

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

TESE

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE NANOEMULSÃO À
BASE DE ALGINATO E ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA
COMO REVESTIMENTO ATIVO EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

MARIAH ALMEIDA LIMA

2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE NANOEMULSÃO À
BASE DE ALGINATO E ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA
COMO REVESTIMENTO ATIVO EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

MARIAH ALMEIDA LIMA

*Sob orientação do Doutor
Amauri Rosenthal*

*E Coorientação das
Doutora Renata Valeriano Tonon e Professora Rosiane Lopes da Cunha*

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em
Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no
Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos, Área de
Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica,
Janeiro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732d Lima, Mariah Almeida, 1991-
Desenvolvimento e Aplicação de Nanoemulsão à base de
Alginato e Óleo Essencial de Pimenta Rosa como
Revestimento Ativo em Queijo Minas Frescal / Mariah
Almeida Lima. - Seropédoca, 2025.
128 f.: il.

Orientador: Amauri Rosenthal.
Coorientador: Rosiane Lopes da Cunha.
Coorientador: Renata Valeriano Tonon.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, 2025.

1. Nanoemulsões. 2. Óleo essencial de pimenta rosa.
3. Revestimento ativo. 4. Microfluidização. 5. Queijo
Minas Frescal. I. Rosenthal, Amauri, 1960-, orient.
II. Cunha, Rosiane Lopes da, -, coorient. III. Tonon,
Renata Valeriano, -, coorient. IV. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. V.
Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TERMO N° 19/2025 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.002499/2025-89

Seropédica-RJ, 19 de janeiro de 2025.

MARIAH ALMEIDA LIMA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora** em **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

TESE APROVADA EM 14/01/2025

AMAURI ROSENTHAL, (Dr) (orientador) EMBRAPA

ANA CARLA KAWAZOE SATO, (Dra) UNICAMP

ANA ELIZABETH CAVALCANTE FAI, (Dra) UERJ

NATHÁLIA RAMOS DE MELO, (Dra) UFF

OTNIEL FREITAS SILVA, (Dr) EMBRAPA

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 12/03/2025 19:17)
NATHÁLIA RAMOS DE MELO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.796-##

(Assinado digitalmente em 11/02/2025 20:52)
ANA CARLA KAWAZOE SATO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.368-##

(Assinado digitalmente em 22/01/2025 18:56)
OTNIEL FREITAS SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.462-##

(Assinado digitalmente em 19/01/2025 19:07)
AMAURI ROSENTHAL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.978-##

(Assinado digitalmente em 11/02/2025 17:02)
ANA ELIZABETH CAVALCANTE FAI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.673-##

"Aos meus pais, João e Maria José, que, sob muito sol, me fizeram chegar até aqui pela sombra."

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me guiar em cada passo desta caminhada, por ser minha força e proteção nos momentos de medo e desespero, e pela sabedoria para enfrentar os desafios. Senhor, obrigado porque até aqui Tua mão me guiou, me sustentou.

À minha família, meu porto seguro, que sempre viu em mim um potencial que muitas vezes eu mesma não via, e por me apoiar incondicionalmente. Aos meus pais, João e Maria José, por todo amor, dedicação e por serem a base sólida que me sustenta. Obrigada por sonharem comigo, e por me sustentarem com suas infinitas orações. Ao meu irmão, João Paulo, pelo amor e pelo incentivo que sempre me impulsionaram. Ao meu noivo, Fabiano, por ser meu maior encorajador e suporte. É muito gratificante caminhar com você rumo ao nosso futuro. À minha sogra, Débora, por sua gentileza e apoio em todos os momentos. E as minhas avós, Alaíde e Maria (*in memoriam*) que me ensinaram o poder da oração e da confiança em Deus: “Dá o passo, que Deus dá o chão”. Vocês sempre serão fonte de amor inabalável e inspiração.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por todo o aprendizado e crescimento acadêmico e profissional.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e à Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) pela oportunidade de aprender e colaborar em um ambiente de excelência.

À Embrapa, por disponibilizar recursos e contribuir significativamente para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Amauri, pela confiança depositada no meu trabalho, pelo incentivo contínuo e, especialmente, pelo suporte nos momentos em que eu duvidei de mim mesma. Sua crença no meu potencial foi essencial para que eu continuasse mesmo nos momentos mais difíceis. Sou profundamente grata por toda a orientação, paciência e por sempre estar ao meu lado, mesmo quando os desafios pareciam insuperáveis.

À professora Rosiane, por me receber em sua equipe com tanto carinho e confiança, ensinando-me com dedicação durante o período em que estive em Campinas e me acompanhando mesmo à distância. Sua orientação atenta foi essencial para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional. Sou imensamente grata pela generosidade e sabedoria que compartilhou, as quais tiveram um impacto significativo em minha trajetória.

À Doutora Renata, pelo suporte constante e paciência na orientação. Sua dedicação e compreensão foram fundamentais para que eu pudesse avançar em meu trabalho. Sou muito grata por sua orientação cuidadosa e por sempre estar disponível para me ajudar a superar os desafios que surgiram ao longo do caminho.

Aos técnicos da Embrapa e da Unicamp pelo auxílio e ensinamentos durante a execução desse trabalho. Foi um prazer trabalhar e aprender com vocês.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP), por me receberem com tanto carinho e por me fazerem sentir parte do grupo. A integração e acolhimento que encontrei com vocês foram essenciais para tornarem essa jornada mais enriquecedora e prazerosa.

Aos amigos da Embrapa que sempre me fizeram sentir parte da família.

