO): (A) (●): 0 µL.mL⁻¹; (■) 2,5 µL.mL⁻¹; (▲): 5 µL.mL⁻¹; (◆): 10 µL.mL⁻¹. (B) (●): 0 µL.mL⁻¹; (■) 5 µL.mL⁻¹; (▲): 10 µL.mL⁻¹; (◆): 20 µL.mL⁻¹. Limite de detecção do teste: 2,0 log UFC.mL⁻¹



6.12 EFEITO DAS NANOCÁPSULAS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA BACTERIANA EM ATUM AZUL

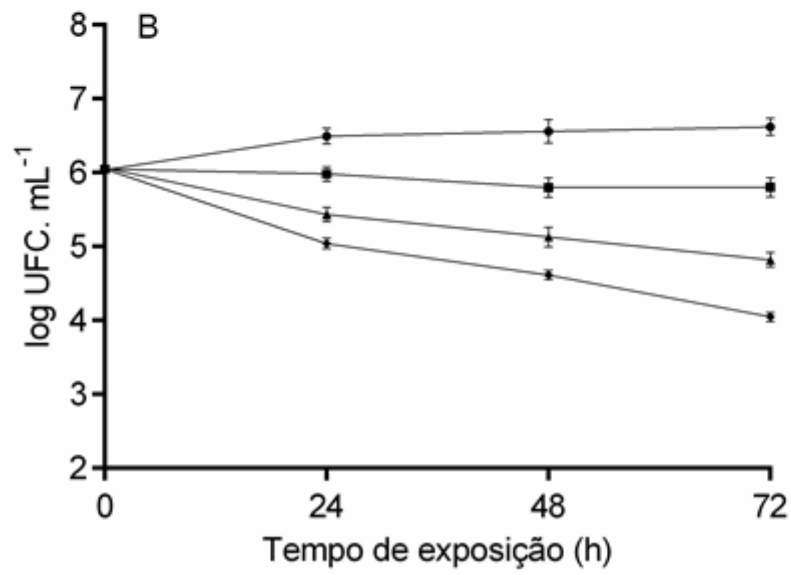
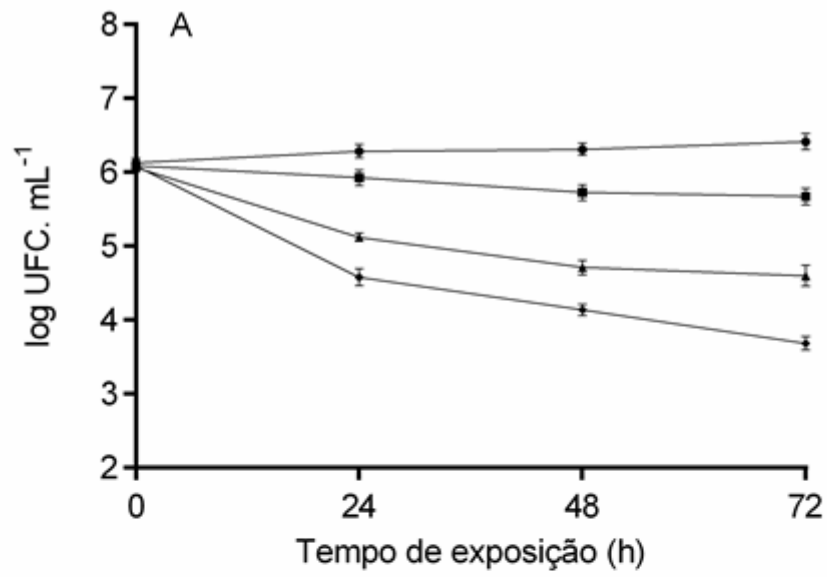
Em contraste com os resultados da inibição bacteriana observado em caldo BHI, a adição de NQGA-OEO a $2,5 \mu\text{L.g}^{-1}$ no modelo de peixe não houve redução significativa na contagem de *L. Monocytogenes* (redução de $0,2 \log \text{UFC.g}^{-1}$) ao final das 72 horas de exposição (Figura 20A). Resultados semelhantes foram obtidos para *S. aureus* ao longo do tempo em concentração de $5 \mu\text{L.g}^{-1}$ de NQGA-OEO (Fig. 20B). A incorporação de NQGA-OEO a $5 \mu\text{L.g}$ no modelo de peixe diminuiu a contagem de *L. monocytogenes* após 72 h de exposição em $1,5 \log \text{UFC.g}^{-1}$ em relação às

contagens iniciais. Na concentração da CIM ($10 \mu\text{L.g}^{-1}$) foi verificada redução de 2,4 log UFC.g⁻¹, sendo significativamente menor ($p \leq 0,05$) do que a contagem inicial.

Com relação a *S. aureus* a cultura inicial do controle houve um ligeiro aumento nas contagens a partir das 24 horas de exposição. Nas concentrações 10 e $20 \mu\text{L.g}^{-1}$ de NQGA-OEO as reduções foram de 1,2 e 2 log UFC.g⁻¹. Comparado com os resultados encontrados no caldo BHI, as cepas de bactérias cultivadas em sistemas de controle de peixe apresentaram um aumento linear e discreto nas contagens ao longo do período avaliado.

Abdollahzadeh et al. (2014) demonstraram que óleo de tomilho (1,2%) e nisina 1000 UI.g^{-1} reduziram a contagem viável de *L. monocytogenes* em 2 log UFC.g⁻¹ após o segundo dia de armazenamento em peixe picado. Saloko et al. (2014) avaliaram nanocápsulas de quitosana (1,5% p/v), maltodextrina (8,5% p/v) e fumaça líquida (5,0%) em atum por 48h em temperatura ambiente e relataram que não foi verificada eficácia para controle de *S. aureus*.

Figura 20 - Contagem de células viáveis de *L. monocytogenes* (A) e *S. aureus* (B) em modelo de peixe a 7 °C em função da concentração de nanocapsula quitosana- goma arábica-óleo essencial de orégano (NQGA-OEO): (A) (●): $0 \mu\text{L.mL}^{-1}$; (■) $2,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$; (▲): $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$; (◆): $10 \mu\text{L.mL}^{-1}$. (B) (●): $0 \mu\text{L.mL}^{-1}$; (■) $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$; (▲): $10 \mu\text{L.mL}^{-1}$; (◆): $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$. Limite de detecção do teste: $2,0 \text{ log UFC.mL}^{-1}$



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os compostos presentes no carvacrol, óleo essencial de orégano e nanocápsulas foram identificados por análise de CG/EM. O método CG/EM foi desenvolvido e validado seguindo as diretrizes do RDC 166/2017 e FDA é rápido, simples e preciso e pode ser aplicado para quantificar carvacrol, óleo essencial de orégano e nanocápsulas contendo óleo de orégano.

Os resultados obtidos mostram que a incorporação de óleo de orégano em nanocápsulas pode ser preparada por coacervação complexa com os polímeros quitosana e goma arábica. A melhor relação entre os polímeros de 1:5 (QUI/GA) para obtenção de nanopartículas de menor tamanho e maior carga positiva de superfície. Como assumido, a proporção de material de parede usado na preparação da formulação tem impacto significativo nas propriedades físico-químicas das nanocápsulas obtidas, na estabilidade, na caracterização estrutural, no tamanho e na liberação, sendo a quitosana foi associada à provisão de cargas positivas à superfície das nanocápsulas.

A NQGA-OEO exibe estabilidade térmica de seus materiais de revestimento em altas temperaturas evitando decomposição e oxidação do óleo de orégano. A NQGA-OEO apresentou atividade inibitória contra as bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*, frequentemente associadas a pescados. NQGA-OEO são um potencial conservante seguro para peixes. Sua aplicação diminuiu consideravelmente o crescimento microbiano quando comparado com ausência de tratamentos. Portanto, as nanocápsulas de óleo de orégano podem ser aplicadas como um conservante natural de peixe.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, M. REZAEI, H. HOSSEINI. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, p. 177-183, 2014.
- ABREU, F. O. M. S., OLIVEIRA, E. F., PAULA, H. C. B., DE PAULA, R. C. M. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydr. Polym.** v. 89, ed. 4, p. 1277–1282, 2012.
- ADEGOKE, G.O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food: a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v.35, n.4, p.283-298, 1998.
- ALBANO, S.M.; MIGUEL, M.G. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. **Industrial Crops and Products**, v.33, p.338-343, 2011.
- ALEXANDRE, J.; BARROSO, T; ARAUJO, A. W.; ROMÃO, A. L.; CASTELO, R; FURTADO, R. Avaliação térmica de micropartículas de goma arábica e gelatina reticuladas com ácido tânico. *Con. Brasileiro de Química*, v. 59, p. 1-3, 2019.
- ALI, A, AHMED, S. A Review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 109, p. 273-286, 2018.
- ALISHAHI, A., et al. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 142-146, 2011.
- ALVES, V. F. **Ocorrência e controle de *Listeria monocytogenes* em pescado minimamente processado**. 2005. 104f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- ALVIM, I. D., GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 30, ed. 4, p. 1069-1076, 2010.
- AMARAL, M. T. et al. Traditional technology application in fish processing in the region of lower amazon, state of Pará. **Revista GEINTEC**– ISSN: 2237-0722. V. 7, n.1, p.3708-3721, 2017.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ANDRADE, S. C. A. et al. Control of Rhizopus soft rot and quality responses in plums (*Prunus domestica* L.) coated with gum arabic, oregano and Rosemary essential oils. **J. Food Process. Preserv.** v. 41, n.6, p. 13251, 2017.

ANTON, N., BENOIT, J. P., SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release** v. 128, p. 185–199, 2008.

ARAB-TEHRANY, E. et al. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. **Trends in Food Science & Technology**, v. 25, p. 24-33, 2012.

ARANAZ, I. et al., Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203-230, 2009.

ARUOMA, O.I. Free radicals and food. **Chemistry in Britain, London**, v.29, n.3, p.210-214, 1993.

ARVANITOYANNIS I, KOTSANOPOULOS K. Smoking of fish and seafood: History, methods and effects on physical, nutritional and microbiological properties. **Food Bioprocess Technology**. v. 5, n. 3, p. 831-853 2012.

ASHIE, I.N.A.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.1/2, p.87-121, 1996.

ASSIS, L.M.; ZAVAREZE, E.R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L.A. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, p. 99-109, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA (PEIXE BR). **ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA 2019**. São Paulo, 2019.

ATANASSOVA, V., REICH, F., KLEIN, G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. **Journal Food Protect**, v. 71, p. 860-864, 2008.

ATAY, H.Y. ÇELİK, E. Investigations of antibacterial activity of chitosan in the polymeric composite coatings. **Prog. Org. Coat.**, v. 102, p. 194-200, 2017.

AVADI, M.R.; SADEGHI, A.M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 58–63, 2010.

AZERÊDO, G.A. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541-1548, 2011.

BACHTSI, A. R., BOUTRIS, C. J., KIPARISSIDES, C. Synthesis and release studies of oil-containing poly (vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 60, p. 9, 1996.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, I. M., MEDEIROS, J., OLIVEIRA, K., GOMES-NETO, N., TAVARES, J., MAGNANI, M., SOUZA, E. L. **Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables**. *Food Control*, v. 59, p. 468-477, 2016.

BARROS, J.C. et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 1139-1143, 2009.

BASER, K. H. C. Biological and pharmaceutical activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oil. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 3106-3120, 2008.

BASTI, A.A.; MISAGUI, A.; SALAHI, T.Z. KAMKAR, A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, v.18, p.183-188, 2006.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 2166 - 2174, 2008.

BASTOS, L.P.H., VICENTE, J., DOS SANTOS, C.H.C., CARVALHO, G.M., GARCIA-ROJAS, E.E. Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 102, p. 1-8, 2020.

BENJEMAA, M., NEVES, M.A., FALLEH, H., ISODA, H., KSOURI, R., NAKAJIMA, M. Nanoencapsulation of *Thymus capitatus* essential oil: formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring. **Ind. Crops Prod.** v. 113, p. 414–421, 2018.

BHUNIA, A.K. **Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis**. Springer, New York, USA, 2018.

BINSI P. K., NAYAK N., SARKAR P. C., JEYAKUMARI A., MUHAMED ASHRAF P., et al. Structural and oxidative stabilization of spray dried fish oil microencapsulates with gum Arabic and sage polyphenols: characterization and release kinetics. **Food Chem.** v. 219, p. 158–68, 2017.

BOBU, E.; NICU, R.; LUPEI, M.; CIOLACU, F.; DESBRIÈRES, J. Syntesis and characterization of N-Alquyl Chitosan for papermaking applications. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, n. 910, p. 619–625, 2011.

BORTOLUSSI, R. M. D. **Listeriosis: a primer**. CMAJ. v. 179, n.8, p. 795–797, 2008.

BRABO, M. F., VILELA, M. R. P., REIS, T. S., DIAS, C. L., BARBOSA, J. & VERAS, G. C. Viabilidade econômica da produção familiar de matrinhã em canais de igarapé no Estado do Pará. **Informações Econômicas**, v. 45, n. 4, p. 1-7 2015.

BRASCHI, G., SERRAZANETTI, D. I., SIROLI, L., PATRIGNANI, F., DE ANGELIS, M., LANCIOTTI, R. Gene expression responses of *Listeria monocytogenes* Scott A exposed to sub-lethal concentrations of natural antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**, v. 286, p. 170-178, 2018.

BRAGA, B; HESPANHOL, B.; CONEJO, J. G. L.; BARROS, M. T. L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à Engenharia Ambiental: O desafio do desenvolvimento sustentável**. São Paulo: Prentice Hall, 2005.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, 2003.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011. Brasília: República Federativa do Brasil, 2013a.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Censo aquícola nacional, ano 2008. Brasília: República Federativa do Brasil, 2013b.

BRINGAS-LANTIGUA, M. et al. Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated mandarin oil. **Drying Technology**, v. 29, n. 5, p. 520-526, 2011.

BUCUR, F. I., GRIGORE-GURGU, L., CRAUWELS, P., RIEDEL, C. U., NICOLAU, A. I. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. **Front. Microbiol.** v. 9, p. 2700, 2018.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUTSTRAEN, C. AND SALAUN, F. **Preparation of microcapsules by coacervation of gum arabic and chitosan**. Carbohydrate Polymers, v. 99, p. 608-616, 2014.

CABAL, A., ALLERBERGER, F., HUHULESCU, S., KORNSCHÖBER, C., SPRINGER, B., SCHLAGENHAUFEN, C., et al. Listeriosis outbreak likely due to contaminated liver pâté consumed in a taverna. **Euro Surveill.** v.24, p.190-274, 2019.

CABEDO, N.; BERENGUER, I.; FIGADÈRE, B.; CORTES, D. An overview on benzylisoquinoline derivatives with dopaminergic and serotonergic activities. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 16, p. 2441-2467, 2009.

CACCIATORE, F. A., DALMÁS, M., MADERS, C., ISAIA, H. A., BRANDELLI, A., MALHEIROS, P. S. Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel. **Food Research International**, v. 133, p.109-143, 2020.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CAMPELO-FÉLIX, P. H., SOUZA, H. J. B., FIGUEIREDO, J. A., FERNANDES, R. V. B., BOTREL, D. A., OLIVEIRA, C. R., YOSHIDA, M. I., BORGES, S. V. Prebiotic carbohydrates: effect on reconstitution, storage, release, and antioxidant properties of lime essential oil microparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 65, n. 2, p. 445-453, 2017

CARNEIRO, H.C.F., TONON, R.V., GROSSO, C.R.F, HUBINGER, M.D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using diferente combinations of wall materials. **J. Food Eng.** v. 115, p. 443–451, 2013.

CARVALHO, I. T., ESTEVINHO, B. N., SANTOS, L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products-a review. **Int. J. Cosmetic Science.**, v. 38, p. 109-119, 2016.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DÍAZ, R.; VICENTE, A. A. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.23, n.7, p.1895-1902, 2009.

CASTELLAR, A.; GAGLIARDI, R. F.; MANSUR, E.; BIZZO, H. R.; SOUZA, A. M.; LEITAO, S. G. Volatile constituents from in vitro and ex vitro plants of *Petiveria alliacea* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 19, 2014.

CASTILHO, P.C. et al. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v.23, p.552-558, 2012.

CHIZZOLA, R., MICHITSCH, H., FRANZ, C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 56, p. 6897-6904, 2008.

CIRO, Y., ROJAS, J., DI VIRGILIO, A.L, ALHAJJ, M. J., CARABALI, G. A., SALAMANCA. C. H. Production, physicochemical characterization, and anticancer activity of methotrexate-loaded phytic acid-chitosan nanoparticles on HT-29 human colon adenocarcinoma cells. **Carbohydrate polymers**, 2020.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. In: Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. **Humana Press**, p. 63-70, 2011.

COSTA JÚNIOR, R. F.; FERREIRA, R. L. C.; RODAL, M. J. N.; FELICIANO, A. L. P.; MARANGON, L. C.; SILVA, W. C. Florística arbórea de um fragmento de Floresta Atlântica em Catende, Pernambuco Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.4, p.297-302, 2008.

CRUCHO, C. IC; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and**

Engineering: C, v. 80, p. 771-784, 2017.

CUNHANETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Tecnologia de Alimentos**., v.22, n.3, 2002.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v.22, p. 39 - 44, 2003.

DALLAN, P. R. M., 2005, Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. **Tese de D.Sc.**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DASHA, M. et al. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 981-1014, 2011.

DAWCZYNSKI, J. et al. n-3-LC-PUFA-enriched dairy products are able to reduce cardiovascular risk factors: A double-blind, cross-over study. **Clinical Nutrition**. v. 29, p. 592-599, 2010.

DAWCZYNSKI, J. S. JENTSCH, D. SCHWEITZER, M. HAMMER, G.E. LANG, J. Strobel Long term effects of lutein, zeaxanthin and omega-3-LCPUFAs supplementation on optical density of macular pigment in AMD patients: the LUTEGA study. **Graefes Archive Clin Exp Ophthalmology**, v. 251, p. 2711-2723, 2013.

DENG, C. M. et al. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.583-589, 2007.

DI PASQUA, R.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v.10, p. 1040 - 10409, 2010

DIMITRIJEVIC, et al. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v. 104, p. 774-782, 2007.

DOGRUYOL, H., MOL, S., COSANSU, S. Increased thermal sensitivity of *Listeria monocytogenes* in sous-vide salmon by oregano essential oil and citric acid. **Food Microbiol**. v. 90, 2020.

DREVETS, D. A., et al. The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. **Journal Immunology**. v. 172, n. 7, p. 4418-24, 2004.

DUARTE-JUNIOR, A.P.; ALVES, T. V. G; TAVARES, E. J. M.; MOURA, M. R.; OLIVEIRA, E. C.; et al. Caracterização térmica de nanopartículas de quitosana. **Con. Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria**. v. 7, p. 1-5, 2010.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 452-458, 2010.

ENGEL, J.B. Ação desinfetante de soluções de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas sobre *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* aderidos em aço inoxidável AISI 304. **Dissertação**, p. 27-29, 2015.

ESPINOSA-ANDREWS, H., SANDOVAL-CASTILLA, O., VÁZQUEZ-TORRES, H., VERNON-CARTER, E. J., LOBATO-CALLEROS, C. Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. **Carbohydr. Polym.**, v.79, p. 541-546, 2010.

