

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO COM LECITINA DE SOJA FRENTE A *Salmonella* spp. E *Listeria monocytogenes*

ISABELA TAVARES DE OLIVEIRA<sup>1</sup>; TAMIRES SOARES SCHUG<sup>2</sup>;

ELIEZER AVILA GANDRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – isabela.tavares.oliveira111@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – tamireschug@gmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

A segurança dos alimentos é um tema de crescente relevância para a saúde pública e para a economia global, devido à alta incidência e os impactos das doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Entre os principais agentes etiológicos, destacam-se *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, bactérias capazes de causar surtos significativos e apresentar alta taxa de mortalidade, especialmente em populações vulneráveis (GUO et al., 2020). Além disso, a crescente resistência antimicrobiana tem estimulado a busca por alternativas naturais para o controle microbiano em produtos alimentícios (YANG et al., 2022).

Nesse contexto, os óleos essenciais se destacam por sua ampla gama de compostos bioativos, capazes de exercer ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), rico em timol e carvacrol, apresenta reconhecida eficácia na inibição de patógenos alimentares, embora sua aplicação direta em alimentos enfrente limitações como volatilidade, baixa solubilidade em água e possível impacto nas características sensoriais do alimento (GUO et al., 2020).

Uma estratégia promissora para superar essas limitações é a formulação de nanoemulsões, sistemas coloidais que aumentam a estabilidade, a biodisponibilidade e a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais, além de interferir menos nas características sensoriais quando comparado a inclusão direta de óleos essenciais. Entre os emulsificantes disponíveis, a lecitina de soja é um surfactante natural, biodegradável e seguro para uso alimentar, capaz de formar nanoemulsões estáveis com potencial de aplicação em produtos alimentícios (YANG et al., 2022).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de nanoemulsões de óleo essencial de tomilho, formuladas com lecitina de soja como surfactante, frente às bactérias *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

### 2. METODOLOGIA

O óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris* L.) foi adquirido comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, acondicionado em frasco âmbar lacrado com volume de 100 mL. O óleo de girassol e a lecitina de soja foram obtidos no comércio local da cidade de Pelotas-RS.

Demais reagentes analíticos necessários para as análises foram de grau reagente e adquiridos em fornecedores certificados.

### **Preparação das nanoemulsões de óleo essencial de tomilho**

As nanoemulsões foram preparadas no Laboratório de Ciência e Microbiologia de Alimentos (LACIMA) da Universidade Federal de Pelotas. A fase oleosa da nanoemulsão foi composta por óleo essencial de tomilho (5% m/m) e óleo de girassol (5% m/m), totalizando 10% (m/m) de fase oleosa dispersa na fase aquosa (90% m/m), composta por água Milli-Q e lecitina de soja utilizada como surfactante, em concentração de 1% (m/m). Foram preparadas três formulações diferentes. Primeiramente, a fase aquosa foi obtida por homogeneização da lecitina de soja em água Milli-Q utilizando agitador magnético por 10 minutos. Em seguida, a fase oleosa foi pesada e incorporada à fase aquosa, sendo a mistura pré-homogeneizada em Ultra-Turrax (modelo IKA T18 Digital; 60 Hz; 500 W) a 20.000 rpm por 3 minutos. Posteriormente, as emulsões foram submetidas à sonicação ultrassônica (modelo VCX 750; 20 kHz; 750 W), com amplitude de 40%, durante tempos variáveis de 5 (L1), 7(L2) e 10 (L3) minutos, para redução do tamanho das gotículas e obtenção das nanoemulsões. A metodologia foi adaptada com base nas recomendações de Guo et al. (2020) e Yang et al. (2022), com modificações.

### **Atividade antimicrobiana de nanoemulsões de óleo essencial de tomilho**

A atividade antimicrobiana das nanoemulsões foi avaliada por meio de duas metodologias fenotípicas: difusão em ágar e micro-atmosfera, utilizando cepas padrão de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. O inóculo bacteriano foi padronizado para concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

#### **Teste de difusão em ágar**

O teste foi realizado conforme o protocolo do Manual of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com pequenas modificações. Solução salina contendo o inóculo foi distribuída com swab estéril sobre placas de ágar Müller-Hinton. Poços com aproximadamente 6 mm de diâmetro foram perfurados nas placas, onde foram adicionados 20  $\mu$ L das nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, os halos de inibição foram medidos em centímetros, e os resultados foram registrados.