À minha dupla, Marcelo e Igor, que têm sido a minha base de apoio e amizade ao longo dessa jornada. A presença, o incentivo e as conversas de ambos foram essenciais para que eu superasse os momentos mais difíceis e seguisse em frente com confiança.

Aos queridos amigos Maria Clara, Cristiane, Priscila, Matheus, Leticia, por sempre estarem ao meu lado, oferecendo apoio, compreensão que tornaram essa caminhada mais leve e significativa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos. À FAPERJ e FAPESP pelo financiamento dessa pesquisa.

À todas as pessoas que colaboraram diretamente e indiretamente na execução desse trabalho.

Jamais chegaria até aqui sem o apoio de cada um de vocês.

Meu mais profundo e sincero agradecimento.

“Nunca seja tão inteligente a ponto de esquecer de ser gentil.”
(Marjorie- Taylor Swift)

RESUMO GERAL

LIMA, Mariah Almeida. **Desenvolvimento e Aplicação de Nanoemulsão à base de Alginato e Óleo Essencial de Pimenta Rosa como Revestimento Ativo em Queijo Minas Frescal.** 2025. 128p Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Esta tese teve por finalidade desenvolver nanoemulsões à base de alginato de sódio e óleo essencial de pimenta rosa (PPEO) a partir da técnica de microfluidização. Oito formulações foram avaliadas quanto ao efeito do uso de óleo de girassol e lecitina de soja como estabilizantes, considerando suas propriedades físico-químicas, físicas e antimicrobianas contra os microrganismos patogênicos *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, investigou-se a aplicação dessas nanoemulsões como revestimento ativo em queijo Minas Frescal, analisando seus efeitos sobre as propriedades físico-químicas, de textura, cor e eficácia antimicrobiana frente à inoculação de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* durante 28 dias (4 °C). Os resultados mostraram que as nanoemulsões apresentaram tamanho de gota inferior a 200 nm, comportamento reológico de fluido newtoniano e estabilidade cinética ao longo de 20 dias. A fase dispersa das nanoemulsões (PPEO) foi misturada a óleo de girassol, com o intuito de preservar o óleo essencial de condições de processo (altas pressões e temperatura). De fato, a adição de óleo de girassol na formulação proporcionou uma retenção de 80% do PPEO nas nanoemulsões. Testes antimicrobianos *in vitro* revelaram que as nanoemulsões foram eficazes contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 200 µg/mL e concentrações bactericidas mínimas (CBM) de 800 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente, destacando o potencial do PPEO como agente natural de biopreservação. As nanoemulsões com as melhores propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, foram utilizadas como revestimento ativo em queijo Minas Frescal. Os revestimentos ativos com nanoemulsão contribuíram para manutenção da umidade e preservação da coloração dos queijos Minas Frescal. Contudo, a interação do revestimento ativo com a matriz do queijo favoreceu o aumento da sinérese, afetando negativamente o dessoramento. No que se refere aos parâmetros de textura, o revestimento ativo reduziu a dureza e adesividade dos queijos, enquanto aumentou a coesividade, mastigabilidade e gomosidade. Apesar dos benefícios físico-químicos, a eficácia antimicrobiana do revestimento ativo *in situ* foi limitada, sem impacto significativo na redução das populações de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* inoculadas, possivelmente devido às interações dos compostos ativos com a matriz do queijo e aos elevados níveis de sinérese. Conclui-se que as nanoemulsões à base de alginato de sódio e PPEO possuem relevante potencial como uma alternativa sustentável aos conservantes sintéticos. No entanto, o desempenho *in situ* evidenciou a necessidade de ajustes na formulação e novas estratégias de aplicação, além de estudos em outras matrizes alimentares, para ampliar sua eficiência e viabilidade para a indústria de alimentos.

Palavras-chave: Nanoemulsões, Óleo essencial de pimenta rosa, Revestimento ativo, Microfluidização, Queijo Minas Frescal

GENERAL ABSTRACT

LIMA, Mariah Almeida. **Development and Application of Sodium Alginate-Based Nanoemulsion with Pink Pepper Essential Oil as an Active Coating for Minas Frescal Cheese.** 2024. 128p. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

The aim of this thesis was to develop nanoemulsions based on sodium alginate and pink peppercorn essential oil (PPEO) using the microfluidization technique. Eight formulations were evaluated for the effect of using sunflower oil and soy lecithin as stabilizers, considering their physicochemical, physical and antimicrobial properties against the pathogenic microorganisms *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. In addition, the application of these nanoemulsions as an active coating on Minas Frescal cheese was investigated, analyzing their effects on physicochemical properties, texture, color and antimicrobial efficacy against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* inoculation for 28 days (4 °C). The results showed that the nanoemulsions had a drop size of less than 200 nm, Newtonian fluid rheological behavior and kinetic stability over 20 days. The dispersed phase of the nanoemulsions (PPEO) was mixed with sunflower oil in order to preserve the essential oil from process conditions (high pressure and temperature). In fact, the addition of sunflower oil to the formulation resulted in 80% retention of PPEO in the nanoemulsions. In vitro antimicrobial tests revealed that the nanoemulsions were effective against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, with minimum inhibitory concentrations (MIC) of 200 µg/mL and minimum bactericidal concentrations (MBC) of 800 µg/mL and 400 µg/mL, respectively, highlighting PPEO's potential as a natural biopreservation agent. The nanoemulsions with the best antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* were used as active coatings on Minas Frescal cheese. The active coatings with nanoemulsions contributed to maintaining the humidity and preserving the color of the Minas Frescal cheeses. However, the interaction of the active coating with the cheese matrix favored increased syneresis, negatively affecting draining. With regard to texture parameters, the active coating reduced the hardness and adhesiveness of the cheeses, while increasing cohesiveness, chewiness and gumminess. Despite the physicochemical benefits, the antimicrobial efficacy of the in situ active coating was limited, with no significant impact on reducing the inoculated *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* populations, possibly due to the interactions of the active compounds with the cheese matrix and the high levels of syneresis. It is concluded that nanoemulsions based on sodium alginate and PPEO have significant potential as a sustainable alternative to synthetic preservatives. However, the in situ performance showed the need for adjustments to the formulation and new application strategies, as well as studies in other food matrices, in order to increase their efficiency and viability for the food industry.