EUROPEAN COMMISSION. RASFF - The Rapid Alert System for Food and Feed – **2016 annual report**, 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) and European Centre for Disease, Prevention Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **Eur. Food Safety Authority J.**, v.16, n. 12, p. 05500, 2018.

EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. **EFSA Journal**. v. 14, n.12, p. 4634, 2016.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), RICCI, A.; ALLENDE, A.; BOLTON, D. et al. Scientific Opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. **EFSA Journal**, v. 16, n. 1, p. 173, 2018.

EZHILARASI P.N., KARTHIK P., CHHANWAL N., ANANDHARAMAKRISHNAN C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food Bioprocess Tech.** v. 6, n. 3, p. 628–647, 2013.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; BELLON, G.; PEIXOTO, J.R. Diversidade genética de variedades comerciais de maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD. **In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO**, 4., Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p.105-109, 2005.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Quality and quality changes in fresh fish: post mortem changes in fish**. Roma: FAO, 2003b. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/v7180e/v7180e06.htm>> Acesso em: 01/ago/2017.

FAO. **Revisión del Estado Mundial de la Acuicultura**. Roma: FAO, 2003a, 103 p. Disponível em <<http://www.fao.org>> Acesso em: 01.jun.2017.

FAO. **Comércio global de peixes atinge níveis recordes**. Disponível em <<https://www.fao.org.br/cgpanr.asp>> Acesso em: 02 ago. 2017.

FAO. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. [OnLine]. 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/3/T1768P/T1768P01.htm>> Acesso em: 03 mar. 2018.

FAO. **Farming the waters for people and food. Proceedings of the Global Conference on Aquaculture**. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e.pdf>>, 2010.

FAO - **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. (2014^a). Roma: FAO.

FAO - **Fishery and aquaculture statistics** (2014b). Roma: FAO yearbook

FRATINI, F., MANCINI, S., TURCHI, B., FRISCIA, E., PISTELLI, L., GIUSTI, G., CERRI, D. **A novel interpretation of the fractional inhibitory concentration index: the case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains**. Microbiological Research, v. 195, p. 11-17, 2017.

FDA – Food and Drug Administration. **Secondary direct food additives permitted in food for human consumption**. 2002. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

FERREIRA, P. F. G. Caracterização do sistema produtivo da aquicultura da microrregião de Cametá-Pará [**Dissertação de Mestrado**]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará/Universidade Federal Rural da Amazônia/Embrapa Amazônia Oriental, 2013.

FIGIEL, A. et al. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 240-247, 2010.

FINKEL, T., HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FOGAÇA, F.H.S.; SANT'ANA, L.S. Tocopherol in the lipid stability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) hamburgers. **Food Chemistry**, v.105, p.1214 - 1218, 2007.

FRANCO L. T.; BOCHI L. D. C. S. Produção e caracterização de diferentes formulações tópicas semissólidas contendo meloxicam na forma nanoestruturada. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 9, n. 16, p. 209 – 231, 2013.

FUCHS, S. C.; CASTRO, M. S.; FUCHS, F. C. Adesão ao tratamento anti hipertensivo. **Hipertensão**, v. 7, n. 3, p. 90-93, 2006.

GABAS, V. G. S.; CAVALCANTI, O. A. Influência da adição da goma arábica em filmes isolados de polímero acrílico. Estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v.39, n.4, p.441-448, 2003.

GALLO, M., FERRARA, L., CALOGERO, A., MONTESANO, D., NAVIGLIO, D. Relationships between food and diseases: what to know to ensure food safety. **Food Res Int**, v.137, n.109414, 2020.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. Listeria: a foodborn pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 675-682, 2007.

GARENNE, D., L. BEVEN, L. NAVAILLES, F. NALLET, E. DUFOURC, J.-P. DOULIEZ. Sequestration of proteins by fatty acid coacervates for their encapsulation within vesicles. **Angew. Chem., Int.** v, 55, n. 43, p. 13475–13479, 2016.

GATTIJUNIOR, P. Qualidade higiênica e sanitária de tilápias provenientes de cultivo, comercializadas no varejo. **Dissertação de Mestrado**, Centro de Aquicultura, UNESP, 47 p., Jaboticabal, 2011.

GHAFFARI, Z., RAHIMMALEK, M., SABZALIAN, M.R. Variations in essential oil composition and antioxidant activity in *Perovskia abrotanoides* Kar. collected from different regions in Iran. **Chem. Biodivers**, v.15, n. 6, 2018.

GHARSALLAOUI, A., RAUDAUT, G., CHABIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GHASEMI, S., JAFARI, S.M., ASSADPOUR, E., KHOMEIRI, M. Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. **Carbohydrate Polymers**. v, 177, p. 369–377, 2017.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** Easton, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v.40, n.9, p.1107-1121, 2007.

GÓMEZ-ESTACA, J., GAVARA, R., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 302-307, 2015.

GOMEZ-MARTINEZ, ALTSKAR, AND STADIN. Correlation Between Viscoelasticity, Microstructure, and Molecular Properties of Zein and Pennisetin Melts. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, p. 2245–2251, 2012.

GONÇALVES A. A. Org.Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2011.

GONÇALVES, N.D., GROSSO, C.R.F., RABELO, R.S., HUBINGER, M.D., PRATA, A.S. Comparison of microparticles produced with combinations of gelatin, chitosan and gum Arabic. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, pp. 427-432, 2018.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R.M.; RIAL-OTERO, R.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. **Food Chemistry**, v.107, n.3, p.1342-1347, 2002.

GOVARIS, A., SOLOMAKOS, N., PEXARA, A., CHATZOPOULOU, P.S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, pp. 175-180, 2010.

GRANATA, G., CONSOLI, G. M. L., LO NIGRO, R., GERACI, L. Hydroxycinnamic acids loaded in lipid-core nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 245, p. 551-556, 2018.

GREAY, S. J., HAMMER, K.A. Recent developments in the bioactivity of Greay, SJ & Hammer, KA. Recent developments in the bioactivity of mono-and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Review**, 2011.

GRILLO, R., DOS SANTOS, N. Z. P., MARUYAMA, C. R., ROSA, A. H., DE LIMA, R., FRACETO, L. F. Poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **J Hazard Mater**, v. 231, p. 1-9, 2012.

GUARDA, A. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144-150, 2011.

GUILHEME, M. R. **Desenvolvimento de hidrogéis superabsorventes para uso eficiente de água**. 2006. 125f. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

HALPERIN, Y. SHADKCHAN, E. PISAREVSKY, A.M. SZPILMAN, H. SANDOVSKY, N. OSHEROV, I. BENHAR. Novel water-soluble amphotericin B-PEG conjugates with low toxicity and potent *in vivo* efficacy, **J. Med. Chem.**, v. 59, p. 1197-1206, 2016.

HASANI, S., OJAGH, S. M., GHORBANI, M. Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: study on its physical and structural characteristics, v. 115, p. 143-151, 2018.

HYLDGAARD, M. MYGIND, T., MEYER R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, pp. 1-23, 2012.

HONÓRIO, V. G, BEZERRA, J., G.T. SOUZA, R.J. CARVALHO, N.J. GOMES NETO, R.C.B.Q. FIGUEIREDO, J.V. MELO, E.L. SOUZA, M. MAGNANI. Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole. **Frontiers in Microbiology**, 6:1223 (2015).

HOSSEINI, S.F. ZANDI, M. REZAEI, M., FARAHMANDGHAVI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study, **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 50–56 2013.

HOSSEINI, S.F., RAMEZANZADE, L., NIKKHAH, M. Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 105, p. 1455-1463, 2017.

HSIEH, P. C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v.22, p. 35 - 43, 2001.

HUANG, L. Growth of *Staphylococcus aureus* in cooked potato and potato salad—A one-step kinetic analysis. **J. of Food Sci.**, v. 80, p. 2837-2844, 2015.

HUANG, T., TARP, J., THORSEN, A. K., FROBERG, K., ANDERSEN, L. B., & BUGGE, A. Associations of Adiposity And Aerobic Fitness With Executive Function and Math Performance in Danish Adolescents. **Journal of Pediatrics**, v. 167, ed.4, p. 810-5, 2015.

HU, J., ZHANG, Y., XIAO, Z., WANG, X. Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules. **Industrial Crops Products**, v. 122, p. 85–92, 2018.

HUSSEIN, AA., ABDEL-MOTTALEB, M. A., EL-ASSAL, M., SAMMOUR, O. Novel biocompatible essential oil-based lipid nanocapsules with antifungal properties. **J. of Drug Del. Science and Tec.** v. 56 (a), p. 605, 2020.

IRANZO, E., NAVARRO, R., GASCÓ, J., CARNTÓN, F., CUCART, A. *Listeria monocytogenes* nas indústrias das carnes (1ª ed.). Betelgeux, S.L, 2015.

JAMI, M., GHANBARI, M., ZUNABOVIC, M., K.J. DOMIG, K. J., KNEIFEL, W. *Listeria monocytogenes* in aquatic food products-a review. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.**, v. 13, p. 798-813, 2014.

Jl, J., et al., Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 4, p. 803-808, 2011.

JOSHI, S. et al. Terpenoid compositions, and antioxidant and antimicrobial properties of the rhizome essential oils of different *Hedychium* species. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 2, p. 299-309, 2008.

KADARIYA, J., SMITH, T.C., THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. **BioMed Res. Int.** p.827-965, 2014.

KANE, R. S., STROOCK, A. D. Nanobiotechnology: Protein-Nanomaterial Interactions. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 316-319, 2007.

KARAM, T. K., ORTEGA, S., NAKAMURA, T. U., AUZÉLY-VELTY, R., NAKAMURA, C. V. Development of chitosan nanocapsules containing essential oil of *Matricaria chamomilla* L. for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Int. J. of Biol. Macromolecules**, v. 162, p. 199-208, 2020.

KHAN, M., KHAN, S.T., KHAN, N.A., MAHMOOD, A., AL-KEDHAIRY, A.A., ALKHATHLAN, H.Z. The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, pp. 1189-1200, 2018.

KITTUR, F. S. et al., Characterization of chitin and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 185-193, 2003.

KLINKESORN, U., SOPHANODORA, P. CHINACHOTI, P. et al. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition, **Food. Res. Int.**, v. 39, p. 449–457, 2006.

KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A.C.; SINGHAL, R.S The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. **Carbohydrate Polymers** 62:309-315, 2005.

KUBITZA, F., CAMPOS, J. L., ONO, E. A. & ISTCHUK, P. I. Panorama da piscicultura no Brasil: Espécies cultivadas, sistemas de produção, perfil tecnológico e de gestão e os principais canais de mercado da piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 22, n.133, p. 16-31, 2012.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004.

KUMAR, M. N. V. R. et al. Chitosan chemistry and Pharmaceutical perspectives. **Chemical review**, v. 104, n. 12, p. 6017-6084, 2004.

LARANJEIRA, M. C. M. FÁVERE, V. T. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LAOTHAWEEERUNGSAWAT, N; SIRITHUNYALUG, J; CHAIYANA, W. CHEMICAL Compositions and Anti-Skin-Ageing Activities of *Origanum vulgare* L. Essential Oil from Tropical and Mediterranean Region. **Molecules** ; v. 25, n.5, 2020.

LIANOU A., SOFOS J. N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal Food Protection**. v. 70, p. 2172–2198, 2007.

LINGBECK, Jody M.; CORDERO, Paola; O'BRYAN, Corliss A.; JOHNSON, Michael G.; RICKE, Steven C.; CRANDALL, Philip G.. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Science**, v. 97 p. 197–206, 2014.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. *In vitro* toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p. 9-27, 2015.

LOBO, P.T.D. **Avaliação microbiológica do pescado fresco comercializado no Centro de Abastecimento do município de Feira de Santana, Bahia, 2008-2009** [monografia] Feira de Santana. Especialização em Biologia Celular, Universidade Estadual de Feira de Santana; 2009.

LY, V., PARREIRA, V. R., FARBER, J. M. Current understanding and perspectives on *Listeria monocytogenes* in low-moisture foods. **Curr. Opin. Food Sci.** v. 26, p.18–24, 2019.

MADENE, A. et al. Flavor encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, n.1, p.1-21. 2006.

MAJETI. R, PARK, C.Y., WEISSMAN, I.L. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. **Cell Stem Cell**. v.1, p. 635–645, 2007.

MALHEIROS, P. S.; MICHELETTO, Y. M. S.; et al. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1198–1203, 2010.

MARINELLI, L. J., FITZ-GIBBON, S., HAYES, C., et al. Propionibacterium acnes bacteriophages display limited genetic diversity and broad killing activity against bacterial skin isolates. **MBio**. v. 3, n. 5, p. 279-312, 2012.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. **Journal of Food Protection**, v. 62, n.9, p. 1017-1023, 2001.

MARQUES, R. S. et al. Importância do controle da higiene pessoal dos manipuladores de alimentos da merenda escolar do Município de Vitória da Conquista-BA. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, n.150, p. 382, 20.

MARTINS, C.S.; MORGADO, D.L.; ASSIS, O.B.G. Cashew gum-chitosan blended films: Spectral, mechanical and surface wetting evaluations. **Macromolecular Research**, v. 24 b, 8, p. 691-697, 2016.

MATES, J.M., SANCHEZ-JIMENEZ, F. Role of ROS in apoptosis. Possible implications for cancer therapy. **International Journal Biochem. Cell Biol.** V. 32, p. 157 – 170, 2000.

MEDINA-TORRES L., SANTIAGO-ADAME R., CALDERAS F., GALLEGOS-INFANTE J. A., MANERO, O., Microencapsulation by spray drying of laurel infusions

(*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. **Industrial Crops Products**, v. 90, p. 1–8 2016.

MELLO, C. H. P. et al. **ISO 9001:2008**, Sistema de Gestão da Qualidade para Operações de Produção e Serviços. São Paulo: Atlas, 2009

MICHELIN, A. F., CARMO, L. S., CARLOS, I. Z. Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigüi, São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.65, n.1, p.46-49, 2006.

MOHAPOTRA, N. P.; PATI, S. P.; RAY, R. C. *In vitro* inhibition of *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) causing Java black rot in sweet potato by phenolic compounds. **Annals of Plant Protection Science**, v. 8, p. 106 - 109, 2002.

MOREIRA, A.V. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista Nutrition**, v.17, n.4, p.411-424, 2004.

MOURA, E.C., MORAIS NETO O. L, MALTA, D.C., MOURA, L., SILVA, N.N., BERNAL, R., ET AL. Vigilância de Fatores de Risco para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal. **Rev Bras Epidemiol**. v. 11 Suppl 1, p. 20-37, 2011.

NAYAK, A.K., DAS, B., MAJI, R. Calcium alginate-gum arabic beads containing glibenclamide: development and in vitro characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 51, n. 5, p. 1070-1078, 2012.

NICHOLS, M., CONRAD, A., WHITLOCK, L., STROIKA, S., STRAIN, E., WELTMAN, A., et al. Short communication: multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections retrospectively linked to unpasteurized milk using whole-genome sequencing. **J. Dairy Sci**. v. 103, p. 176–178, 2019.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.191-195, 2004.

NUISIN, R. KRONGSIN, R. J. NOPPAKUNDILOGRAT, S.KIATKAMJORNWONG. Microencapsulation of menthol by crosslinked chitosan via porous glass membrane emulsification technique and their controlled release properties, **J. Microencapsul**. v. 30, p. 498–509, 2013.

OETTERER, M. **Tecnologia do pescado**, Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/tecnologia%20do%20pescado.pdf>> Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Acesso em: 11/ julho/2017.

OLIVEIRA, A.B.A.; PAULA, C.M.D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M.R.I. & TONDO, E.C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Rev HCPA**, v.30, n.3, p.279-285, 2010.

OLIVEIRA, F. C.; CAMELO, A. L. M.; SILVA, F. F. M.; SOUZA, F. T. C.; LONGHINOTTI, E.; BARBOSA, F. G.; NASCIMENTO, R. F. Validação de Métodos por CG-EM para Análise de Carvacrol e trans β -Cariofileno em Amostras Comerciais Contendo Óleos Essenciais. **Rev. Virtual Química**, v. 9, n. 3, p. 924-933, 2014.

OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and cloves essential oil against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, v. 18, p. 1518 - 1523, 2007.

ONJONG, H.A., NGAYO, M.O., MWANIKI, M., WAMBUI, J., NJAGE, P. M. K. Exposure assessment to *staphylococcus enterotoxins* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) supplied through semi-regulated and unregulated value chains. **J Food Control**. v. 119, p.1074-1087, 2021.

OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J. R. SOTO, D. (Eds.) (2008). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República. Pará - Governo do Estado. Lei no 6.713 de 25 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a Política Pesqueira e Aquícola no Estado do Pará e dá outras providências. 2008.

ÖZBEK, T. et al. Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of *Origanum vulgare* L. subsp. Vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Turkish Journal of Biology**, v.32, p.271-276, 2008.

PAIVA, A. M. et al. Development of noncytotoxic PLGA nanoparticles to improve the effect of a new inhibitor of p53–MDM2 interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 394-402, 2013.

PASCHOAL, J. A. R., RATH, S., AIROLDI, F. P. S., REYES, F. G. R. Validation of chromatographic methods for the determination of residues of veterinary drugs in foods. **Quím. Nova**, v. 31 n. 5, 2008.

PAWLAK, A.; MUCHA, A. thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica acta*, v. 396, n.1-2, p. 153-166, 2003.

PERRO A. et al. Self-coacervation of ampholyte polymer chains as an efficient encapsulation strategy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 548, p. 275–283 2019.

PENG, Y., LI, Y.F. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. **Food Hydrocolloid.**, v. 36, p. 287-293, 2014.

PINHEIRO, A. C., COIMBRA, M. A., VICENTE, A. A. *In vitro* behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers e Effect of interfacial composition. **Food Hydrocolloids**, v.52, p. 460-467, 2016.

PITA, J.S.M. **Surto de listeriose entre 2009 e 2015 em lisboa e vale do tejo - investigação e medidas implementadas pela asae**. Dissertação de mestrado em medicina veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de

Lisboa, 2012.

PLOOY, W.; REGNIER, T.; COMBRINCK, S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, p. 117 - 122, 2009.

PRANOTO; RAKSHIT; SALOKHE, QIN, H., WILSON, C.A., ROBERTS, K.L., BAKER, B.J., ZHAO, X., BENVENISTE, E. N. IL-10 inhibits lipopolysaccharide-induced CD40 gene expression through induction of suppressor of cytokine signaling-3. **J Immunol**. v. 177, p. 7761–7771, 2006.

QIU, J.; ZHANG, X.; LUO, M.; LI, H.; DONG, J.; WANG, J.; LENG, B.; WANG, X.; FENG, H.; REN, W.; DENG, X. Subinhibitory Concentrations of Perilla Oil Affect the expression of Secreted Virulence Factor Genes in *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 6, p. 16160, 2011.

QUIÑONES, J. P., PENICHE, H., PENICHE, C. Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery. **Polymers**, v. 10, n.3, p. 235-245, 2018.