#### **Teste de micro-atmosfera**

A avaliação da atividade antimicrobiana em micro-atmosfera seguiu a metodologia proposta por Ghabraie et al. (2016), com adaptações. Alíquotas de 0,1 mL das suspensões bacterianas foram inoculadas na superfície de placas contendo ágar Müller-Hinton. Discos de papel estéreis (4 x 4 cm) foram posicionados na tampa das placas, sobre os quais foram adicionados volumes de 100  $\mu$ L e 50  $\mu$ L da nanoemulsão. As placas foram imediatamente fechadas invertidas (tampa para baixo) e incubadas a 37 °C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi expressa

pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos em comparação com o controle negativo contendo água destilada estéril.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antimicrobiana das nanoemulsões de óleo essencial de tomilho, pela técnica de difusão em ágar, revelou que todas as formulações apresentaram ação inibitória frente a *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, embora com variações na magnitude dos halos (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de nanoemulsões de óleo essencial de tomilho por difusão em ágar.

Formulação	Halos de inibição (cm)	
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>L1</b>	1,95 ± 0,1	2,68 ± 0,6
<b>L2</b>	0,95 ± 0,5	3,48 ± 0,1
<b>L3</b>	2,15 ± 0,6	3,73 ± 0,3

Fonte: Dos autores, 2025

Legenda: L1- Formulação com 5% de óleo de tomilho e tratamento com ultrassom (5 min); L2- Formulação com 5% de óleo de tomilho e tratamento com ultrassom (7 min); L3- Formulação com 5% de óleo de tomilho e tratamento com ultrassom (10 min).

Na avaliação pela técnica de micro-atmosfera (Tabela 2), observou-se que a ação inibitória foi detectada apenas para *Listeria monocytogenes*, na formulação L1 com volume de 50 µL, apresentando redução de crescimento de 33,3%. Nenhum dos tratamentos resultou em inibição detectável para *Salmonella* spp., independentemente do volume ou tempo de sonicação.

Tabela 2 - Inibição de crescimento bacteriano (%) pela técnica de micro-atmosfera com diferentes volumes das nanoemulsões.

	<i>Salmonella</i> spp.		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	50 µL	100 µL	50 µL	100 µL
<b>L1</b>	ND	ND	33,3	ND
<b>L2</b>	ND	ND	ND	ND
<b>L3</b>	ND	ND	ND	ND

Fonte: Dos autores, 2025

Legenda: ND – Não detectado. L1- Formulação com 5% de óleo de tomilho e tratamento com ultrassom (5 min); L2- Formulação com 5% de óleo de tomilho e tratamento com ultrassom (7 min); L3- Formulação com 5% de óleo de tomilho e tratamento com ultrassom (10 min).

Os resultados deste estudo indicam que as nanoemulsões de óleo essencial de tomilho apresentaram maior atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* do que contra *Salmonella* spp., especialmente quando processadas por 10 minutos de sonicação e avaliadas pela técnica de difusão em ágar. Esse comportamento está em concordância com Guo et al. (2020), que também observaram incremento na eficácia antimicrobiana do óleo essencial de tomilho nanoemulsionado quando associado ao ultrassom, atribuindo o efeito à redução no tamanho das gotículas e ao aumento da superfície de contato com as células bacterianas.

De forma semelhante, Yang et al. (2022) relataram que a otimização das condições de ultrassonicação aumenta a estabilidade e a ação antimicrobiana das nanoemulsões de tomilho contra *Escherichia coli*, reforçando que parâmetros como tempo e intensidade de sonicação são determinantes para o desempenho do sistema. No presente estudo, a maior eficácia observada contra *L. monocytogenes* sugere que a estrutura da parede celular das Gram-positivas pode favorecer a ação dos compostos ativos.

#### 4. CONCLUSÕES

As nanoemulsões à base de óleo essencial de tomilho apresentam-se como uma alternativa promissora para o controle de patógenos alimentares, principalmente *L. monocytogenes*, indicando o potencial dessas nanoemulsões como alternativa natural para controle de patógenos alimentares

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GUO, M.; ZHANG, L.; HE, Q.; et al. Synergistic antibacterial effects of ultrasound and thyme essential oils nanoemulsion against *Escherichia coli* O157:H7. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, 2020.

YANG, Z.; HE, Q.; ISMAIL, B. B.; HU, Y.; GUO, M. Ultrasonication induced nano-emulsification of thyme essential oil: Optimization and antibacterial mechanism against *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 133, 2022.

**CLSI. M02-A11: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition.** 2012a.