Keywords: Nanoemulsions, Pink pepper essential oil, Active coating, Microfluidization, Minas Frescal cheese.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 Métodos de fabricação de nanoemulsões-----10

CAPÍTULO II

Figure 1 Particle size distribution (nm) of the sodium alginate-PPEO nanoemulsion expressed in intensity and volume stabilized by (A) Tween 20 and (B) Tween 80-----50

Figure 2 ζ -potential (mV) of coarse emulsions and nanoemulsions-----52

Figure 3 Whiteness index of coarse emulsions and nanoemulsions-----53

Figure 4 Images of sodium alginate-pink pepper essential oil (PPEO) emulsions and nanoemulsions-----54

Figure 5 Flow curves of coarse emulsions and sodium alginate-PPEO nanoemulsions as a function of the shear rate-----55

Figure 6 Separation index (SI) of coarse emulsions (CE) and nanoemulsions (M)-----56

Figure 7 Phase separation of sodium alginate-pink pepper essential oil (PPEO) microfluidized emulsions and nanoemulsions after 30 days of storage-----57

Figure 8 Storage stability of sodium alginate-pink pepper essential oil (PPEO) microfluidized emulsions and nanoemulsions at 25 °C-----58

Figure 9 Optical microscopic images of coarse emulsion and sodium alginate-PPEO nanoemulsions-----59

Figure 10 Oil retention of coarse emulsions (CE) and nanoemulsions (M)-----60

Figure 11 Antimicrobial activity of non-encapsulated PPEO and its encapsulated forms, as well as Tween 20, Tween 80, and sodium alginate solution against *S. aureus* and *L. monocytogenes*-----62

CAPÍTULO III

Figura 1 Fluxograma de produção do queijo tipo Minas Frescal-----81

Figura 2 Miniqueijos fatiados logo após o processo de fabricação -----82

Figura 3 Fluxograma de revestimento e análises dos miniqueijos -----83

Figura 4 Distribuição de tamanho de gota (nm) da nanoemulsões de alginato de sódio-PPEO expressa em intensidade e volume-----87

Figura 5 Efeito do óleo essencial de pimenta rosa e revestimentos de alginato de sódio e nanoemulsão contra <i>Staphylococcus aureus</i> inoculado em minqueijos Minas Frescal, nas concentrações iniciais de (A) 10^3 UFC/g (B) 10^5 UFC/g-----	90
Figura 6 Efeito do óleo essencial de pimenta rosa e revestimentos de alginato de sódio e nanoemulsão contra <i>Listeria monocytogenes</i> inoculado em minqueijos Minas Frescal, nas concentrações iniciais de (A) 10^4 UFC/g (B) 10^6 UFC/g-----	91
Figura 7 Evolução da umidade (%) em minqueijos Minas Frescal com e sem revestimento ao longo de 28 dias de armazenamento (4 ± 2 °C)-----	93
Figura 8 Minqueijos após processo de secagem em estufa a 105 °C por 24 horas-----	93
Figura 9 Sinérese (%) em minqueijos Minas Frescal com e sem revestimento ao longo de 28 dias de armazenamento (4 ± 2 °C)-----	94
Figura 10 Perfil de pH dos minqueijos Minas Frescal com e sem revestimentos armazenados sob refrigeração de 4 ± 2 °C durante 28 dias-----	95
Figura 11 Acidez titulável dos minqueijos Minas Frescal sem revestimento e revestidos com alginato de sódio e nanoemulsão com PPEO ao longo de 28 dias de armazenamento (4 ± 2 °C)-----	97
Figura 12 (A) Alterações de cor em termos dos valores de índice de brancura e (B) mudanças no parâmetro b^* dos minqueijos Minas Frescal controle e revestidos durante o armazenamento a 4 ± 2 °C-----	99
Figura 13 Coloração dos minqueijos no início (T0) e fim (T28) do armazenamento de 28 dias a 4 °C-----	100
Figura 14 Perfil de textura dos minqueijos Minas Frescal controle e revestidos ao longo do armazenamento a 4 ± 2 °C -----	101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 Emulsificantes utilizados na fabricação de nanoemulsões-----	8
Tabela 2 Efeito da adição de óleos essenciais na conservação de queijos-----	18
Tabela 3 Efeito da adição de nanoemulsões com fase dispersa contendo óleos essenciais na conservação de queijos -----	24

CAPÍTULO II

Table 1 Composition and identification of the different nanoemulsion formulations-----	45
Table 2 Mean particle size (z-average, D10, D50, and D90) and polydispersity index (PdI) of coarse emulsions (CE) and nanoemulsions (M)-----	51
Table 3 Viscosity (m Pa.s) and rheological properties of coarse emulsions (CE) and nanoemulsions (M) at 10.8 s ⁻¹ from the power-law model-----	55
Table 4 Diameters of inhibition zone (mm) demonstrated by non-encapsulated pink pepper essential oil and sodium alginate-PPEO nanoemulsions against both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains-----	62
Table 5 Values for the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values (µg/mL) pink pepper essential oil and sodium alginate-PPEO nanoemulsions-----	63