QV, X.Y., ZENG, Z. P., JIANG, J.G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p.1596-1603, 2011.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oil from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. **Food Control**, v.17, p. 359 - 364, 2006.

RICCI, A., ALLENDE, A., BOLTON, D., CHEMALY, M., DAVIES, R., FERNÁNDEZ ESCÁMEZ, P. S., GIRONES, R., et al. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. **EFSA J**. v.16, p. e05134, 2018.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and application. **Prog. Polym. Sci.**, v. 31, p. 603-632, 2006.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P., RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J., VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D., AND LÓPEZ CABO, M. Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. **Foods**, v. 7, p. 85, 2018.

DA ROSA, C. G., BORGES, C. D., ZAMBIAZI, R.C., NUNES, M.R., BENVENUTTI, E.V. ET AL. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. **Ind. Crops Prod**. v. 46, p. 138-146, 2013.

ROCOURT, J., C. JACQUET, AND A. REILLY. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **Int. J. Food Microbiol**. v. 62, p. 197-209, 2000.

RODRIGUES, S.; ROSA, A. M.; GREHA, A. Chitosan / carrageenan nanoparticles : Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 282–289, 2012.

RUBILAR, J. F. et al. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 466-474, 2013.

RUFF, N. et al. Distribution of α -tocopherol in fillets of turbot (*Scophthalmus maximus*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), following dietary α -tocopheryl acetate supplementation. **Aquaculture Nutrition**, v.10, p.75-81, 2004.

SALOKO, S., DARMADJI, P., SETIAJI, B., PRANOTO. Y. Antioxidative and antimicrobial activities of liquid smoke nanocapsules using chitosan and maltodextrin and its application on tuna fish preservation. **Food Biosci.**, v. 7, p. 71-79, 2014.

SANGUANSRI, P., & AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development: a food industry perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 10, p. 547-556, 2006.

SANSONE, F., MENCHERINI, T., PICERNO, P., D'AMORE, M., AQUINO, R. P. LAURO, M. R. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 468-476, 2011b.

SANTOS, C. et al. Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 3277-3285, 2006.

SANTOS, A.B.; FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 322-326, 2005.

SANTOS, R. L. Avaliação da influência da composição dos carreadores lipídicos nanoestruturados sobre o tamanho de partícula e eficiência de encapsulação para liberação controlada de carvacrol. São Cristóvão, 2017.

SCALLAN, E, HOEKSTRA, R. M., ANGULO, F. J., TAUXE, R. V., WIDDOWSON M. A., ROY, S. L., JONES, J. L., GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. **Emerg Infect Dis.** v. 17, p. 7–15, 2011.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; PO-HLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHINDLER, B.D., JACINTO, P., AND KAATZ, G.W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: Current status of potentiating existing antibiotics. **Future Microbiol.** v. 8, p. 491–507, 2013.

SCHMITT, C., TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, n. 1, p. 63-70 2011.

SHAH, B.D. DAVIDSON, P. M., ZHONG, Q., Nanodispersed eugenol has improved

antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. **In. J. Food Microb.** v. 161, p. 53-59, 2013.

SHAH, B. R., LI, Y., JIN, W., AN, Y., HE, L., LI, Z., XU, W., LI, B. Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. **Food Hydrocoll.**, v. 52, p. 369-377, 2016.

SHAHIDI, F. AND HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, v. 33, n.6, p. 501-547, 1993.

SIMON-BROWN, K., SOLVAL, K.M., CHOTIKO, A., ALFARO, L., REYES, V., LIU, C., DZANDU, et al. Microencapsulation of ginger (*Zingiber officinale*) extract by spray drying technology. **LWT—Food Sci. Technol.** v. 70, p. 119–125, 2016.

SILVA, M.L. Pesquisa de *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.* e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**, Programa de PósGraduação em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 146 p., 2007.

SILVA, J.P.L. et al. Oregano essential oil: influence of the chemical composition on the inhibitory activity against *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 136-141, 2010.

SILVA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 19, p. 503-510, 2013.

SILVA, H. D., CERQUEIRA, M. A., & VICENTE, A. A. (2011). N-nanoemulsions for food applications: development and characterization. **Food and Bioprocess Technology**, **IN PRESS**

SIMON, S.S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v.18, p.1565-1568, 2007.

SING, C. E. Development of the modern theory of polymeric complex coacervation. **Adv. Colloid Interface Science**, v. 239, p. 2–16, 2017.

SIQUEIRA, T. V. Aquaculture: the new frontier for sustainable food production. **Rev. BNDES**, v. 25, n. 49, p. 119-170, 2018.

SOARES, K.M.P.; GONÇALVES, A.A.; SOUZA, L.B. & SILVA, J.B.A. Qualidade microbiológica de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o armazenamento em gelo. **Rev. Ciência Rural**, v 44, n. 12, 2273-2278, 2014.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136- 141, 2012.

SORENSEN, K., BROUCKE, S. V. D., FULLAM, J., DOYLE, G., PELIKAN, J., SLONSKA, Z., ... (HLS-EU) Consortium Health Literacy Project European. Health literacy and public health: A systematic review and integration of definitions and models. **BMC Public Health**, v. 12, n.1, p. 80, 2012.

SOUSA, J. P. et al. Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, p. 9-13, 2012.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, L.G. R., CROSA O., WINGE H., GUERRA, M. The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (*Gilliesioideae*, *Alliaceae*): a populational and cytomolecular analysis. **Genet Molec Biol.**, v. 32, n.1, 2009.

SOUZA, E.L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 308-311, 2010.

SOUZA, G.T. et al. Effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semihard cheese broth and slurry. **Journal Food Protection**, v.79, n. 2, p. 246-252, 2016.

STRAUSS, G., GIBSON, S. M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin based coacervates for use as food ingredients. **Food Hydrocolloids**, v.18, p. 81–89, 2004.

Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 2017, **Annual report U.S.** Department of Health and Human Servicesvi, CDC, Atlanta, Georgia, 2019.

TAGLIARI, K.C., CECCHINI, R., ROCHA, J.A.V., VARGAS, V.M. Mutagenicidade do sedimento e estresse oxidativo hepático em peixes sob a influência de curtumes. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 57-61, 2006.

TAN, P.Y. TAN, H.W. CHANG, B.T. TEY, E.S. CHAN, O.M. LAI, B.S. BAHARIN, I.A. NEHDI, C.P. Effects of storage and yogurt matrix on the stability of tocotrienols encapsulated in chitosan-alginate microcapsules. **Food Chem.**, 241, p. 79-85, 2018.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595, 2013.

TENGKU-ROZAINA, T.M.; BIRCH, E.J.; Thermal Analysis for Lipid Decomposition by DSC and TGA. *Encyclopedia of food chemistry*, v.2, 345-352, 2019.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, n.2, p.124-135, 20

TIYABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. **Journal Naresuan University**, v. 11, p. 51-66, 2003.

TOMAINO, A. et al. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, v. 89, n. 4, p. 549-554, 2005.

TONHI, E., COLLINS, K. E., JARDIM, I. C. S. F., COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, (CLAE-RF) baseada em superfície de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, p. 616-623, 2002.

TRUMPOWER, B.L., GENNIS, R.B. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. **Annual Review in Biochemistry**, v. 63, p. 675-716, 1994.

TSAI, R.-Y., CHEN, P.-W., KUO, T.-Y., LIN, C.-M., WANG, D.-M., HSIEN, T.-Y., et al. Chitosan/pectin/gum arabic polyelectrolyte complex: Process-dependent appearance, microstructure analysis and its application. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 752–759, 2015.

TURINA, A.V. et al. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101-113, 2006.]

USMIATI, S., RICHANA, N., MANGUNWIDJAJA, D., NOOR, E. PRANGDIMURTI, E. The using of ionic gelation method based on polysaccharides for encapsulating the macromolecules– a review. **International Conference on Food Security and Nutrition**, pp. 80-84, 2014.

VAIDYA, S. et al. Microencapsulation of cinnamon oleoresin by spray drying using different wall materials. *Drying Technology: An International Journal*, v. 24, p. 983-992, 2006.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. **European Polymer Journal**, Oxford, v.41, n.5, p.923-932, 2005.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D., GALVÃO, J. A., OETTERER, M. Contamination sources, biofilm-forming ability and biocide resistance of *Staphylococcus aureus* in tilapia-processing facilities. **Food Sci. and Tech. Int.** v. 24, n.3, p. 209-222, 2018.

VENKATESH, V. *Staphylococcus aureus* and MRSA: Do we know the true burden? **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 6, n. 3, p. 103-104, 2018.

VENTURELLI, R. B. **Microencapsulação por Coacervação Complexa de óleo de menta aplicados em tecidos de algodão**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

VERHEYEN, D., GOVAERT, M., SEOW, T. K., RUVINA, J., MUKHERJEE, V., BAKA, M., SKÅRA, T., VAN IMPE, J. F. M. The Complex Effect of Food Matrix Fat Content on Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes*: Case Study in Emulsion and Gelled Emulsion Model Systems. **Front Microbiol.** v. 22, n. 10, p. 3149, 2020.

WAGNER, K. H. ISNARDY B., ELMADFA I. Effects of seed damage on the oxidative stability of poppy seed oil. **Europ. J. Lipid Sci. Technol.** v. 10, p.219-224, 2012.

WAMBUI, J., ESHWAR, A. K., AALTO-ARANEDA, M., PÖNTINEN, A., STEVENS, M. J. A., NJAGE, P. M. K., TASARA, T. The Analysis of Field Strains Isolated From Food, Animal and Clinical Sources Uncovers Natural Mutations in *Listeria monocytogenes* Nisin Resistance Genes. **Front Microbiol.** v. 6, n.11, p.549-531, 2020.

WANG, J. G., LI, Y. Z., GAO, Y. F., XIE, V., ZHOU, M.H., HE, Y.Y., et al. Cinnamon oil-loaded composite emulsion hydrogels with Lantibacterial activity prepared using concentrated emulsion templates. **Ind. Crops Prod.**, v. 112, p. 281-289, 2018.

WEISS, J., LOEFFLER, M., TERJUNG, N. The antimicrobial paradox: Why preservatives lose activity in foods. *Current Opinion in Food Science: Innovation in Food Science*, **Foodomics Technologies**, v. 4, p. 69-75, 2015.

XAVIER-JUNIOR et al. Supramolecular interactions between β - lapachone with cyclodextrins studied using isothermal titration calorimetry and molecular modeling. **J. Mol. Recognit.** v. 2646, p. 3-10, 2017.

XAVIER-JUNIOR, F. H., MACIUK, A., ROCHELLE DO VALE MORAIS, A., ALENCAR, E. D. N., GARCIA, V. L., TABOSA DO EGITO, E. S., VAUTHIER, C. Development of a gas chromatography method for the analysis of copaiba oil. **Journal of chromatographic science**, v. 55, n. 10, p. 969-978, 2018.

XIAO, Z.; LIU, W.; ZHU, G.; ZHOU, R.; NIU, Y. Production and characterization of multinuclear microcapsules encapsulating lavender oil by complex coacervation. *Flavour and Fragrance Journal*, v.29, 166-172, 2014

XU, W. R., XIE, W. J., HUANG, X. Q., CHEN, X., HUANG, N., WANG, X., LIU, J. The graphene oxide and chitosan biopolymer loads TiO₂ for antibacterial and preservative research. **Food Chem.**, v. 221, p. 267-277, 2017.

YANG G, et al. Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. **Cancer Cell**, v. 6, n. 2, p. 139-50, 2004.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E.; POKORNÝ, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipids Science and Technology**, v. 108, n. 9, p. 776-793, 2006.

YAO, Y., CUI, X., AL-RAMAH, I., SUN, X., LI, B., HOU, J., DIFIGLIA, M., PALACINO, J., WU, Z.Y., MA, L., BOTAS, J., LU, B. A striatal-enriched intronic GPCR modulates huntingtin levels and toxicity. 2015.

YE, M. K. et al., Novel protein loaded chondroitin sulfat-chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 380- 3812, 2012.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate polymers*, v. 20, p. 394-400, 2010.

ZHANG, K., ZHANG, H., HU, X., BAO, S., HUANG, H. Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 61-66, 2012.

ZHANG, Y.; NIU, Y.; LUO, Y.; GE, M.; YANG, T.; YU, L. L.; WANG, Q. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, p. 269 – 275, 2014.

ZELENY, R., EMTEBORG, H., CHAROUD-GOT, J., SCHIMMEL, H., NIA, Y., MUTEL, I. Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: Feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. **Food Chem.** v. 168, p. 241-2, 2015.

ZHU, Y., LIANG, S., CHEN, K., GAO, X., CHANG, P. TIAN, C., HUANG, Y. Preparation and properties of nanoencapsulated n-octadecane phase change material with organosilica shell for thermal energy storage. **Energy Conversion and Management**, v. 105, p. 908-917, 2015.

ZU, Y.G., ZHAO, Q. ZHAO, X. H., ZU, S. C., MENG, L. Process optimization for the preparation of oligomycin-loaded folate-conjugated chitosan nanoparticles as a tumor-targeted drug delivery system using a two-level factorial design method. **Int. J. Nanomed.** v. 6, p. 3429–3441, 2011.

APÊNDICE A - ARTIGO: OPTIMIZATION OF *ORIGANUM VULGARE* ESSENTIAL OIL- LOADED CHITOSAN/ GUM ARABIC NANOCAPSULES BY COMPLEX COACERVATION USING BOX-BEHNKEN DESIGN: PREPARATION, PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION, AND THERMAL STABILITY

Artigo a ser submetido a Industrial Crops and Products (Fator de Impacto 4,244)

Optimization of *Origanum Vulgare* essential oil- loaded Chitosan/ Gum arabic nanocapsules by complex coacervation using Box-Behnken Design: Preparation, physicochemical characterization, and thermal stability

Sonálle Carolina Albuquerque de Andrade^a, Francisco Humberto Xavier Junior^{b,c}, Nereide Stela Santos Magalhães^c, Rodrigo de Oliveira França^d, Marciane Magnani^e, Thayza Christina Montenegro Stamford^{a*}

^a Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof^a Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901. Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Universidade Potiguar Laureate International Universities, Campus Salgado Filho, 59075-000, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Faculty of Health Sciences, University of Manitoba, D226H - 780 Bannatyne Avenue, Winnipeg, Manitoba, Canada, R3E 0W2.

^e Universidade Federal da Paraíba, Campus I - Centro de Tecnologia - Bloco G, Cidade Universitária, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

*** Correspondence author:**

Thayza Christina Montenegro Stamford (T.C.M. Stamford)

Federal University of Pernambuco, Medical Sciences Center, Tropical Medicine Area, Av. da Engenharia, s/nº, 2º andar, Microbiologia e Imunologia, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, PE, Brazil.

thayzastamford29@gmail.com / thayza.stamford@ufpe.br .

Phone: 55 +8121268526; Fax: 55+8121268473

Abstract

This study aimed to optimize, characterize, and verify the thermal stability of *Origanum Vulgare* essential oil (OEO)- loaded Chitosan (CHI)-Gum Arabic (GA) nanocapsules (OEONC). The encapsulation system was developed by a complex method of coacervation. Initially, the best CHI/GA ratio was verified to obtain nanoparticles with smallest size and higher positive charge. Box-Behnken experimental design was executed to optimize the production of OEONC. Concentrations of oregano oil, CHI/GA and Tween 80 was selected as independent variables and their influences on the dependent variables, size, and zeta potential were measured. The optimal nanocapsules were characterized by FTIR, TG, DSC, SEM, AFM. The best proportion of CHI/GA was 1:5. OEO concentration was the most important factor responsible to produce small nanocapsules with positive charge ($r^2 = 0,998$, $r^2_{adj} = 0,985$). Optimal nanocapsules showed diameter of 323 ± 22 nm, unimodal distribution ($PdI = 0.20 \pm 0.02$), zeta potential $+34.8 \pm 0.8$ mV and spherical shape structure. The results of the thermal analyses showed that the CHI- GA successfully encapsulated OEO, with encapsulation efficiency of 95%, without native oil compound changes. The nanocapsules were stable at 4, 25 and 45 °C for 120 days. Taken together, complex coacervation was able to produce OEONC with stable physicochemical properties ideal to biomedical application.

Keywords: biopolymer; essential oil; nanocomposite; thermal stability.

Highlights

- Oregano oil–Chitosan-Gum Arabic nanosystem were obtained by complex coacervation
- CHI and GA interacted by electrostatic attraction with optimum ratio 1:5
- OEO concentration impacted in the size and zeta potential of the nanocapsules
- OEONC had high encapsulation efficiency without changing the oil composition
- OEONC were physiochemically stable for 120 days in different temperatures

1.Introduction

Essential oils are aromatic and hydrophobic compounds extracted from plants. These oils have a complex chemical composition, containing volatile and thermolabile molecules, such as terpenoids and phenolic acids, that are susceptible to being oxidized and hydrolysed. Due to their complex composition, essential oils can be used in several fields of application, especially in the areas of food, agriculture, and pharmaceuticals (Fraj et al., 2018; Hasani, Ojagh and Ghorbani, 2018; Matos, Lucca and Koester, 2019). In a wide variety of essential oils, the oregano essential oil (OEO) extracted from *Origanum vulgare* L. has extensive use as a bioactive compound, such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, tissue remodelling, immunomodulatory, and anticancer (Souza et al., 2016; Andrade, et al., 2017; Fraj et al., 2018). These activities are mainly in the presence of two monoterpene phenols, carvacrol (majority compound) and thymol, and the hydrocarbons p-cymene and γ -terpyrene (Hosseini et al., 2013; Honório et al., 2015).

The use of essential oils nanoencapsulated in polysaccharide matrices had been considered as promising systems to increase storage stability, extend its bioactivity properties, such as antimicrobial and antioxidant, and in addition to providing flavor and aroma to the food products (Rosa et al., 2013; Fraj et al., 2018; Perinelli et al., 2018). The emerging technology of nanoencapsulation of bioactive compounds, such as oregano essential oil, in biodegradable distribution systems has the potential to overcome susceptibility, increase its stability during thermal processing and storage, thus improving its applicability and bioactivity (Matos, Lucca and Koester, 2019). A very promising technique for obtaining nanosystems is by complex coacervation (Gonçalves et al., 2018).

The complex coacervation method provision of high encapsulation efficiency, controlled release, and improved protection of encapsulated materials against adverse conditions, such as heat or exposure to light (Timilsena et al 2019; Wei et al., 2019). Complex

coacervation includes, at least, two polymers with opposite charges for capsule formation (Timilsena et al 2019; Gharanjig et al., 2020), generally using polysaccharides and/or proteins when encapsulation by natural biopolymers is desired (Espinosa-andrews et al., 2013; Gonçalves et al., 2018). Despite several researches with different polymers for encapsulation by complex coacervation, further investigations must be carried out to present new biopolymers to create nanoparticles to promote a better stability to the nanosystem and to expand the applicability (Rosa et al., 2013; Medina-Torres et al., 2016; Weththimuni et al., 2016; Ruiz et al., 2017; Taban et al., 2020).

Chitosan (CHI) and arabic gum (AG) are polymers that have emulsifying properties and high stability, and there have been reported as wall materials to encapsulate a wide variety of bioactivity compounds. However, there is still limited research into the interactions between these polysaccharides (Binsi et al., 2017; Chang et al., 2017; Hosseini et al., 2017; Liang et al., 2017). The main interaction between chitosan and arabic gum is by electrostatic attraction. This occurs concurrently with hydrogen bonds, hydrophobic interactions and physical forces that can be established between oppositely charged flexible molecular chains. The nature of these interactions can lead to segregative or associative phase behaviour, depending on the characteristics of the polymers (for example, charge density, size, type and distribution of reactive groups), as well as its concentration and the proportion between the polymers used (Espinosa-Andrews et al., 2010, Liu et al., 2010).

The reduce of data in the literature about the encapsulation of OEO by chitosan-gum arabic by the complex coacervation method motivated the research. Thus, the present study aimed to investigate the influence of the CHI/GA ratio on the nanoparticle size and charge (zeta potential); to optimize the preparation of *Origanum Vulgare* essential oil (OEO)- loaded Chitosan (CHI)- Gum Arabic (GA) nanocapsules (OEONC) by complex coacervation using Box-Behnken Design, as well as to characterize, evaluate the encapsulation efficiency and the

stability of the optimal nanocapsules in different temperatures of storage.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The gum arabic was purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil), oregano essential oil (density: 0.90, refractive index: 1.47 both at 20 °C) was obtained from Aromalândia Ind. Com. Ltda. (Minas Gerais, Brazil), low molecular weight chitosan and Tween 80 were purchased from Sigma-Aldrich (France). Acetic acid, Sodium hydroxide and ethyl acetate were provided by Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Ultrapure water was obtained from a Millipore purification system (Milli-Q plus, Millipore, St Quentin in Yvelines, France).

2.2 Oregano essential oil composition analysis

The composition analysis of the OEO was performed by Gas Chromatograph coupled to Mass Spectrometer (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). Compounds were separated on a capillary RTX ®-5MS column (30m x 0.25 mm x 0.25 µm). The injection volume was 1 µl OEO diluted in ethyl acetate (1:10). The programming of the gas chromatograph oven temperature was started at 60°C, with an increase of 3°C per minute until reaching 240°C, concluding the run time equivalent to 60 minutes. Injector temperature was maintained at 250 °C and helium gas was used as carrier gas at a constant flow rate of 1mL / min. The mass spectrometer was operated by electron impact with a source temperature of 200 °C, and with ionization energy of 70V scan range of M/z 40 used to create the superlative / z 500. For the identification of volatile compounds was used the NIST / EPA / NIH Mass Spectral Database (Version 1.7) own library of the CG / MS, confirmed by injection of the carvacrol standard. The quantification of volatile compounds was obtained by normalizing the volatile areas and expressed as percentage of area (%).

2.3 Preparation of Origanum Vulgare essential oil (OEO)- loaded Gum Arabic (GA)-Chitosan (CHI) nanocapsules (OEONC)

2.3.1 Determination the optimum ratio of gum arabic/chitosan

Chitosan solution (5 mg/mL), 15 mL, was prepared in acetic acid 1% under magnetic stirring condition (1000 rpm) at 25 °C, with pH adjusted to 5.0 using NaOH 1N. 15 mL of gum arabic solutions (25; 30; 35; 40; 45; 50; 60; 70 and 80 mg/mL, w/v, pH 4.5-5), were prepared by dispersing the required amount of gum powder in deionized water under the same conditions as chitosan. Then, 1 mL of each GA solution was added in 1 mL of CHI solution (5 mg/mL). The mass (mg) optimum ratio of CHI/GA was the one, that produced nanoparticles with smaller size and higher positive charge surface, which was used in the following experiments.

2.3.2. Experimental design to optimize the preparation of OEONC: Box-Behnken Design

A Box-Behnken experimental design approach was carried out to analyse the main effects and interactions of Independent variables: oregano essential oil (X1), gum arabica/chitosan (X2) and Tween 80 (X3) on the dependent variables: particle size and zeta potential of the nanocapsules (Table 1). The optimal parameters chosen to carry out the preparation of nanocapsules, to be used in thermal stability assay, were those that produced the smaller size and the higher positive charge surface nanocapsules.

The nanocapsules were prepared according to the methodology proposed by Alvim and Grosso (2010) with adaptations. The quantities of OEO, tween 80 and GA/CHI are described in Table 1, referring to the Box-Behnken design. Briefly, 15 mL of chitosan solution were prepared, which was left under stirring for 8 hours. Oregano essential oil and tween 80 were added to chitosan solution, stirred in the ultraturrax at 8000 rpm for 2 min, forming an emulsion.

In parallel, 15 mL of gum arabic solution was prepared under stirring for 30 minutes. The gum arabic solution was added to the previously formed colloidal dispersion by trickling and remained under magnetic stirring for 60 min. The colloidal dispersion was then centrifuged for 20 min at 4000 rpm, removing the supernatant and washing three-times with ultra-pure water (Milli-Q), following ultrasound for 5 minutes.

The effects of the studied variables were interpreted graphically and statistically using Statistic software (version 7.0, StatSoft Inc., USA), to validate the statistical design. Response surface graphs were generated to visualize the simultaneous effect of each variable on each response parameter.

2.4. Characterization of the nanoparticles

2.4.1 Size measurement

Hydrodynamic mean diameter and size distribution of the nanoparticles dispersions were determined at 25 °C by quasi-elastic light scattering using a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Orsay, France). The scattered angle was fixed at 90°. The samples were diluted 1:100 before analysis with Milli Q water. Each measurement was done in triplicate meaning that the average was calculated from 9 values.

2.4.2 Determination of the zeta potential

Zeta potential of the nanoparticles was determined by the electrophoretic mobility using Laser Doppler Electrophoresis (Zetasizer Nano ZS90 Malvern Instruments Ltd, Orsay, France). Nanoparticles dispersions were diluted (1:100) with NaCl at 1 mmol/ L. Values are presented as mean of measurements performed on three replicate samples.

2.4.3 Morphology and size measurement

Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM micrographs were obtained under the microscope SPM-9700® (Shimadzu, Japan), operating in intermittent contact mode at room temperature. Samples containing 0.002% (w/w) in ultrapure water were spread on mica surface and dried at room temperature for 48 h. Silicon cantilevers (Pointprobe®, NanoWorld AG, Switzerland) were used to obtain the images using a spring constant in the range of 21-78 N / m. The resonance frequency was set at 320 kHz, and the scanning rate was 1 Hz. An area of 5 μm x 5 μm was analyzed for each sample.

Scanning electron microscopy (SEM)

Morphology of the freeze-dried nanocapsules was examined to study the surface structures of powders by scanning electron microscopy (SEM; Leo EVO–40 VPX, Carl Zeiss SMT, Cambridge, UK). The samples were glued onto an adhesive tape mounted on the specimen stub and particles were covered with gold-palladium prior to analysis. Representative SEM images were reported.

2.4.4 Fourier transform infrared spectrometry

The CHI, GA and Origanum Vulgare essential oil (OEO) - loaded Chitosan (CHI) - Gum Arabic (GA) nanocapsules (OEONC) were evaluated by Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). Thus, FTIR CHI, GA and lyophilized OEONC spectra were performed. The samples were prepared on KBr disks and the transmittance was measured from 500 to 4000 cm^{-1} using an FT / IR-4600 spectrometer (Jasco, Maryland, USA). The data were processed (Origin 8, OriginLab Northampton, USA) and the final graphs were plotted.

2.4.5 Thermal analysis

Thermogravimetric (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) curves were obtained using simultaneous thermal analysis equipment (Perkin Elmer Pyris 6). Samples of around 5 mg were placed in sealed aluminum crucibles with pierced lids. Measurements were made from room temperature up to 400°C using a heating rate of 10°C/min. The sensors and crucibles were under a constant flow of nitrogen (70 mL.min⁻¹) during the experiment.

2.5 Determination of Encapsulation Efficiency (EE%)

Fractions of the nanoparticles were diluted with 1mL of ethyl acetate, sonicated for 1 h and filtered through a 0.22 µm Millipore filter. The amount of oregano essential oil was determined by Gas Chromatograph Coupled to Mass Spectrometer (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). Compounds were separated on a 5MS capillary RTX column (30m x 0.25 mm x 0.25 µm). The injection volume was 1 mL of OEO diluted in hexane (1:10). The oven temperature setting of the gas chromatograph was started at 60 ° C, increasing from 3 ° C per minute until reaching 240 ° C, concluding the run time equivalent to 60 minutes. The injector temperature was maintained at 250 ° C and the helium gas was used as the entrainment gas at a constant flow rate of 0.99 ml / min. The mass spectrometer was operated by electron impact with a source temperature of 200 ° C and with ionization energy of 70V, scanning range of m / z 40 am / z 500. The encapsulation efficiency was calculated as follows (Eq. 1):

$$EE (\%) = \frac{T0-S0}{T0} \times 100 \quad \text{Eq. 01}$$

T0

where T0 is the total OEO content and S0 is the non-encapsulated OEO content (Carneiro et al., 2013).

2.6 Temperature Stability

In order to perform the temperature stability, the nanocapsules were conditioned in glass vials in three different temperatures, under refrigeration at 4 with relative humidity of 53%, at room temperature 25 °C and in an oven at 40°C (Sansone et al., 2011; Qv, Zeng and Jiang, 2011). The thermal stability test was carried out for a period of 120 days. The nanoparticles size and zeta potential were evaluated on the days 0, 7, 15, 30, 60, 90 and 120 days. Three lots of nanosystems were produced, and each lot was fractionated to be subjected to each temperature evaluated. All assays were performed in triplicate.

2.8 Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate, and the results expressed as the mean $\pm$ SD. The means of 2 groups were compared using nonpaired Student's t tests. When comparing multiple groups, one-way analysis of variance (ANOVA) was applied with the Tukey multiple comparison procedure. The statistical data were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 GC/MS Analysis of Constituents in *Oreganum vulgare* essential Oil (OEO)

A total of 24 constituents were identified in the OEO used in this study. The constituents detected in amounts greater than 0.3% were described in Table 2. Carvacrol (78.82%), p-cymene (10.45%), γ -terpinene (5.69%), linalool (1.47%) and thymol (1.23%) were detected as major compounds. Other constituents, such as α -pinene (0.46%), mircene (0.35%), β -karyophyllene (0.73%) and thymol methyl ether (0.50%) were detected in smaller amounts. Previous studies, in literature, have also reported carvacrol and p-cymene as predominant constituents in OEO (Govaris et al., 2010; Lu et al., 2018; Khan et al., 2018; Fraj et al., 2018; Hasani, Ojagh and Ghorbani, 2018; Matos, Lucca and Koester, 2019). The quantities of the main constituents detected in OEO can vary due to environmental conditions (for example,

altitude, temperature, precipitation, and geographic distribution) at the source of the plant (Burt, 2004; Khan et al., 2018). Thus, the knowledge of the chemical composition can help to understand similarities or differences in the biological activities observed in different essential oils of the same plant species.

3.2 Production and Characterization of Nanoparticles

Figure 1 summarizes the average and zeta potential diameters of the CHI /GA nanoparticles. These formulations showed a little variation in terms of particle size, however CHI/ GA ratio (10/30 and 10/40 mg/mL) were discrepant in relation to the size and the average size, being above the nanometric scale. When the proportion between CHI/GA was increased, single peak of particle distribution were obtained indicating uniform dispersion with low polydispersity index. The zeta potential was always positive (+10 mV) regardless of the GA concentration (Figure 1 B). When the proportion, in mass (mg), of GA was very high (CHI: GA 10/60), a reduction of the zeta potential was observed due the excess of the negatively charged from the anionic polysaccharide. These results support the hypothesis that electrostatic interactions are the main driving force to form small homogeneously dispersed CHI/GA nanoparticles. In addition, the positive charges from CHI are positioned onto the surface of the nanoparticle shell.

GA has many groups of carboxylic acids in its main monomer (β -d-galactopyranose linked to 3.6 replaced in position 6 by side chains of linked α -1-arabinofuranosis 3) which has a pKa close to 3.5, developing negative charges in all pH ranges (Gonçalves et al., 2018). On the other hand, CHI has units of glucosamine (2-amino-2-deoxy-Bd-glucose) and these amino groups lead to a high pKa value of 6.8 and, unlike most polysaccharides, they develop positive charges over a wide pH range, being higher at acidic pHs. Previous researchers also suggest that the relationship in the formation of nanoparticles occurred due to electrostatic interactions

between low molecular weight CHI and GA, resulting in a milky colloidal dispersion (Usmiati et al., 2014). Thus, when the interaction of both polyelectrolytes is established, several electrostatic interactions are generated in the CH chains, leading to a liquid polyelectrolytic complexation (Ciro et al., 2020).

Taken together, the 1: 5 CHI/GA ratio was selected due to the small particle size and sufficient positive charge of the individualized nanoparticles with small sizes (ranging from 290 to 315 nm) and zeta potential ($+ 15.89 \pm 4$ mV). These results corroborate Butstraen and Salaun (2014), who obtained an excellent 1: 5 CHI / GA ratio to produce microparticles loaded with small particles of migliol. In contrast, Rajabi et al. (2019) found a better CHI / GA ratio of 2: 1 to encapsulate saffron extract, corroborating with Avadi et al. (2010) who used the same proportion to encapsulate insulin. This allows the authors to suggest that the proportions of biopolymers can vary for several reasons, such as: the method of preparation, the type and concentration of the core material, the weight ratio of the wall materials, the molecular weight and the size of the molecules are the factors that affect the size and zeta potential of the prepared nanoparticles.

3.3 Nanocapsules preparation and process optimization

For the first time, the *Origanum Vulgare* essential oil (OEO) - charged Chitosan (CHI) –Gum arabica (GA) nanocapsules (OEONC) obtained by the complex coacervation technique are described. To produce nanocapsules with optimized concentration of polymers (CHI / GA), essential oil and surfactant being tested for size and load, a factorial design was carried out from the Box-Behnken project. The applied experimental design approach represented a simple methodology to provide important data on nanocapsules, limiting the number of experiments to be carried out, reagent and time.

The Pareto graph (Figure 2) provides the relative importance of the individual effects

and interaction of the independent variables (essential oil of oregano, CHI / GA and Tween 80) on the dependent variables (particle size and zeta potential of the nanocapsules). In addition, through this analysis it was possible to identify statistically significant variables with a level of significance (value $p < 0.05$). Thus, all variables were statistically significant to produce nanocapsules with reduced particle size ($r^2 = 0.998$, $r^2_{adj} = 0.985$). The surfactant concentration was not a significant variable to increase the values of the zeta potential ($r^2 = 0.913$, $r^2_{adj} = 0.881$). The length of each bar in the graph indicated the standardized effect of the corresponding variable on the response. Negative values indicate an unfavorable or antagonistic effect for the development of nanocapsules with the desired characteristics, that is, small size and positive zeta potential, while the positive coefficients showed a favorable or synergistic effect (Xavier-Junior et al., 2018).

Figure 3 shows a response surface graph related to the particle size of the nanocapsules. The diagram indicates that the particle size is reduced by increasing the amount of OEO and decreasing the mass (mg) of the polymers (CHI/ GA in the proportion of 1:5). The answer considering the size of the nanoparticles varied exponentially with each of the variables, demonstrating considerable interactions between each of the independent variables and the size of the nanocapsules obtained from the different conditions tested.

The factor that had the greatest positive influence on the size of the nanocapsules were the polymers used (CHI/ GA) followed by tween 80, a nonionic surfactant. Larger nanocapsules are mainly related to oregano oil. The high electrical charge of the nanovesicles developed in the study suggests good stability of the suspension, because the greater the zeta potential, both positive and negative, the greater the repulsive interactions, thus decreasing the frequency of collisions and the possibility of precipitation (MALHEIROS et al., 2010).

Nanoparticles of zein, corn gluten protein, loaded with thymol and stabilized with sodium caseinate and chitosan hydrochloride were prepared and characterized in the study by

Zhang et al. (2014). In the absence of sodium caseinate, the particle size and zeta potential were 118.30 nm and +28.10 mV, respectively. After coating the nanoparticles with sodium caseinate, there was an inversion of the zeta potential signal, which went from positive to negative, in the range of -33.60 to -38.95 mV, while the size increased to about 200 nm. The surfactants used, the pH of the medium, concentration, ionic strength of the solution and the polymers constituting the nanoparticles are the main components present in the formulations capable of influencing the size and zeta potential (Crucho; Barros, 2017).

The oregano oil nanocapsules showed zeta potential values ranging from + 15 to + 34.8 $\pm$ 0.8 mV. Figure 4 shows the response surface relating the Zeta potential of the nanoparticles ($r^2 = 0.913$, $r^2_{adj} = 0.881$). The surfactant concentration was not a significant variable to increase the value of the zeta potential.

The region of interest has a dark red color, it corresponds to the positive Zeta potential of the nanocapsules. Through the plotted surface, it is observed that the greater the amount of oregano oil and polymer are the positive values for the zeta potential found for the nanocapsules. This value is due to the chitosan chain that is positive and in turn the nanoparticles formed continue with this load.

Chitosan nanoparticles obtained cross-linked with tripolyphosphate (TPP) adsorbed with gentamicin and salicylic acid. They prepared the chitosan solution with acetic acid and the zeta potential found was + 42.18 mV, which decreased as the ratio between salt and chitosan increased (Alishahi et al., 2011). Chitosan nanoparticles were also obtained in a similar way to the previous study, and the zeta potential found was + 49.3 mV, due to the presence of protonated amino groups on the surface of the nanoparticles (Ji et al., 2011).

3.4 Characterization of the nanoparticles

The SEM images of the nanocapsules are shown in figure 5. They provide useful

information about particle size and morphology. The nanocapsules, as expected, are spherical and well individualized, with typical images of nanocapsules composed of an oily core surrounded by a polymer shell, whose average size was found below 300 nm. Natrajan et al. (2015) obtained nanocapsules of alginate, chitosan and lemon grass oil of similar size and morphology. The surface morphology of the nanocapsules was studied using an atomic force microscopy (AFM) (Figure 6). AFM analysis showed three-dimensional spherical appearance and smooth surface. The same pattern was observed on the surface of chitosan and carrageenan nanosystems (Halperin et al., 2016). The size of the nanocapsules by AFM was 275 ± 0.8 nm, corroborating with the other measurements obtained.

The FTIR spectrum of gum arabic (Figure 15) showed characteristic peaks from 1600 to 750 cm^{-1} that correspond to the elongation of $-\text{OH}$, asymmetric $-\text{COO}$, $-\text{COO}$ symmetrical and $-\text{C-O-C}$ of glycosidic bond (Nayak; Das; Maji, 2012). The characteristic peaks of chitosan are approximately between 1630-1650 cm^{-1} correspond to the carbonyl CO vibration; 1500 cm^{-1} is due to a combination of deformation $-\text{NH}$ and elongation $-\text{CN}$; 1375 cm^{-1} is associated with $-\text{CH}_3$ in the amide group; 1300 cm^{-1} represents the stretching vibration $-\text{CH}_2$ due to the pyranose ring and the specific bands of the β ($1 \rightarrow 4$) CO and C glycoside elongations absorbing around 1050 -1130 cm^{-1} , characteristics of the polysaccharide structure were observed (Atay; Çelik, 2017; Bobu et al., 2011).