CAPÍTULO III

Tabela 1 Identificação e composição das nanoemulsões-----	79
Tabela 2 Tamanho médio de gota (Z-médio, D10, D50 e D90) e índice de polidispersidade (PdI) da solução de alginato e das nanoemulsões (NE)-----	87
Tabela 3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e espessura dos filmes de alginato de sódio e filmes de alginato com nanoemulsões com PPEO-----	88

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
Objetivo Geral.....	3
Objetivos específicos	3
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1 ÓLEOS ESSENCIAIS: DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES	5
1.1 Óleo Essencial de pimenta rosa	5
2 NANOEMULSÕES.....	6
2.1 Definição e propriedades.....	6
2.2 Formulação das Nanoemulsões	7
2.3 Estabilidade das Nanoemulsões.....	9
2.4 Métodos de fabricação	9
3 REVESTIMENTOS BIODEGRADÁVEIS.....	11
3.1 Revestimentos incorporados de nanoemulsões à base de óleos essenciais (OE)	13
4 QUEIJOS E SEUS DESAFIOS DE CONSERVAÇÃO.....	14
4.1 Queijo Minas Frescal	16
5 APLICAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS NANOEMULSÕES NA CONSERVAÇÃO DE QUEIJOS.....	17
6 CONCLUSÃO.....	27
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO II - PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION, RHEOLOGICAL PROPERTIES, AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SODIUM ALGINATE-PINK PEPPER ESSENTIAL OIL (PPEO) NANOEMULSIONS	41
ABSTRACT	42
1 INTRODUCTION	43
2 MATERIALS AND METHODS	44
2.1 Material	44
2.2 Nanoemulsion Preparation	45
2.3 Physicochemical Properties of the Nanoemulsions	45

2.3.1	Particle size, size distribution, and polydispersity index	45
2.3.2	ζ -Potential	46
2.3.3	Whiteness Index	46
2.3.4	Rheology Characterization.....	46
2.3.5	Emulsion Stability	46
2.3.6	Optical Microscopy	47
2.3.7	Oil Retention	47
2.4	Antimicrobial Activity	47
2.4.1	Agar Disk Diffusion	47
2.4.2	Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations	47
2.5	Statistical Analysis.....	48
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	48
3.1	Particle size distribution, PdI and ζ -potential	48
3.2	Whiteness Index.....	52
3.3	Rheological Properties	54
3.4	Emulsion Stability.....	56
3.5	Microscopy	58
3.6	Oil Retention.....	60
3.7	Antimicrobial Activity	61
4	CONCLUSIONS	64
5	REFERENCES	65
CAPÍTULO III - REVESTIMENTO ATIVO COM NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA PARA CONSERVAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL		74
6	INTRODUÇÃO.....	77
7	MATERIAL E MÉTODOS.....	79
7.1	Material	79
7.2	Preparação da nanoemulsão	79
7.3	Distribuição do tamanho de gota	80
7.4	Filme ativo com nanoemulsão	80
7.4.1	Produção do filme.....	80

7.4.2	Espessura dos filmes.....	80
7.4.3	Permeabilidade ao vapor de água.....	80
7.5	Produção dos Miniqueijos tipo Minas Frescal	80
7.6	Aplicação do revestimento ativo no queijo Minas Frescal.....	83
7.7	Análises microbiológicas dos miniqueijos	83
7.7.1	Preparação do inóculo.....	83
7.7.2	Atividade antimicrobiana contra <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> nos queijos inoculados	84
7.8	Análises Físico-químicas.....	84
7.8.1	Umidade.....	84
7.8.2	Sinérese.....	85
7.8.3	pH	85
7.8.4	Acidez total	85
7.8.5	Cor	85
7.9	Perfil de Textura	86
7.10	Análises estatísticas.....	86
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
8.1	Distribuição de tamanho de gotas das nanoemulsões	86
8.2	Permeabilidade ao vapor de água	88
8.3	Análises microbiológicas dos miniqueijos	89
8.4	Análises Físico-químicas dos miniqueijos	92
8.4.1	Umidade.....	92
8.4.2	Sinérese.....	94
8.4.3	pH	95
8.4.4	Acidez total	96
8.4.5	Cor e Índice de brancura (WI).....	98
8.5	Perfil de textura.....	100
9	CONCLUSÃO.....	104
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
	CONCLUSÕES GERAIS	113

INTRODUÇÃO GERAL

Leite e derivados, juntamente com carnes e ovos, constituem as maiores fontes proteicas de origem animal na alimentação humana. Dentre os derivados do leite, o queijo é o mais consumido, pois além de seu alto valor nutricional, destaca-se por seu sabor, versatilidade de uso, conveniência e variedade de tipos (Mureşan *et al.*, 2021).