A slightly different trend was observed in the FTIR spectrum of the nanocapsules. As a result of the interactions between the biopolymers, the carbonylamide region was altered, so that the NH flexion vibration was around 1450 cm^{-1} and the peak of amide II absorbance at around 1250 cm^{-1} . This can be caused by the electrostatic interaction between the negative functional groups of GA and the positive ones of QUI (Sah et al., 2016; Espinosa-Andrews et al., 2010).

3.6 Thermal analysis

Thermal stability is considered significant to evaluate the performance of nanoparticles as storage materials (Zhu et al., 2015). The thermal stability of the GA, the CHI and the nanoparticles were studied by measurements of TG, and the results were presented in Figure 8. There was a single step of weight loss for GA and CHI, and peak weight loss temperatures were around 280 °C, which resulted mainly from macromolecular chain decomposition and evaporation. The weight loss of the nanoparticles started at about 250 °C and almost no residual material remained at 650 °C, suggesting that the nanoparticles core underwent volatilization caused by decomposition. In the CHI curve, even with temperatures above 550 °C, it remained around 35% mass. In addition, the second step of weight loss during approximately 475 °C appeared in the nanoparticles, the results also demonstrate that the polymeric materials used as involucre probably encapsulated the oil of oregano successfully and has resistance to high temperatures during the processing Bhattarai et al. (2015) regarding the differential scanning calorimetry presented in Figure 8. The melting point for CHI and nanoparticles is initiated after 50 °C of is defined by an endothermic peak with an initial temperature of 48 °C, while GA has a small exothermic peak probably due to crystallization. After 100 °C a broad range of exothermic tendency is observed, with peaks between 250 °C. The formulation containing the oregano oil only shows the peak at 400 °C indicating oxidative degradation of the volatile compounds, the same does not occur with GA and CHI, imparting the presence of the crystalline form of these compounds and in the physical mixture between them.

3.7 Encapsulation Efficiency (EE%)

The results indicated that the nanoencapsulation process completely preserved the oil composition and concentration of each one, obtaining encapsulation efficiency of the high oregano oil at $95\% \pm 0.7$. The high efficiency of encapsulation of oregano essential oil that the

oil immediately diffused into the inner phase of the nanoparticles, where it was trapped by the newly formed nanoparticles by polymer envelope. Maintenance of the oil composition during the nanoencapsulation process is an important parameter in assessing why the oil contains biologically active components believed to promote a synergistic effect when coupled with the encapsulating polymers (data not shown supplementary data) Many researchers have reported EE% values from 0 to 95%, depending on the type and composition of the wall material, ratio of core material to wall material, stability and physico-chemical properties of nanosystems (Hosseini et al., 2017; Granata et al., 2018). The results indicate that a small amount of essential oil was lost during the production of the nanocapsules, and most of the OEO was encapsulated. Some authors have shown that the results of EE% of encapsulated essential oil for microcapsules of maltodextrin and gum arabic coated essential oil were around 99%, for orange oil the EE% values were higher than 98% (Bringas-Lantigua et al., 2011). High values of EE% are a desirable feature in the encapsulation technique because it increases the shelf life of the oil in the nanoparticles.

3.8 Temperature Stability

The stability of the optimized nanocapsules (OEONC) were evaluated in terms of the particle size, polydispersity and zeta potential during 120 days at 4 °C, 25 °C and 40 °C (Figure 8). It was observed that the formulations showed excellent stability properties, manifested by very small and generally insignificant changes ($p > 0.05$) in the size of the particles. Already values of zeta potential and PDI there was no statistically significant variation. Hussein and collaborators (2020), observed similar changes in their lipid nanocapsules of orange and eucalyptus oil.

In particular, the particle size distribution curves of the samples prepared and stored at 4 °C, 25 °C and 40 °C for 120 days have increased over the course of storage. This behavior

is called self-aggregation, mainly due to polymers, which does not alter its effect (Karam et al., 2020). In all experiments, the PDI values were less than 0.3 confirming an excellent homogeneity of the nanoformulations (Grillo et al., 2012). During storage, it was possible to observe a reduction in the positive values of the zeta potential. This was attributed to a small dominance in the positive CHI charges that are able to stabilize the nanoparticles by electrostatic attraction. The capacity of nanocapsules to retain essential oils, varying the time and conditions of storage, is an index of stability (Granata et al., 2018). The results showed that the nanoparticles maintained at 4 °C, 25 °C and 40 °C have high EO retention capacity, indicating high stability of the carrier system.

4. Conclusion

The nanoparticles loaded with oregano essential oil have been successfully prepared by complex coacervation, as confirmed by FTIR, TG, DSC techniques. The best chitosan/ gum arabic ratio for obtaining nanoparticles with smaller size and greater positive surface load was 1: 5. The optimized nanoparticles formulation was obtained with 450 mg of oregano essential oil, 659 µg of polymer (chitosan/ gum arabic 1:5) and 130 mg of tween 80. The OEONC were spherical shape with adequate size (around 300 nm) and positively surfaces charged (more than +30 mV). The nanosystem showed a high encapsulation efficiency and a good thermal stability during 120 days in temperature range between 4°C to 40°C. The results suggest that the encapsulation of oregano oil into gum arabic and chitosan nanoparticles by the complex coacervation technique could be applied in several fields, mainly in food preservation, and it is suitable to be used for encapsulation of thermally sensitive materials.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (process nº CAPES/PROEX 1734/2015), for the financial support and scholarship granted to the main author (ANDRADE, SCA); the Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco (process nº 23076.049914/2017-47) for financial support, FAPEAM (Research Support Foundation of the State of Amazonia) [Grant Code: 37343.UNI703.1052.10052018], the Laboratorio de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) and the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste for the availability of valuable infrastructure and collaboration.

References

- Abreu, F. O. M. S., Oliveira, E. F., Paula, H. C. B., Paula, R. C. M. **Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation**. Carbohydr. Polym. 89 (2012), pp. 1277–1282.
- Ali, A, Ahmed, S. **A Review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery** Int. J. Biol. Macromol., 109 (2018), pp. 273-286.
- Alvim, I. D., Grosso, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Food Science and Technology**, 30 (2010), pp.1069-1076.
- Andrade, S. C. A. et al. **Control of Rhizopus soft rot and quality responses in plums (*Prunus domestica* L.) coated with gum arabic, oregano and Rosemary essential oils**. Journal of Food Processing and Preservation, 41 (2017), pp.13251. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13251>
- Benjemaa, M., Neves, M.A., Falleh, H., Isoda, H., Ksouri, R., Nakajima, M. **Nanoencapsulation of *Thymus capitatus* essential oil: formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring**. Ind. Crops Prod., 113 (2018), pp. 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.062>

- Binsi P. K, Nayak N, Sarkar P. C, Jeyakumari A, Muhamed Ashraf P, et al. **Structural and oxidative stabilization of spray dried fish oil microencapsulates with gum Arabic and sage polyphenols: characterization and release kinetics.** Food Chem., 219 (2017), pp. 158–68.
- Burt, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review.** Int. J. Food Microbiol., 94 (2004), pp. 223-253.
- Butstraen, C. and Salaun, F. **Preparation of microcapsules by coacervation of gum arabic and chitosan.** Carbohydrate Polymers, 99 (2014), pp. 608-616.
- Campelo-félix, P. H., Souza, H. J. B., Figueiredo, J. A., Fernandes, R. V. B., Botrel, D. A., Oliveira, C. R., Yoshida, M. I., Borges, S. V. **Prebiotic carbohydrates: effect on reconstitution, storage, release, and antioxidant properties of lime essential oil microparticles.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65 (2017), pp. 445-45.
- Carneiro, H.C.F., Tonon, R.V., Grosso, C.R.F, Hubinger, M.D. **Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using diferente combinations of wall materials.** J. Food Eng., 115 (2013), pp. 443–451.
- Carvalho, I. T., Estevinho, B. N., Santos, L. **Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products-a review.** Int. J. Cosmetic Science., 38 (2016), pp. 109-119.
- Garenne, D., L. Beven, L. Navailles, F. Nallet, E. Dufourc, J.-P. Douliez, **Sequestration of proteins by fatty acid coacervates for their encapsulation within vesicles.** Angew. Chem., Int., 55 (2016), pp. 13475–13479.
- Ghasemi, S., Jafari, S.M., Assadpour, E., Khomeiri, M. **Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil.** Carbohydrate Polymers. 177 (2017), pp. 369–377.
- Granata, G., Consoli, G. M. L., Lo Nigro, R., Geraci, L. **Hydroxycinnamic acids loaded in**

- lipid-core nanocapsules.** Food Chemistry, 245 (2018), pp. 551-556.
- Grillo, R., dos Santos, N. Z. P., Maruyama, C. R., Rosa, A. H., de Lima, R., Fraceto, L. F. **Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation.** J Hazard Mater., 231 (2012), pp. 1-9.
- Hasani, S., Ojagh, S. M., Ghorbani, M. **Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: study on its physical and structural characteristics.** Int J Biol Macromol., 115 (2018), pp. 143-151.
- Honório, V. G, Bezerra, J., G.T. Souza, R.J. Carvalho, N.J. Gomes Neto, R.C.B.Q. Figueiredo, J.V. Melo, E.L. Souza, M. Magnani. **Inhibition of Staphylococcus aureus cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole.** Frontiers in Microbiology, 6 (2015), pp. 1223.
- Hosseini, S.F. Zandi, M. Rezaei, M., Farahmandghavi, F. **Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study,** Carbohydrate Polymers, 95 (2013), pp.50–56.
- Hosseini, S.F., Ramezanzade, L., Nikkhah, M. **Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate.** Int. J. Biol. Macromol. 105 (2017), pp.1455-1463.
- Hu, J., Zhang, Y., Xiao, Z., Wang, X. **Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules.** Industrial Crops & Products, 122 (2018), pp. 85–92.
- Medina-torres L., Santiago-adame R., Calderas F., Gallegos-infante J. A., Manero, O., **Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin.** Industrial Crops & Products, 90 (2016), pp.1–8.
- Nuisin, R. Kongsin, R. J. Noppakundilokrat, S. Kiatkamjornwong. **Microencapsulation of**

- menthol by crosslinked chitosan via porous glass membrane emulsification technique and their controlled release properties**, J. Microencapsul., 30 (2013), pp. 498–509.
- Perro A. et al. **Self-coacervation of ampholyte polymer chains as an efficient encapsulation strategy**. Journal of Colloid and Interface Science, 548 (2019), pp. 275–283.
- Qv, X.Y., Zeng, Z. P., Jiang, J.G. **Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability**. Food Hydrocolloids, 25 (2011), pp.1596-1603.
- Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiazzi, R.C., Nunes, M.R., Benvenuti, E.V. et al. **Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan**. Ind. Crops Prod., 46 (2013), pp. 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111669>
- Sansone, F., Mencherini, T., Picerno, P., D'amore, M., Aquino, R. P. Lauro, M. R. **Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts**. Journal of Food Enginsouzaineering, 105 (2011), pp. 468-476.
- Schmitt, C., Turgeon, S. L. **Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems**. Advances in Colloid and Interface Science, 167 (2011), pp. 63-70.
- Shah, B.D. Davidson, P. M., Zhong, Q., **Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk**. In. J. Food Microb., 161 (2013), pp. 53-59.
- Simon-Brown, K., Solval, K.M., Chotiko, A., Alfaro, L., Reyes, V., Liu, C., Dzandu, et al. **Microencapsulation of ginger (*Zingiber officinale*) extract by spray dryingtechnology**. LWT—Food Sci. Technol., 70 (2016), pp. 119–125.
- Sing, C. E. **Development of the modern theory of polymeric complex coacervation**. Adv. Colloid Interface Science, 239 (2017), pp. 2–16.
- Souza, G.T. et al. **Effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semihard cheese broth and**

- slurry**. Journal Food Protection, 79: 2 (2016), pp. 246-252.
- Tan, P.Y. Tan, H.W. Chang, B.T. Tey, E.S. Chan, O.M. Lai, B.S. Baharin, I.A. Nehdi, C.P. **Effects of storage and yogurt matrix on the stability of tocotrienols encapsulated in chitosan-alginate microcapsules**. Food Chem., 241 (2018), pp. 79-85.
- Peng, Y. and Li, Y.F. **Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films**. Food Hydrocolloid., 36 (2014), pp. 287-293.
- Tsai, R.-Y., Chen, P.-W., Kuo, T.-Y., Lin, C.-M., Wang, D.-M., Hsien, T.-Y., et al. **Chitosan/pectin/gum arabic polyelectrolyte complex: Process-dependent appearance, microstructure analysis and its application**. Carbohydrate Polymers, 101 (2015), pp. 752–759.
- Xavier-Junior et al. **Supramolecular interactions between β -lapachone with cyclodextrins studied using isothermal titration calorimetry and molecular modeling**. J. Mol. Recognit., 2646 (2017) pp. 3-10.
- Xu, W. R., Xie, W. J., Huang, X. Q., Chen, X., Huang, N., Wang, X., Liu, J. **The graphene oxide and chitosan biopolymer loads TiO₂ for antibacterial and preservative research**. Food Chem., 221 (2017), pp. 267-277.
- Wang, J. G., Li, Y. Z., Gao, Y. F., Xie, V., Zhou, M.H., He, Y.Y., et al. **Cinnamon oil-loaded composite emulsion hydrogels with Lantibacterial activity prepared using concentrated emulsion templates**. Ind. Crops Prod., 112 (2018), pp. 281-289.
- Weiss, J., Loeffler, M., Terjung, N. **The antimicrobial paradox: Why preservatives lose activity in foods**. Current Opinion in Food Science: Innovation in Food Science, Foodomics Technologies, 4 (2015), pp. 69-75.
- Zhu, Y., Liang, S., Chen, K., Gao, X., Chang, P. Tian, C., Huang, Y. **Preparation and properties of nanoencapsulated n-octadecane phase change material with**

organosilica shell for thermal energy storage. *Energy Conversion and Management*, 105 (2015), pp. 908-917.

Zu, Y.G., Zhao, Q. Zhao, X. H., Zu, S. C., Meng, L. **Process optimization for the preparation of oligomycin-loaded folate-conjugated chitosan nanoparticles as a tumor-targeted drug delivery system using a two-level factorial design method.** *Int. J. Nanomed.*, 63 (2011), pp. 429–3441.

Table 1. Design matrix for the Experimental Planning of the Box-Behnken type used to evaluate the influence of tree independent variables: oregano oil (X1), amount of chitosan and gum arabica in a ratio 1:5 (X2) and non-ionic surfactant (Tween 80) (X3) on the two dependent variables: particle size (Y1) and Zeta potential (Y2)

Independent variables	Levels		
	-1	0	+1
X1 (mg)	150	450	750
*X2 (mg)	600	900	1200
X3 (mg)	40	85	130
Dependent Variables	Limits		
Y1	minimum		
Y2	maximum		

* CHI/GA ratio, 1:5, varying the mass (mg) of the chitosan and the gum arabic to prepared 15mL of each solution.

Table 2. Compounds identified in the essential oil of *Origanum vulgare* L.

Peak	RT	Compounds	Concentration (%)
1	3.779	α -pinene	0.46
2	4.522	Myrcene	0.35
3	5.241	<i>p</i> -cymene	10.45
4	5.917	γ -terpinene	5.69
5	6.772	Linalol	1.47
6	10.775	Thymol methyl ether	0.50
7	12.265	Thymol	1.23
8	12.793	Carvacrol	78.82
9	16.384	β -caryophyllene	0.73
Total detected			99.70

Results expressed as a percentage (%) of the total area for constituents with a percentage area > 0.3 %.

Figure 1. Variation of particle size and Zeta potential of the chitosan solution (10 mg/mL) and the various concentrations of gum arabic (30, 35, 40, 45, 50, 60 mg/mL)

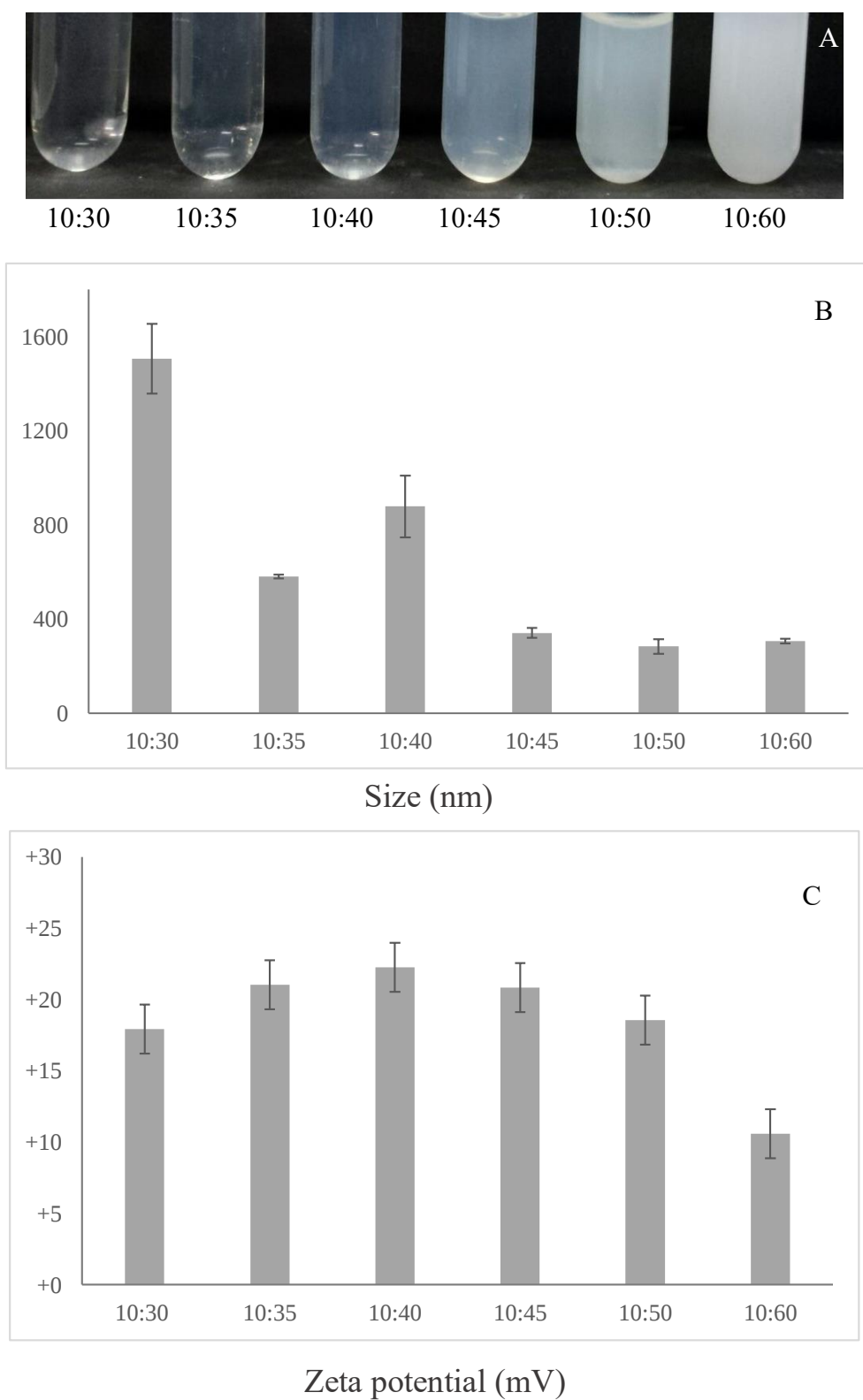


Figure 2. Pareto charts showing the effect of the independent variables on size and zeta potential of the oregano essential oil-loaded- chitosan-gum arabic nanocapsules.

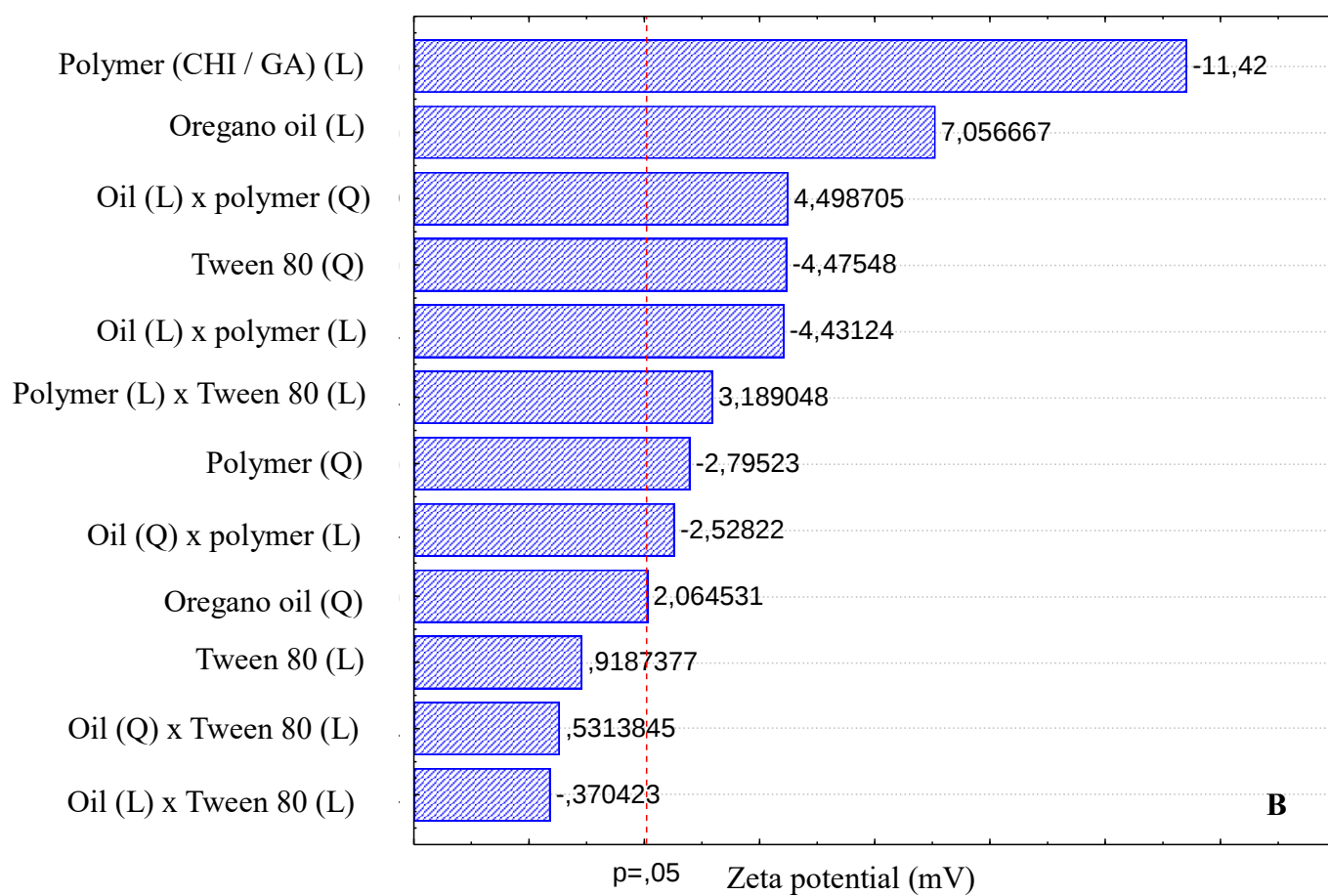
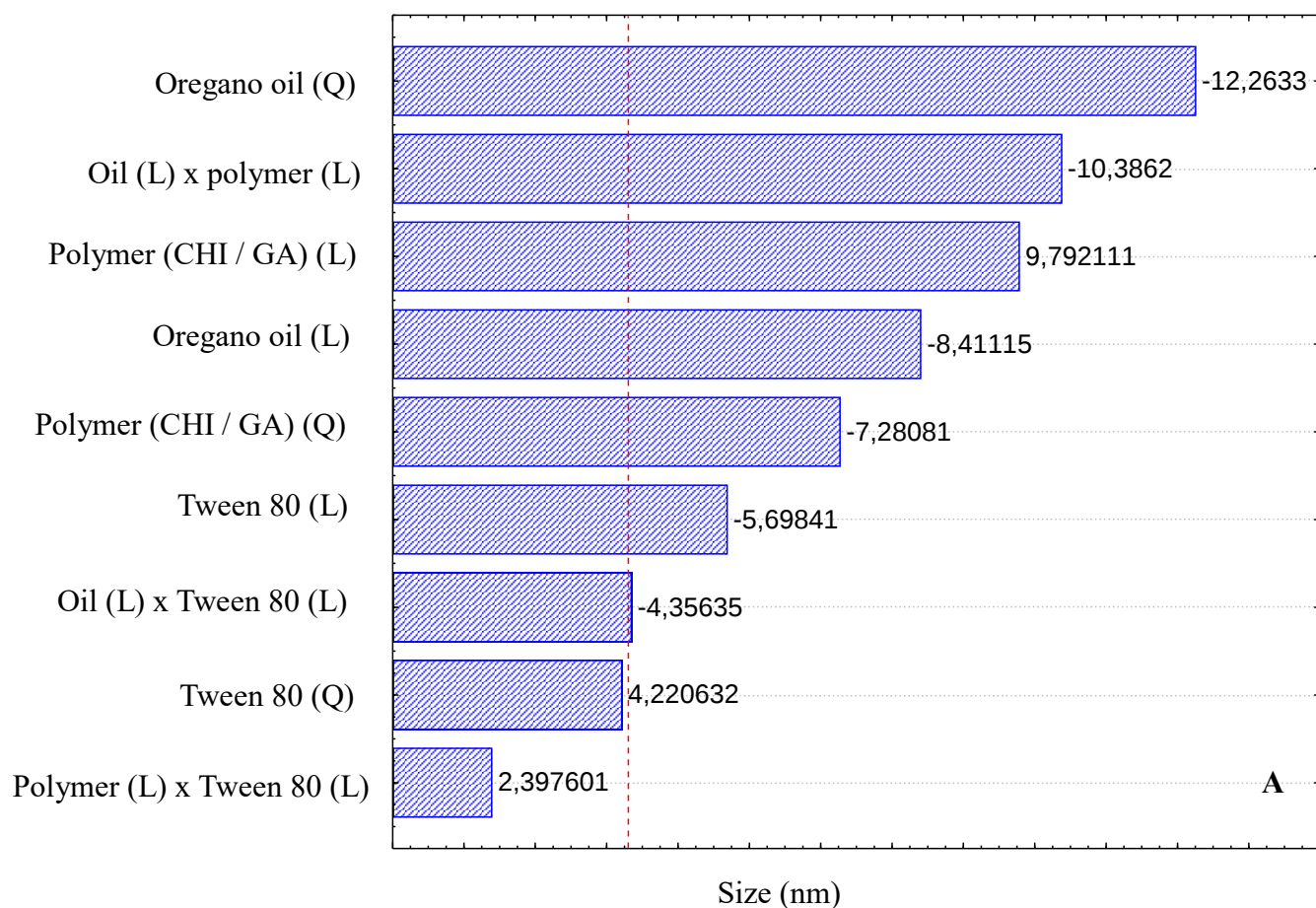


Figure 3. Response surface graph relating the size of the nanocapsule, under the effect of the (A) Polymer (chitosan/gum arabica) and Orégano (oregano essential oil), (B) Surfactant (Tween 80) and Oregano oil (oregano essential oil).

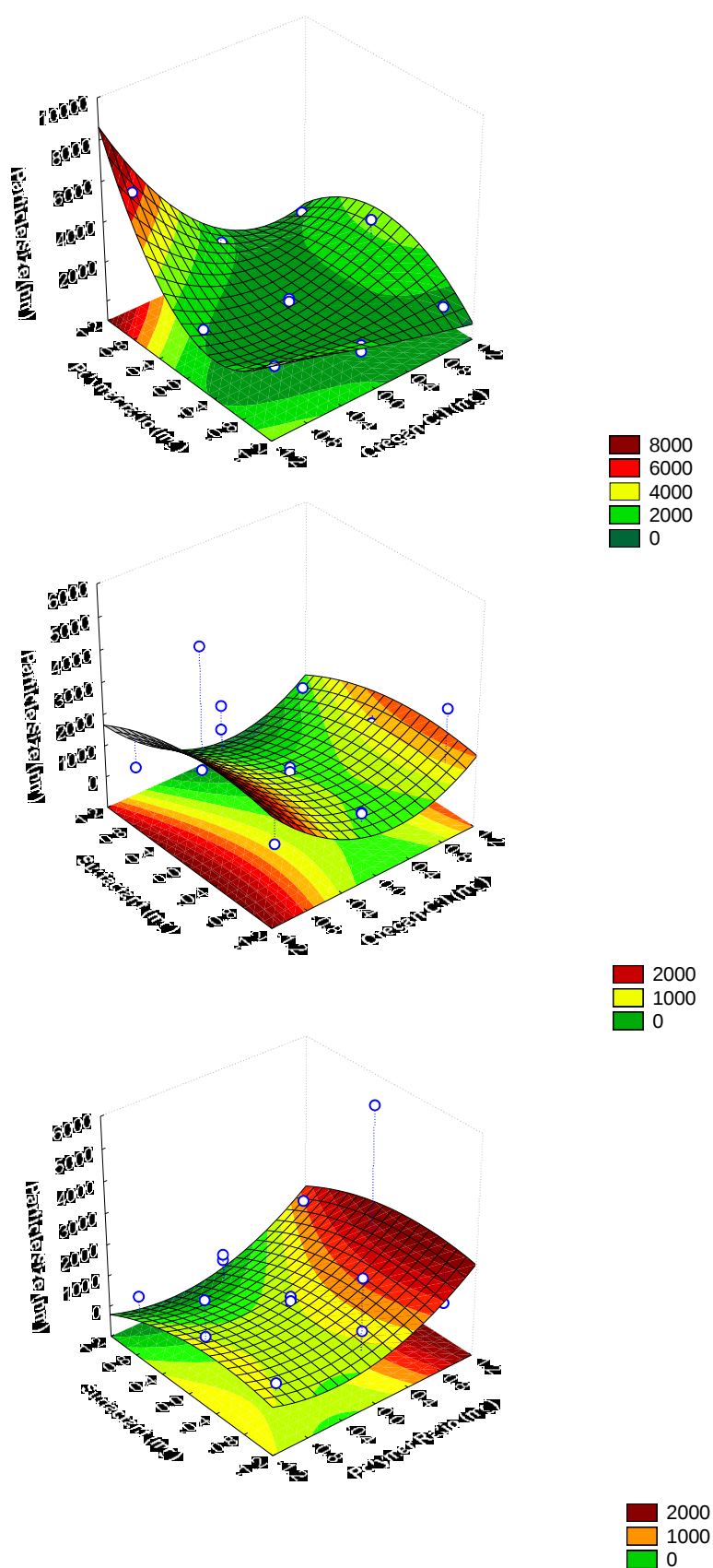


Figure 4. Response surface graph relating the Zeta potential, under the effect of the (A) Polymer (chitosan/ gum arabica) and oregano essential oil, (B) Surfactant (Tween 80) and Oregano essential oil.

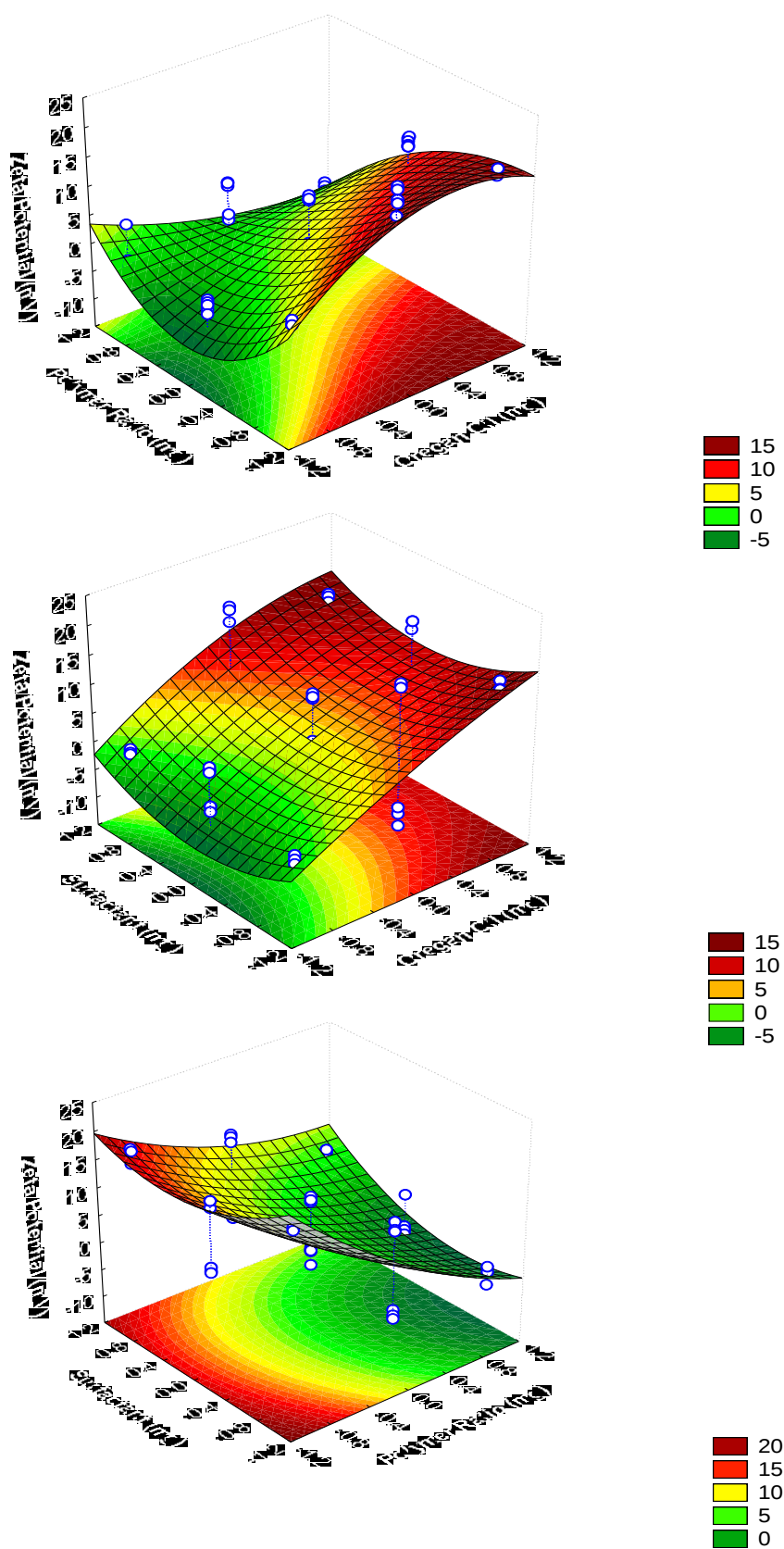


Figure 5. Scanning electron microscopy images ($\times 100$ (A) and $\times 30$ (B)) showing the morphology of oregano essential oil loaded chitosan- gum arabic nanocapsules.

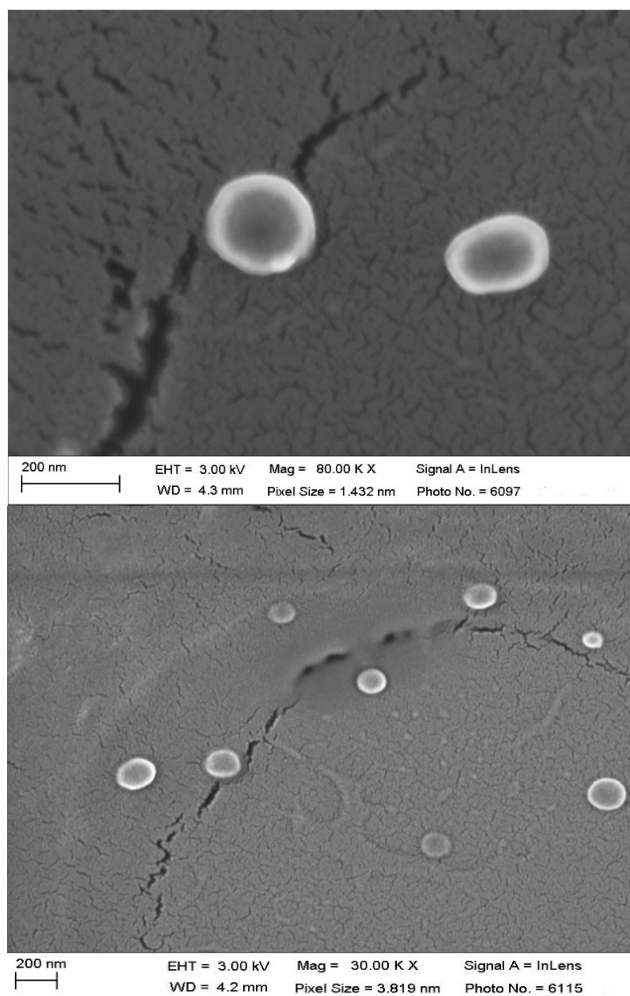


Figure 6. Atomic Force Microscopy measurements of nanocapsules (*Origanum Vulgare* essential oil (OEO)- loaded Chitosan (CHI)- Gum Arabic (GA) nanocápsules (OEONC).

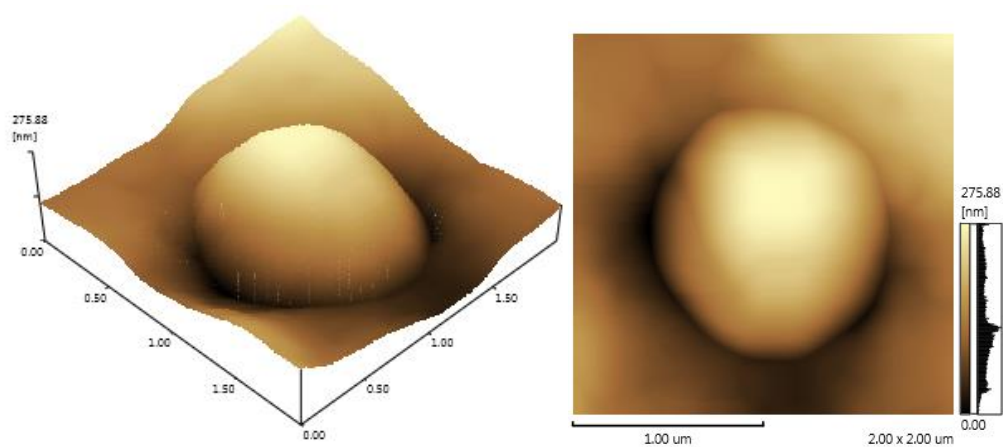


Figure 7. Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) of the OEONC: A- nanocápsules
B- gum Arabic and C- chitosan.