No Brasil, o queijo Minas Frescal apresenta-se como um dos tipos de queijo mais populares, amplamente produzido e consumido em diversas refeições. É classificado como um queijo fresco devido ao seu alto teor de umidade, baixa concentração de sal, pH em torno de 6,0 e por não ser submetido à cura. Essas características, combinadas ao fato de ser um queijo não maturado, o tornam altamente suscetível à deterioração microbiana e à contaminação por microrganismos, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, frequentemente associados a surtos de doenças alimentares (Falih *et al.*, 2024; Fox *et al.*, 2017; Ribeiro Júnior *et al.*, 2020). Além dos riscos à saúde do consumidor, a contaminação por esses microrganismos pode comprometer a qualidade do produto, causar perdas econômicas significativas e limitar o prazo de validade do queijo, que varia de 14 a 21 dias (Silva *et al.*, 2021). Adicionalmente, o queijo Minas Frescal é suscetível à ação de microrganismos deteriorantes, como bactérias do grupo coliforme, bolores e leveduras, que afetam sua conservação e qualidade sensorial, evidenciando a necessidade de métodos de conservação eficazes para aumentar sua segurança e vida útil.

Considerando a necessidade de alimentos de qualidade e seguros, pesquisas para aumentar a vida útil de alimentos com alta perecibilidade tem sido realizadas visando não afetar as propriedades sensoriais dos produtos (Bedoya-Serna *et al.*, 2018). Além disso, nos últimos anos aumentou o interesse de se substituir aditivos sintéticos, comumente utilizados em alimentos para o controle de crescimento de microrganismos, por antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais (Falih *et al.*, 2024; Khan *et al.*, 2024; Sun *et al.*, 2025).

Óleos essenciais são compostos naturais extraídos de matérias-primas vegetais. São altamente voláteis, embora sua composição complexa seja formada também por compostos não-voláteis. Apresentam características antioxidantes e antimicrobianas, sendo efetivos contra uma gama de microrganismos deteriorantes e patogênicos (Das *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2021). Entretanto, os óleos essenciais apresentam algumas características que tornam um desafio sua incorporação em matrizes alimentares, como forte odor e *flavor*, que podem afetar as características sensoriais do produto. Além disso, apresentam baixa solubilidade em água e fácil degradação por oxidação, quando expostos a altas temperaturas e luz (Li *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2025). Óleo essencial de pimenta rosa é obtido através da extração dos frutos da Aroeira- vermelha, *Schinus terebinthifolius* Raddi, apresentando atividades antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas (Locali-Pereira; Lopes; Nicoletti, 2023). O estudo de Dannenberg *et al.* (2017) demonstrou atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa contra microrganismos patogênicos em queijo Minas Frescal, porém o óleo afetou indesejavelmente as características sensoriais do queijo. Entretanto, esse problema pode ser minimizado através da nanoencapsulação deste óleo essencial em sistemas emulsionados (nanoemulsões).

Nanoemulsões são sistemas compostos por uma fase oleosa e uma aquosa estabilizadas por um surfactante ou emulsificante, apresentando tamanho de gotas tipicamente na faixa de 20 a 200 nm e estabilidade a longos períodos de armazenamento (Hanan *et al.*, 2024; McClements, 2012). A nanoencapsulação dos óleos essenciais permite aumentar sua dispersabilidade, reduzir

impactos sensoriais e, em alguns casos, aumentar sua atividade antimicrobiana, devido ao aumento da área superficial (Hanan *et al.*, 2024).

Nanoemulsões têm sido utilizadas em revestimentos comestíveis em diversos alimentos. Revestimentos ativos são camadas finas de material comestível que protegem os alimentos das degradações físico-química e microbiana, podendo carregar agentes antioxidantes e antimicrobianos, como os óleos essenciais (Chaudhary *et al.*, 2020). Alginato de sódio é um sal de ácido algínico classificado como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) é amplamente utilizado como agente formador de filmes e revestimentos na indústria de alimentos. Após tratamento com soluções de CaCl_2 , o alginato de sódio pode gelificar, devido à reticulação com íons Ca^{2+} (Choi *et al.*, 2022), formando um revestimento. Diversos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos do uso dessas nanoemulsões de óleos essenciais como revestimentos comestíveis na conservação de alimentos (Basumatary *et al.*, 2022; Oliveira Filho *et al.*, 2023; Pirozzi *et al.*, 2020; Prakash; Baskaran; Vadivel, 2020; Shokri *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de estratégias naturais e eficazes para aumentar a vida útil de alimentos frescos tem levado a um interesse crescente pela aplicação de nanoemulsões como sistemas inovadores na indústria alimentícia. Motivado pela necessidade de se utilizar compostos naturais, como óleos essenciais, na conservação de alimentos, este trabalho concentra-se na formulação e no uso da nanoemulsão com óleo essencial de pimenta rosa, com comprovadas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, para aplicação como revestimento ativo. A nanoencapsulação em nanoemulsões surge como alternativa promissora para superar limitações do uso direto de óleos essenciais, como instabilidade em condições ambientais e impacto sensorial, ao oferecer maior estabilidade físico-química, eficiência funcional e controle na liberação dos compostos bioativos. Este estudo busca desenvolver uma nanoemulsão à base de alginato de sódio e óleo essencial de pimenta rosa, com foco em seu uso como revestimento ativo. A aplicação da nanoemulsão como revestimento no queijo Minas Frescal, utilizado como modelo, permite explorar o potencial das nanoemulsões no prolongamento da vida útil de alimentos frescos. A nanoemulsão visa proteger o queijo contra deteriorações, garantindo sua segurança e qualidade, ao mesmo tempo em que aproveita as propriedades antimicrobianas e antioxidantes do óleo essencial de pimenta rosa.

Esta tese está organizada em três capítulos principais. O primeiro capítulo apresenta uma revisão de literatura abrangente sobre os conceitos fundamentais relacionados aos óleos essenciais, nanoemulsões e suas aplicações em alimentos. Explora as características do queijo Minas Frescal, destacando os desafios de sua conservação. Além disso, analisa o uso de óleos essenciais e nanoemulsões à base de óleos essenciais na conservação de queijos, enfatizando suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, bem como seus impactos na manutenção da qualidade físico-química, sensorial e microbiológica desses alimentos. O segundo capítulo traz os resultados obtidos no desenvolvimento de nanoemulsões à base de alginato de sódio e pimenta rosa (PPEO), avaliando suas propriedades físico-químicas, estabilidade e eficácia antimicrobiana. Por fim, o terceiro capítulo apresenta os resultados da aplicação de revestimentos à base de alginato de sódio e nanoemulsão de óleo essencial de pimenta rosa em queijos Minas Frescal, com foco na avaliação das propriedades físico-químicas, de textura e na inibição de microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo Geral

Desenvolver nanoemulsão à base de óleo essencial de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e aplicá-la como revestimento ativo em queijo Minas Frescal.

Objetivos específicos

- Desenvolver uma nanoemulsão à base de óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) utilizando o processo de microfluidização;
- Avaliar o efeito de diferentes formulações sobre as propriedades da emulsão: tamanho de gotas, potencial- ζ , polidispersidade, morfologia, coloração e grau de brancura, viscosidade e estabilidade ao longo do armazenamento;
- Caracterizar a efetividade antimicrobiana *in vitro* da nanoemulsão sobre os microrganismos *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*;
- Aplicar a nanoemulsão à base de óleo essencial de pimenta rosa com maior atividade antimicrobiana como revestimento ativo em queijo Minas Frescal e avaliar o produto em relação a: pH, acidez, sinérese, umidade, coloração e textura;
- Avaliar, por meio de teste desafio microbiológico, o efeito da nanoemulsão à base de óleo essencial de pimenta rosa na inibição de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* inoculados em queijo Minas Frescal.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 ÓLEOS ESSENCIAIS: DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES

Óleos essenciais (OEs) são óleos aromáticos compostos por uma mistura de componentes voláteis de baixa massa molecular que apresentam atividade biológica. Os principais constituintes desses óleos são componentes aromáticos, incluindo alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, monoterpenos, isoflavonas, aldeídos e hidrocarbonetos terpênicos (Alsherbiny *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2021). Esses óleos podem ser obtidos de diversas partes de plantas através de processos de fermentação, extração e destilação (Das *et al.*, 2020; Gouvea; Rosenthal; Ferreira, 2017).

Em relação à composição química, os óleos essenciais podem ser divididos em terpenos e hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos aromáticos são aqueles que possuem um ou mais anéis benzênicos em sua estrutura, e juntamente com os terpenos, que são hidrocarbonetos alifáticos, estão relacionados aos aromas dos óleos essenciais (Sharma *et al.*, 2021). Os monoterpenos, conjuntamente com os compostos fenólicos, são os principais compostos dos óleos essenciais com atividade antioxidante que previnem a oxidação através da eliminação de radicais livres (superóxidos e hidroxila) (Carpena *et al.*, 2021; Ni *et al.*, 2021).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais não pode ser atribuída à apenas um mecanismo, porém o mecanismo mais importante está ligado ao caráter hidrofóbico/lipofílico dos óleos essenciais. Após o óleo essencial penetrar a célula microbiana, constituintes dos óleos essenciais se ligam às proteínas causando desarranjo na membrana celular, que leva a mudanças de permeabilidade e fluidez, além de perda de material celular, inibição da absorção de nutrientes e lise celular (da Silva *et al.*, 2021). Bactérias gram-negativas tendem a ser mais resistentes aos óleos essenciais do que as bactérias gram-positivas, devido a diferença na composição de suas paredes celulares. A parede celular das bactérias gram-negativas consiste em uma fina camada de peptidoglicano recoberta por uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos, que possui caráter hidrofílico e atua como uma barreira seletiva à permeabilidade. Em contraste, a parede celular das bactérias gram-positivas contém 90 a 95% de peptidoglicano, o que facilita a ação antimicrobiana ao permitir que os óleos essenciais penetrem e atinjam a membrana citoplasmática.(Alizadeh Behbahani; Noshad; Falah, 2019; Nazzaro *et al.*, 2013).

Apesar de apresentar atividade antioxidante e antimicrobiana, os óleos essenciais apresentam limitações para seu uso devido a sua baixa solubilidade em água, volatilidade, fácil oxidação, além de forte sabor e aroma que causam impactos sensoriais. Outro aspecto relevante é que os óleos essenciais têm sua biodisponibilidade e estabilidade afetada quando aplicados aos alimentos (Ni *et al.*, 2021; Ribeiro-Santos; Andrade; Sanches-Silva, 2017). Com intuito de reduzir as limitações do uso de óleos essenciais, a encapsulação em nanoemulsões se torna uma opção, pois além de aumentar a estabilidade física das substâncias ativas também protege a interação desses compostos com outros componentes (Guerra-Rosas *et al.*, 2017; Ribeiro-Santos; Andrade; Sanches-Silva, 2017; Souza *et al.*, 2025).

1.1 Óleo Essencial de pimenta rosa

Schinus terebinthifolius Raddi é uma árvore perene pertencente à família Anacardiaceae. É uma árvore nativa da costa Brasileira difundida por regiões da América do Sul, América Central, Ásia, África e Europa. É popularmente conhecida como aroeira ou aroeira-vermelha (Locali-Pereira; Lopes; Nicoletti, 2023; Oliveira *et al.*, 2024). Os frutos da

Schinus terebinthifolius R., também conhecidos como pimenta rosa, comercializados de forma desidratada e utilizados como uma pimenta gourmet (Oliveira *et al.*, 2024).

Propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais, entre outras, são atribuídas à pimenta rosa. Na medicina popular brasileira, a pimenta rosa é utilizada como anti-inflamatório, adstringente, tônico e estimulante, sendo essas propriedades associadas à presença de polifenóis (Menegali *et al.*, 2020). Terebinthona, ácido hidroximasticadienóico, ácido terebintifólico e ácido ursólico estão relacionados à atividade antimicrobiana apresentada pela pimenta rosa. O fruto possui de 5,50 a 8,41% de óleo essencial. Este óleo apresenta composição química predominante de monoterpenos (85,1%), sendo que os principais monoterpenos encontrados em extratos de frutas maduras de pimenta rosa são α -pineno, β -felandreno, transocimeno e sesquiterpeno germacreno-D (Asbahani *et al.*, 2015; dos Santos Cavalcanti *et al.*, 2015; Locali-Pereira; Lopes; Nicoletti, 2023). A composição do óleo essencial pode variar, dependendo das características genéticas e fatores abióticos (Oliveira Júnior *et al.*, 2013).

O óleo essencial de pimenta rosa é comumente extraído por hidrodestilação utilizando etanol, com o auxílio de aparelho de Clevenger ou extrator tipo Soxhlet (Locali-Pereira *et al.*, 2021). No entanto, métodos alternativos, como extração por fluido supercrítico, também têm sido utilizados (Maria Neto *et al.*, 2024).

Menegali e colaboradores (2020) avaliaram o efeito antioxidante do extrato de pimenta rosa adicionado a hambúrguer de frango. Os resultados demonstraram que o extrato de pimenta rosa foi tão eficiente quanto o BHT no retardo da oxidação lipídica dos hambúrgueres, após 7 dias de armazenamento. Saldaña e colaboradores (2020) avaliaram os efeitos sensoriais da adição de extrato de pimenta rosa diretamente à carne de hambúrgueres de frango e a filmes de quitosana utilizados como embalagem ativa. Os resultados demonstraram que a adição de extrato de pimenta rosa não afetou a aceitação global tanto do hambúrguer adicionado de extrato, quanto do hambúrguer com filme ativo.

O óleo essencial de pimenta rosa foi adicionado como componente antimicrobiano de filme de acetato utilizado como embalagem ativa para fatias de queijo. Com a aplicação dos filmes observou-se uma redução significativa na população de bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Em relação às bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, os filmes não apresentaram efeitos significativos quando comparados aos efeitos nas gram-positivas (Dannenberg *et al.*, 2017). Assim, a adição de óleos essenciais a matrizes poliméricas pode conferir características antimicrobianas e antioxidantes (Umaraw *et al.*, 2020).

2 NANOEMULSÕES

2.1 Definição e propriedades

Nanoemulsões são dispersões coloidais formadas por duas fases imiscíveis estabilizadas por um emulsificante, com tamanho de gotas variando de 20 a 200 nm (Donsi; Ferrari, 2016; McClements, 2012; McClements; Rao, 2011). As nanoemulsões são divididas em óleo-em-água (O/A), que são caracterizadas por gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa, e água-em-óleo (A/O), consistindo em gotas de água dispersas em uma fase oleosa (Banasaz *et al.*, 2020; Donsi; Ferrari, 2016; Hanan *et al.*, 2024). A maior parte das nanoemulsões em alimentos são do tipo O/A e, portanto, estas serão prioritariamente mencionadas.

Devido ao seu tamanho de partícula nanométrico, as nanoemulsões são consideradas cineticamente estáveis, uma vez que os efeitos do movimento Browniano dominam as forças

gravitacionais e, dessa forma, ocorre menor tendência de agregação de partículas, quando comparada às emulsões convencionais (Zhao; Lan; Xie, 2023). Além do mais, o reduzido tamanho das partículas das nanoemulsões as tornam opticamente transparentes em comparação às emulsões convencionais, e esses efeitos ocorrem devido as nanopartículas terem tamanho abaixo do comprimento de luz e espalharem luz mais fracamente (Banasaz *et al.*, 2020; Chaudhary *et al.*, 2020). Devido a essa característica é possível a adição de nanoemulsões a sopas, bebidas, molhos e outros alimentos (Perumal *et al.*, 2022), sem afetar a aparência dos produtos.

Outro fator importante relacionado ao tamanho das gotas é o aumento da atividade biológica dos compostos encapsulados nas nanoemulsões. A redução do tamanho das partículas melhora o transporte ativo dessas moléculas através das membranas biológicas, bem como aumenta a área superficial, melhorando a reatividade desses compostos (Souza *et al.*, 2025).

2.2 Formulação das Nanoemulsões

As nanoemulsões são obtidas através da mistura de ao menos três componentes: óleo, água e emulsificante, sendo este último responsável por estabilizar a interface das gotas (Chu *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2022). A formação e estabilidade da nanoemulsão está diretamente ligada às propriedades físico-químicas e concentrações dos componentes da nanoemulsão (Hanan *et al.*, 2024; Silva, 2020).