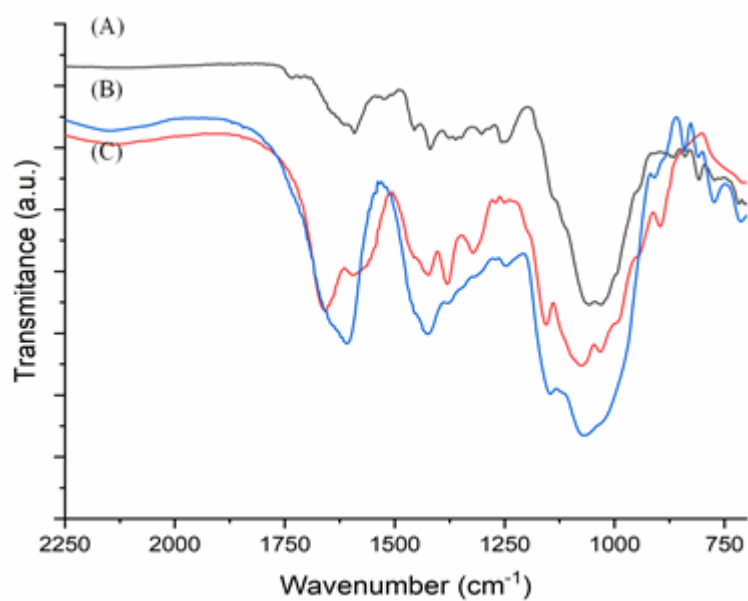


Figure 8. Thermogravimetric (TG) and Differential scanning curves of (DSC) of the OEONC: A- gum arabica, B- Nanocápsules and C- chitosan.

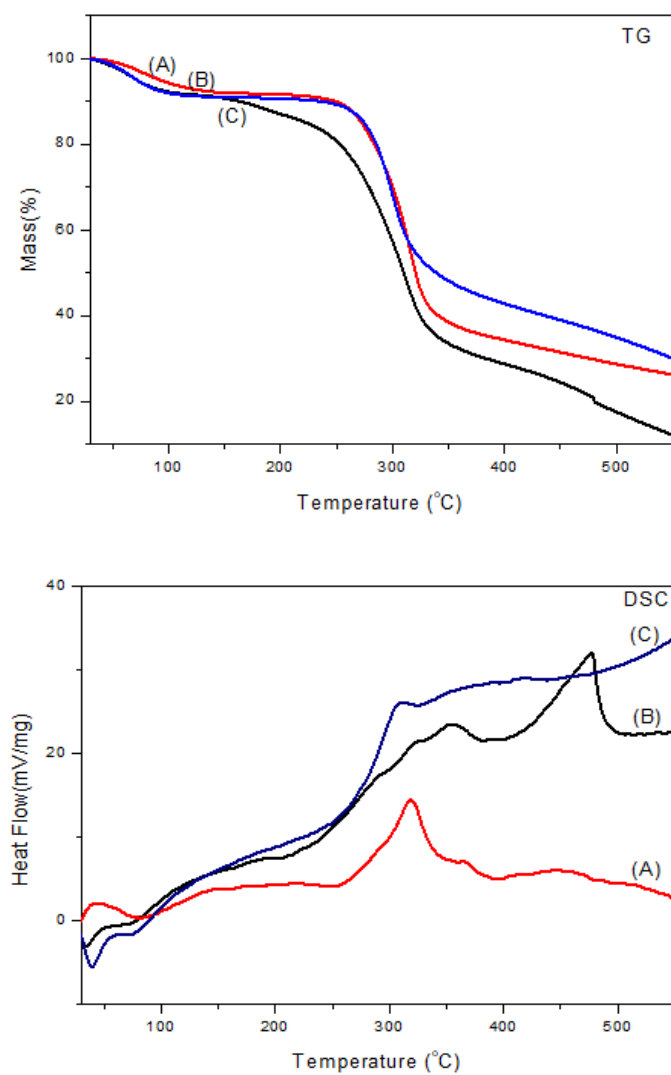
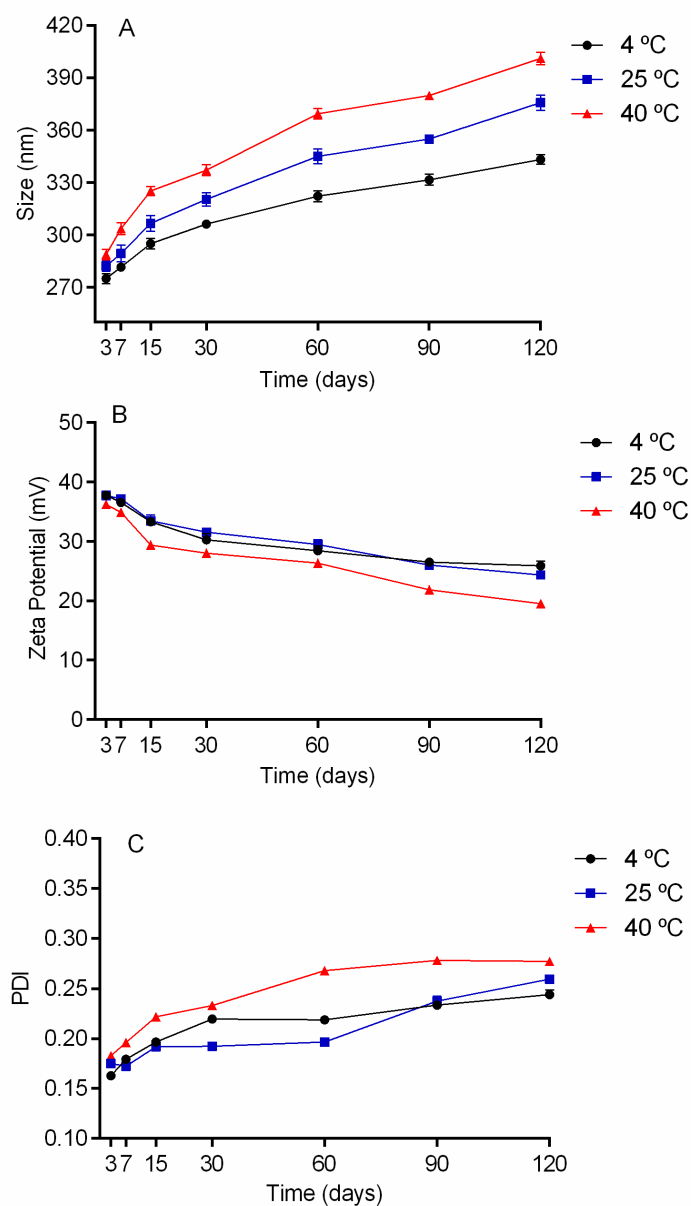


Figure 9. Values of size (A), Zeta Potential (B) and PDI (C) of nanocapsules stored at 4 °C, 25 °C and 40 °C for 4 months. Standard deviations are equal to or less than the size of the symbols.



**APENDICE B - ARTIGO: GC-MS METHOD FOR DOSING OF CARVACROL IN
OREGANO OIL: DEVELOPMENT AND VALIDATION**

Artigo a ser submetido a Journal of Chromatography A (Fator de Impacto 4,049)

GC-MS Method for Dosing of Carvacrol in Oregano Oil: Development and Validation

Sonalle Carolina Albuquerque de Andrade^{a,b}, Francisco Humberto Xavier Junior^{c,d}, Nereide

Stela Santos Magalhães^d, Marciane Magnani^e, Thayza Christina Montenegro Stamford^{a*}

^a Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, s/nº, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil

^b Laboratório de Microbiologia Aplicada, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, s/nº, 2º andar, Microbiologia e Imunologia, Cidade Universitária, CEP: 50.670-420, Recife, PE, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Potiguar (UnP), Campus Salgado Filho, Natal, RN 59075-000, Brazil

^d Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária. CEP: 52171-011, Recife, PE, Brasil

^e Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Campus I - Centro de Tecnologia - Bloco G, Cidade Universitária, CEP: 58051-970, João Pessoa, Brasil

*** Correspondence author:**

Thayza Christina Montenegro Stamford

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, s/nº, 2º andar, Microbiologia e Imunologia, Cidade Universitária, CEP: 50.670-420, Recife, PE, Brazil.

thayzastamford29@gmail.com / thayza.stamford@pq.cnpq.br.

Phone: 55 +8121268526; Fax: 55+8121268473

Abstract

A novel method is proposed to quantify carvacrol in oregano oil and nanocapsules containing oregano oil by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry. This is a fast, simple, and efficient method (with average analyte recoveries between 95 and 100%) capable of identifying, quantifying and validating all compounds that made up oregano essential oil, free and nanocapsulated. Chromatographic conditions were also optimized: an RTX-5MS column was employed, helium was the carrier gas at a flow rate of 0.99 mL / min and a temperature program was included, allowing the separation of the baseline from both compounds in less than 31 minutes. The method showed satisfactory sensitivity, specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantification for analyzes of carvacrol in oregano oil and in the nanocapsules containing the oil. The main compounds identified in oregano essential oil were carvacrol (78.82%), p-cymene (10.45%), γ -terpinene (5.69%), linalool (1.47%) and thymol (1.23%) were detected as the other major compounds. The proposed method is suitable for a reliable separation, identification and quantification of the present compound (carvacrol) in essential oil of oregano and nanocapsules containing the essential oil. It can be proposed as an analytical method for the analysis of carvacrol and after formulations that have incorporated it into their edible formulations.

Keyword: Bioactive compounds, monoterpene, gas chromatography-Mass spectrometry, method validation, encapsulation

Highlights

- Fast GC-MS method for the analysis of carvacrol, free and nanocapsulated was proposed.
- Simple, and sensitive GC/MS method for quantitative analysis of OEO and carvacrol.
- GC/MS validated to quantify the main compounds of OEO, free and encapsulated.
- GC/MS has been validated to identify carvacrol in OEO, free and encapsulated.

1.Introduction

Essential oils are volatile, natural and complex mixtures of various compounds; being produced by aromatic plants as secondary metabolites. The essential oil of oregano (*Origanum vulgare*), which belongs to the Lamiaceae family, is one of the most used oils since ancient times. Its properties are attributed to the presence of monoterpenes among which the carvacrol stands out (Castilho et al, 2012; Hosseini et al., 2013). Carvacrol, 2-methyl-5- (1-methylethyl) -phenol, is a monoterpene found in several aromatic plants being biosynthesized from γ -terpinene and p -cymene (Laothaweerungsawat et al., 2020). It is also known as isopropyl-o-cresol, 5-isopropyl-2-thymol or iso-thymol (De Vincenzi et al., 2004).

A significant number of biological effects have been described for oregano essential oil and carvacrol, for example, antimicrobial (Khan et al., 2017), vasorelaxant (Silva-filho et al., 2011), anti-inflammatory and antinociceptive, antithrombotic (Sharifi-Rad et al., 2018), anticancer (Khan et al., 2018), acetylcholinesterase inhibitor (Jukic et al., 2007), PPAR α and γ activator (receptor activated by peroxisome proliferation) (Hotta et al., 2010), and gastroprotective (Oliveira et al., 2014; Silva et al 2012).

The use of essential oil and carvacrol is quite limited because of their high volatile properties and easily decomposition during handling, heating, exposure to oxygen or ultraviolet light (Sahraee et al., 2017). For these reasons, essential oils and carvacrol need to be encapsulated / incorporated in materials that could take the form of films, coatings, emulsions and nanocapsules in order to preserve their bioactivity (Fernandez-Marin et al., 2020). Therefore, different polymeric matrices have been used, chitosan (CH), a polysaccharide from natural sources, has been proposed for use in several applications, such as wound healing and food packaging because of its special biocompatibility, antimicrobial and antibiofilm properties, as well as its versatility for be formulated in micro/nanoparticles, fiber or film and membrane (Kamdem et al., 2019).

Gum arabic is a remarkably effective encapsulating agent because of its colloid-stabilizing property. It produces stable emulsions with most oils over a wide pH range, constitutes a film visible to the oil interface and has good volatility retention, low viscosity and high solubility. In addition, arabic gum is compatible with most gums, starches, carbohydrates and proteins (Chawla et al., 2020). Mixtures of hydrophilic polymers are widely used in many pharmaceuticals and foods for the production of particles (Dalmoro et al., 2019). Therefore, these polymers can be associated with carvacrol in a food and pharmaceutical formulation due to its bioactive, biocompatible, and encapsulating properties which improves the stability of the compound to be carried. (Suntres et al, 2015).

The use and development of pharmaceutical and food products originating in natural sources require analytical methods capable of identifying and quantify these products in raw materials and final formulations (Xavier-Junior et al., 2017). Several techniques are available to analyze mixtures of compounds, phytoextracts, essential oils and their components (Bialon et al., 2019). Among several techniques, chromatography stands out for its performance in separation, identification and quantification when applied to the analysis of complex products (Marriott et al., 2012).

In this context, validated analytical methods are needed to accurately quantify the various compounds found in the oregano oil nanocapsule. The suggested method for carrying out qualitative and quantitative analyzes of natural and complex compounds such as nanocapsules, which have several fractions of different compounds, can be identified by gas chromatography - mass spectroscopy (GC-MS) especially if we consider carvacrol. High performance gas chromatography (GC-MS) methods for separating and determining the carvacrol contained in several essential oils have been reported in the literature (Oliveira et al, 2017; Ares, Nozal, Bernal, 2020). However, there are still no studies that report the analysis of this compound in complex matrices, including biopolymers. GC-MS, a simple and efficient

method, can be an appropriate analytical tool to perform carvacrol analysis at low cost with high reproducibility.

Thus, the objective of the present work was to develop and validate a simple, fast, specific, and sensitive GC-MS method for quantifying carvacrol associated with oregano essential oil (*origanum vulgare* L.), free and nanoencapsulated with chitosan and gum arabic. The method was investigated to be applied to determine the solubility of carvacrol in oregano oil.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Carvacrol and low molecular weight chitosan was purchased from Sigma-Aldrich (Brazil) LTDA. Oregano oil (*origanun vulgare* L.) was purchased from Ferquima (Vargem Grande Paulista, SP, Brsil). Ethyl acetate from Merck (Brazil). Gum arabic was purchased from Synth (Brazil). Ultra-pure water was obtained from a Millipore purification system (Milli-Q® plus, Millipore, St Quentin in Yvelines, France) with resistivity and total organic carbon of 18.2 MQ at and 3 ppm at 25, respectively.

2.2 Chromatographic equipment and conditions

The identification of carvacrol, the constituents of the essential oil of oregano and the nanocapsule was carried out by gas chromatography coupled with mass spectrometry - GC-MS (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). GC-MS analysis was performed under the following conditions: RTX-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm). Chromatographic parameters for the analysis of carvacrol and oregano essential oil are described in Table 1. The injected volume for all samples was 1 µL. The division ratio was 1:25 and the electron ionization system was adjusted to 70 eV. Helium was the carrier gas being adjusted to 0.99 mL

/ min. Data acquisition and integration were performed using Openchrom software. The GC / MS, NIST / EPA / NIH spectral mass database (Version 1.7) was used to identify the constituents of the individual essential oils. The quantification of the components was obtained by normalizing the areas of each detected constituent, and was expressed as a percentage of area (%) (Barbosa et al., 2016).

2.3 Validation Methods

The validation of the chromatographic method was performed according to the validation guidelines of the ICH (International Conference on Harmonization (ICH) (2005) for specificity / selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). Validation tests followed good manufacturing practices and all volumetric glassware and equipment were evaluated and calibrated before analysis. The scale (Sartorius Analytical Balance MSA-224S-OOO-DU Cubis, Elk Grove, USA) was calibrated to a minimum of 0.1 mg, three individual 10 mg stock solutions of carvacrol were prepared in ethyl acetate, placed in an airtight amber bottle and stored at -20 °C until use. Concentrations ranging from 5 to 25 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ (5, 10, 15, 20 and 25 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) were prepared and used for validation analyzes.

2.4 Specificity / Selectivity

The specificity and selectivity of the analytical method were confirmed by injecting solutions containing 100% of the normal amount of carvacrol work. These analyzes were repeated six times. The ability to separate all compounds, and to have no chromatographic interference from the standard samples, was analyzed.

2.5 Linearity

Carvacrol calibration curves were prepared by injecting standard solutions of 5 to 25

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ (5, 10, 15, 20 and 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The secondary solutions were prepared by appropriate dilution of the standard carvacrol solutions to a final volume of 1 ml and containing 10 mg of oregano essential oil. The peak area of the standards was plotted graphically in relation to the analyte concentrations. The standard calibration curves for carvacrol and OEO were developed by calculating the regression line using the least squares method. The linearity curves were performed on three different days.

2.6 Determination of the limit of detection and quantification

Limit of detection (LOD) was determined based on the ratio between the standard deviation of the response and the slope estimated from the calibration curve of the standards multiplied by 3.3. The limit of quantitation (LOQ) was determined as the lowest amount of analyte that was reproducibly quantified. This parameter was calculated by the ratio of the standard deviation of the response and the slope of the calibration curve of the standards multiplied by 10.

2.7 Accuracy

The accuracy of the CG-MS method was demonstrated by the percentage of deviation. Accuracy was determined by six repetitions of carvacrol concentrations (ranging from 5 to 25 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$) in 1 mL of ethyl acetate. The concentrations found were obtained by replacing the peak response ratios of the carvacrol solutions from the concentrations added to a derived regression equation. The concentrations found and added were then used to determine the absolute percentage of deviation in each concentration of carvacrol contained in the oregano oil.

2.8 Precision

The accuracy of the method was assessed by analyzing the intra and inter-day variability of the carvacrol samples. Intra-day precision was determined by quantifying the samples of carvacrol in three different concentrations (5, 15 and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The samples were injected six times and prepared in one day. The inter-day precision was evaluated separately from the peak areas obtained by injecting the same three concentrations of the phytoconstituent on different days. Inter- and intra-day precision were expressed as the relative standard deviation (% RSD).

2.9 Statistical analyses

All experiments were conducted in triplicates. All values were expressed as their mean and standard deviation. Means of two groups were compared using non-paired Student's t-tests. When comparing multiple groups, one-way analysis of variance was applied with the Tukey multiple comparison procedure. The statistical data were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

Many studies involving the composition of essential oils have shown that there is a great diversity of volatile substances present in these samples, which makes it difficult to separate and identify the compounds of interest (Castellar et al., 2014; Ulukanli et al., 2014) Thus, the use of gas chromatography has been shown to be an important tool due to its practicality and high efficiency in distinguishing between components of synthetic and natural essential oil in mixtures, separation of complex samples, especially when it is associated with detectors, such as the mass spectrometer (Jiménez -Salcedo et al., 2017; Falaki, 2019).

3.1 Identification of OEOV constituents

The development and validation of a GC-MS method for the quantification of carvacrol

in a complex plant matrix from the oil of *Origanum Vulgare* L. was carried out. The chromatographic conditions were developed to obtain a routine analysis of carvacrol in oregano essential oil, with high reproducibility and sensitivity, combined with a simple, fast and economical analytical method. Previous studies have shown that oregano essential oil is composed of a mixture of constituents, whose main compounds identified were carvacrol (77.54%), p-cymene (13.96%), terpinene (3.29%) and thymol (3.02%). However, oregano oil had 11 different compounds, including camphene (0.07%), terpinol (0.07%), carene (0.64%), isotimol (0.16%) and karyophyllene (0.61%) (%). Similar levels of the manjoritar compounds have been found by other studies (Cariri et al., 2019; Dogruyol et al., 2020).

3.2 Method validation

The validation of the method was based on the ICH (International Conference on Harmonization (ICH) (2005). Basic, but efficient chemometric statistical tools from Excel (Microsoft Office 2016, Microsoft Corporation, Redmond, WA), were used to analyze the data for validation of the method.

3.3 Selectivity

The specificity / selectivity of the method was confirmed through the analysis of solutions containing concentrations ranging from 5 to 25 $\mu\text{g/mL}$ of the phytoconstituent worked and the known quantity of samples of essential oil of oregano and nanocapsules containing the oil (Figure 1). The chromatograms showed good resolution and separation of carvacrol from other peaks attributed to the compounds present in the essential oil of oregano. There was no statistically significant difference between the chromatogram areas of the samples containing essential oil of oregano and nanocapsules compared to the chromatogram obtained only from carvacrol. The maximum purity values for carvacrol in the chromatograms were in the range of

0.996 to 1.0. These results indicated that the peaks were homogeneous, with a retention time of 12.5 ± 0.2 min, and showed a significant capacity to separate the carvacrol from the complex mixture of oregano oil and nanocapsule. The use of the mass detector provides good selectivity for the method, which improves the sensitivity and selectivity of the detection.

3.4 linearity

The linearity result showed an effective result in the concentration range of 5 to 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$, this concentration was chosen to carry out the subsequent experiments (Figure 2). Linearity is expressed by the correlation coefficient of the analytical curve, as shown in figure 2. The equation of the line, determined by the least squares method, obtained as a result: $y = 21,346x + 9.5120$, where x was the concentration in $\mu\text{g} / \text{mL}$ and y in the area both obtained by GC - MS, with a correlation coefficient (R^2) equal to 0.9976. This coefficient is a parameter that allows estimating the quality of the obtained curve, since values greater than 0.99 indicate the existence of a linear response in the concentration range worked (FDA, 2001). Thus, the results found demonstrate that the analytical curve can be used to quantify samples containing carvacrol, giving validity to the method according to linearity

3.5 Limits of detection and quantification

As for the limit of detection (LOD) and quantification (LOQ), the method presented an LOD value of 0.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and an LOQ of 0.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Demonstrating satisfactory limits, as the results were lower than the lowest concentration used in the construction of the linearity curve (5 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

3.6 Precision

The accuracy of carvacrol was 99 to 102%, with an RSD value of 3.59%. Precision was

estimated by intra-day (repeatability) and inter-day precision. Intra-day precision was investigated by injecting triplicate samples of carvacrol solutions in three different concentrations (5, 15 and 25 µg/mL). Inter-day precision was determined by evaluating the repeatability of the analytical method, if reproduced in the same laboratory, but on another day. The results obtained for the intra and inter-day precision studies are shown in Table 2. Based on these results, the method was considered satisfactory, with low random errors ($P < 0.05$).

4 Conclusion.

The compounds present in oregano essential oil and nanocapsules were identified by GC/MS analysis. The elution profile of the compounds was consistent among the materials analyzed in the GC/ MS. The GC / MS method that was developed and validated following the ICH and FDA guidelines is fast, simple and accurate.

As shown in this work, the method can be applied to quantify carvacrol, oregano essential oil and nanocapsules containing oregano oil. Due to reproducible relationships between the peak given by carvacrol and peaks given by other compounds present in a percentage above 0.1%, the method can be applied to determine the composition of the oil extracts that contain this component (carvacrol).

The methods developed in the present work can be proposed to obtain quality control analysis of different products containing carvacrol with a qualitative and quantitative analytical basis. It must be suitable to control that carvacrol does not change while it is incorporated in food formulations for example.

References

A. Ben Arfa, S. Combes, L. Preziosi-Belloy, N. Gonterd, P. Chalier. **Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure.** Lett. Appl. Microbiol., 43 (2006), pp. 149-154.

A. Nostro, T. Papalia. **Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives.** Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov., 7 (2012), pp. 28-35.

A. Castellar, R. F. Gagliardi, E. Mansur, H.R. Bizzo, A. M. Souza, S. G. Leitaó. **Volatile constituents from in vitro and ex vitro plants of *Petiveria alliacea* L.** Journal of Essential Oil Research, 26 (2014).

A. Dalmoro, S. Bochicchio, G. Lamberti, P. Bertoncin, B. Janssens, A.A. Barba. **Micronutrients encapsulation in enhanced nanoliposomal carriers by a novel preparative technology.** RSC Adv., 9 (2019), pp. 19800-19812.

A.M. Ares, M.J. Nozal, J.L. Bernal, J.J. Bernal. **Simultaneous determination of carvacrol and thymol in bee pollen by using a simple and efficient solvent extraction method and gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Pharmaceutical and Biomed. Analysis, 181 (2020), pp. 113-124.

D. Bimczok, H. Rau, E. Sewekow, P. Janczyk, W. B. Souffrant, H.J. Rothkotter. **Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro.** Toxicol. In Vitro 22, (2008), pp. 652–658.

D. P. Kamdem, Z. Shen, O. Nabinejad. **Development of biodegradable composite chitosan-based films incorporated with xylan and carvacrol for food packaging application.** Food Packaging and Shelf Life, 21, 2019.

E.M. Sharifi-Rad, M. Varoni, M. Iriti, W.M. Martorell, M. Setzer, B. Del Mar Contreras, A. Salehi, S. Soltani-Nejad, M. Rajabi, J. Tajbakhsh, Sharifi-Rad. **Carvacrol and human**

health: a comprehensive review. Phytother Res., 32 (2018), pp. 1675-1687.

F. Falaki. **Sample Preparation Techniques for Gas Chromatography.** In Gas Chromatography—Derivatization, Sample Preparation, Application; IntechOpen: London, UK, 1–30, 2019.

F.H. Xavier-Junior, A. Maciuk, A. Rochelle Do Vale Morais, E.D.N. Alencar, V. L. Garcia, E.S. Tabosa Do Egito, C. Vauthier. **Development of a gas chromatography method for the analysis of copaiba oil.** Journal of chromatographic science, 55 (2017), pp. 969-978.

F.V. Silva, A. G. Guimaraes, E. R.S. Silva, B. P. Sousa-Neto, ..., Oliveira, Rita C.M. Oliveira. **Anti-Inflammatory and Anti-Ulcer Activities of Carvacrol, a Monoterpene Present in the Essential Oil of Oregano.** J. Med Food 15, (2012), pp. 984–991.

Food and Drug Administration., Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation 2001.

H. Dogruyol, Mol, S., Cosansu, H. **Increased thermal sensitivity of *Listeria monocytogenes* in sous-vide salmon by oregano essential oil and citric acid.** Food Microbiology. 90, 2020.

I. Khan, A. Bahuguna, P. Kumar, V.K Bajpai, S.C Kang. **In vitro and in vivo antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis.** Sci. Rep., 8 (2018), pp. 144.

I.Khan, A. Bahuguna, P Kumar, V.K. Bajpai, S.C Kang. **Antimicrobial potential of carvacrol against uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption,**

depolarization, and reactive oxygen species Generation. Front. Microbiol., 8 (2017) pp. 2421- 2434.

I.M. Barbosa, J. Medeiros, K. Oliveira, N. Gomes-Neto, J. Tavares, M. Magnani, E.L. Souza. **Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella Enteritidis in leafy vegetables.** Food Control, 59 (2016) pp. 468-477.

ICH. Validation of analytical procedures: Text and Methodology, ICH- Q2 (R1): Geneva, 2005.

J.C. Silva-Filho, N.N. Oliveira, D.D. Arcanjo, L.J. Quintans-Júnior, S.C. Cavalcanti, M.R. Santos, R.C. Oliveira, A.P. Oliveira. **Investigation of mechanisms involved in (□)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta.** Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 110 (2012), pp. 171–177.

L. Keawchaoon, R. Yoksan. **Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles.** Colloid. Surf Biointerfaces 84 (2011) pp. 163–171.

M. Bialon, T. Krzyśko-Łupicka, E. Nowakowska-Bogdan, P.P. Wieczorek. **Chemical Composition of Two Different Lavender Essential Oils and Their Effect on Facial Skin Microbiota.** Molecules. 24 (2020), pp. 3270-3283.

M. De Vincenzi, A. Stamatii, A. De Vincenzi, M. Silano. **Constituents of aromatic plants:**

carvacrol. *Fitoterapia*, 75 (2004), pp. 801-804.

M. Hotta, R. Nakata, M. Katsukawa, K. Hori, S. Takahashi, H. Inoue. **Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppress COX-2 expression**. *J Lipid Res.* 51 (2010), pp. 132-139.

M. Jukic, O. Politeo, M. Maksimovic, M Milos. ***In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone**. *Phytother. Res.* 21 (2007), pp. 259–261.

M.L. Cariri, A.N.F. de Melo, L. Mizzi, A.C. Ritter, E. Tondo, E.L. de Souza, ..., M. Magnani. **Quantitative assessment of tolerance response to stress after exposure to oregano and rosemary essential oils, carvacrol and 1,8-cineole in *Salmonella* Enteritidis and its isogenic deletion mutants Δdps , $\Delta rpoS$ and $\Delta ompR$** . *Food Research International*, 122 (2019), pp. 679-687.

N. Laothaweerungsawat, J. Sirithunyalug, W. Chaiyana. **Chemical Compositions and Anti-Skin-Ageing Activities of *Origanum vulgare* L. Essential Oil from Tropical and Mediterranean Region**. *Molecules*, 25 (2020), pp. 5-18.

P. Chawla, N. Kumar, A. Bains, S.B Dhull, M. Kumar, R. Kaushik, S. Punia. **Gum arabic capped copper nanoparticles: synthesis, characterization, and applications**. *Int J Biol Macromol* 146 (2020), pp. 232–242.

P.C. Castilho, T. S. Savluchinske-Feio, Weinhold, S. C. Gouveia. 2012. **Evaluation of the**

antimicrobial and antioxidante activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. Food Control 23 (2012), pp. 552–558.

P.J. Marriott, S.T Chin, B. Maikhuntho, B., Schmarr, H.-G., Bieri, S.; **Multidimensional gas chromatography.** Trends in Analytical Chemistry, 34 (2012), pp. 1–21.

R. Fernandez-Marin, J. Labidi, M.A Andres, S.C.M. Fernandes. **Using α -chitin nanocrystals to improve the final properties of poly (vinyl alcohol) films with *Origanum vulgare* essential oil.** Polym Degrad Stab (2020).

S. Hosseini Fakhreddin, M. Zandi, M. Rezaei, F. Farahmandghavi **Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles : preparation , characterization and in vitro release study.** Carbohydr. Polym., 95 (2013), pp. 50-56.

S. Sahraee, J.M. Milani, B. Ghanbarzadeh, H. Hamishehkar **Lwt - food Science and Technology Effect of corn oil on physical , thermal , and antifungal properties of gelatin-based nanocomposite films containing nano chitin.** LWT - Food Sci. Technol., 76 (2017), pp. 33-39.

Y. Shoji, H. Nakashima. **Nutraceuticals and delivery systems.** J. Drug. Target 12 (2004), pp. 385–391.

Z. E. Suntres, J. Coccimiglio, M. Alipour. **The bioactivity and toxicological actions of carvacrol.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 55 (2015), pp. 304-318.

Z. Ulukanli, S. Karabörklü, F. Bozok, B. Ates, S. Erdogan, M. Cenet, M.G Karaaslan.

Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. Chin. J. Nat. Med., 12 (2014), pp. 901-910.

Table 1. Chromatographic parameters for analysis of carvacrol, essential oil of oregano and nanocapsules by GC/MS.

Parameters	Essential oil
Oven initial temperature	80 °C
Ramp rate 1	4 °C.min ⁻¹
Oven final temperature 1	160 °C
Ramp rate 2	20 °C.min ⁻¹
Oven final temperature 2	300 °C
Final hold	300 °C for 5 min
Injector	220 °C
Detector	250 °C

Figure 1. Representative GC/MS chromatograms of the (A) carvacrol; (B) oregano oil (C) nanocapsule.

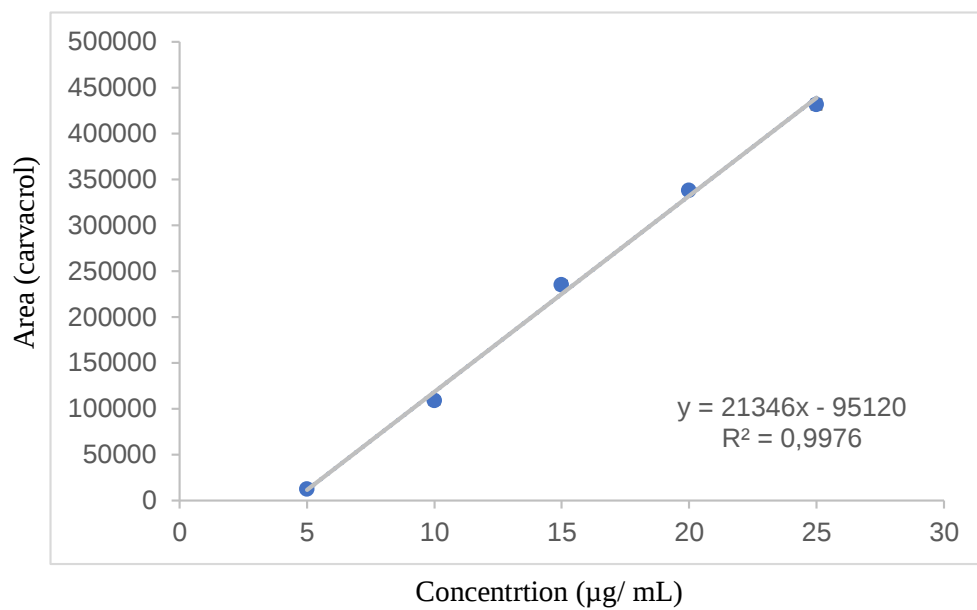


Figure 2. Analytical curve of carvacrol showing linear regression.

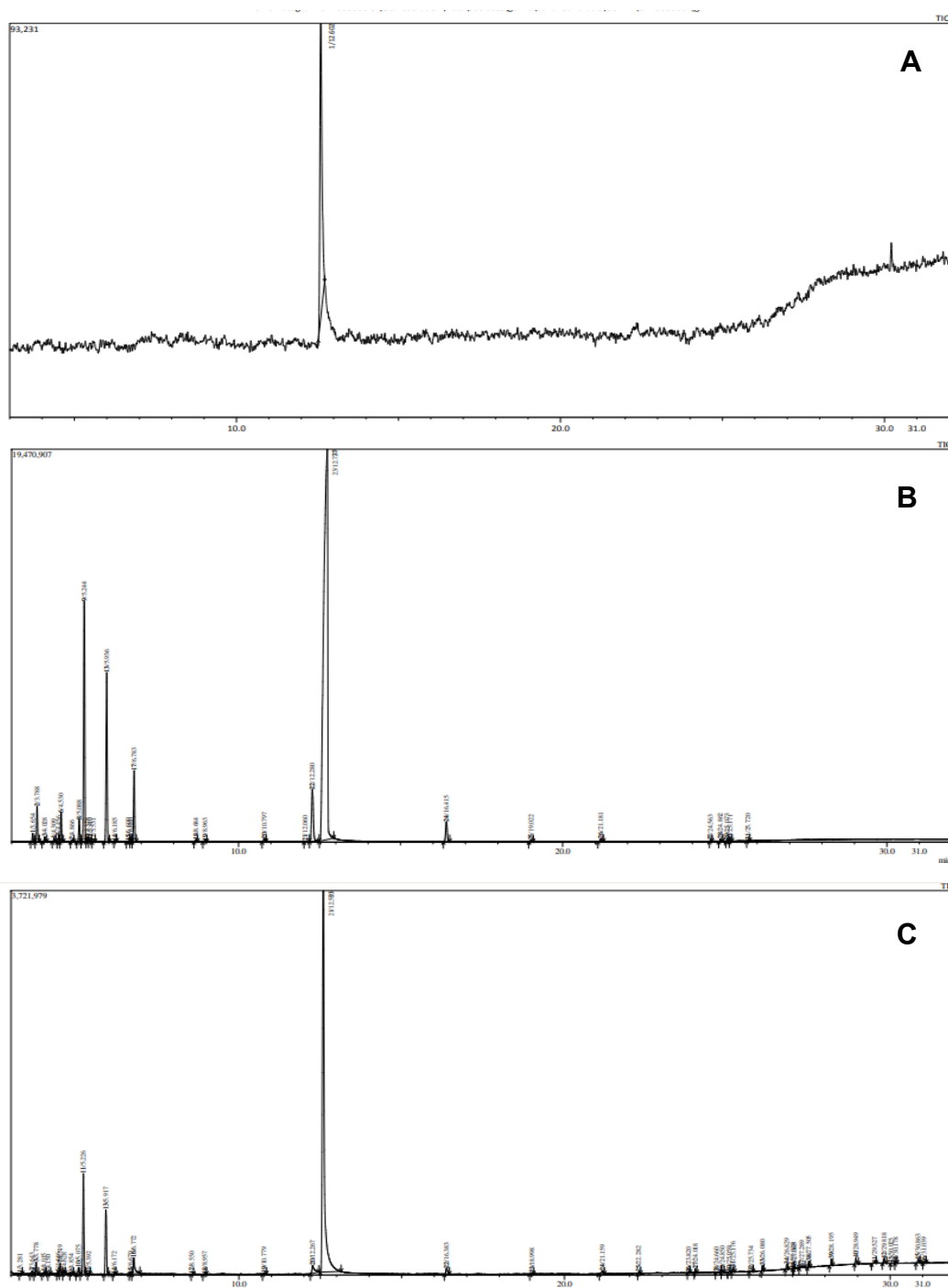


Table 2. Intra and Inter-day Variations of carvacrol by GC/MS.

Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Carvacrol		
	Measured concentration		
	Mean ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	SD	RSD (%)
Intra-day variation			
5	5	0,05	1
10	15,2	0,16	1,06
25	24,7	0,26	1,04
Inter-day variation			
5	5	0,05	0,95
10	15,5	0,18	1,22
25	24,7	0,26	1,06

Values are for n= 3 observations