A fase oleosa da nanoemulsão, que representa a fração lipídica, geralmente é composta de um lipídeo, como gorduras ou óleos (Banasaz *et al.*, 2020). As características físico-químicas dos óleos, como viscosidade, densidade, miscibilidade, polaridade, índice de refração e tensão interfacial com a fase aquosa são de extrema importância para a formação e estabilidade da nanoemulsão (Barradas; de Holanda e Silva, 2020; McClements; Jafari, 2018). Um critério essencial para a formação e estabilidade das nanoemulsões são as razões óleo:água e óleo:emulsificante (Zhao; Lan; Xie, 2023). Outra característica que afeta a estabilidade das gotas é a solubilidade do óleo, uma vez que tal propriedade é influenciada pela quantidade e características dos componentes lipofílicos e hidrofílicos da emulsão. A prevalência de compostos hidrossolúveis pode favorecer fenômenos de instabilidade das nanoemulsões, como amadurecimento de Ostwald, coalescência, separação gravitacional e floculação (Sundar; Parikh, 2023).

Lipídeos bioativos (como óleo de peixe), óleos essenciais, aromas, vitaminas, entre outros, podem ser encapsulados em nanogotas, de forma a proteger esses compostos de alterações causadas por fatores externos. O aprisionamento desses compostos dentro da gota pode ser interpretado como um revestimento (Rehman *et al.*, 2021), permitindo um maior controle da liberação destes bioativos, além de facilitar a manipulação e incorporação desses compostos em outras formulações (Banasaz *et al.*, 2020; Barradas; de Holanda e Silva, 2020; Zhao; Lan; Xie, 2023).

A fase aquosa é principalmente composta por água, porém pode conter outros componentes hidrossolúveis como ácidos, bases, minerais, conservantes, proteínas e carboidratos. O tipo e a concentração dos componentes adicionados à fase aquosa irão determinar características como tensão interfacial com a fase oleosa, pH, polaridade, força iônica, sendo que tais características impactam diretamente na formação, propriedades físico-químicas e estabilidade da nanoemulsão (Algahtani; Ahmad; Ahmad, 2022; McClements; Rao, 2011).

Nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e a simples homogeneização de óleo e fase aquosa não resulta em uma nanoemulsão, uma vez que após a homogeneização o sistema separa rapidamente em suas fases componentes (Jain; Chella, 2021). Dessa forma, a fim de se evitar a separação de fases, ingredientes conhecidos como estabilizantes são adicionados para facilitar a formação e garantir a estabilidade da nanoemulsão. Esses compostos podem ter propriedades tensoativas ou anfifílicas e, neste caso, são denominados de emulsificantes, ou serem apenas modificadores de textura ou das propriedades reológicas (Jain; Chella, 2021; McClements; Jafari, 2018).

Os emulsificantes são moléculas anfifílicas de superfície ativa que são adsorvidas na interface óleo-água durante a homogeneização (Barradas; de Holanda e Silva, 2020; Hanan *et al.*, 2024). Os emulsificantes agem reduzindo a tensão interfacial, facilitando a ruptura e inibindo a agregação das gotículas (Barradas; de Holanda e Silva, 2020; Soni *et al.*, 2023). Além disso, definem as propriedades da interface das nanoemulsões como espessura, carga elétrica, hidrofobicidade e reatividade química (Banasaz *et al.*, 2020).

Muitas moléculas atuam como agentes emulsificantes, e são escolhidas de acordo com a característica da fase contínua. Os emulsificantes incluem surfactantes de baixa massa molecular (naturais ou sintéticos) e emulsificantes de alta massa molecular (geralmente hidrocolóides como proteínas e polissacarídeos) (Marhamati; Ranjbar; Rezaie, 2021). Na Tabela 1 estão resumidos os principais emulsificantes utilizados na preparação das nanoemulsões alimentícias.

Tabela 1 Emulsificantes utilizados na fabricação de nanoemulsões alimentícias

Tipo	Origem	Exemplos
Baixa massa molecular	Sintético	Ésteres de sacarose, mono e diglicerídeos, derivados de monoglicerídeos, derivados de polioxietileno (Tween, Span, Brij, monopalmitato de sacarose), derivados de monoglicerídeos
	Natural	Fosfolipídios (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol), glicolipídios (ramnolipídios, soforolipídios, trealolipídios, lipídios de cellobiose e lipídios de manosíleritritol), saponinas (saponina de Quillaja, saponinas do chá, saponinas do ginseng)
Alta massa molecular	Proteína	Proteínas animais (principalmente do leite - soro de leite e caseína), proteínas vegetais (proteínas de soja, de ervilha e de lentilha), proteínas misturadas (por exemplo, caseinato de sódio e caseína micelar)
	Polissacarídeo	Goma arábica, goma de fibra de milho, pectina (pectina altamente metoxilada, pectina ultra-altamente metoxilada), mucilagem vegetal (das folhas de <i>Pereskia aculeata</i> Miller, mucilagem de mostarda amarela), anidrido octenil succínico (OSA), polissacarídeos modificados (amido modificado com OSA, OSA-ciclodextrina)

Fonte: adaptado de Banasaz *et al.* (2020)

Os surfactantes são agentes ativos que podem ser classificados de acordo com suas características elétricas, como catiônicos, aníônicos, não-iônicos (neutros) e zwiteriônico (carga positiva e negativa), e essas propriedades impactam diretamente na formação, estabilidade e propriedades funcionais das nanoemulsões. Dodecil sulfato de sódio e os derivados de monoglicerídeos são exemplos de surfactantes aníônicos. Os surfactantes não-iônicos incluem os ésteres de sacarose, derivados de polioxietileno, como Tween, Span e Brij. Os surfactantes

catiônicos são usados raramente na indústria de alimentos, com exceção do arginato láurico. Já as proteínas são classificadas como emulsificantes anfifílicos, cuja carga superficial dependerá das condições de pH (Hanan *et al.*, 2024; Soni *et al.*, 2023). Alguns polissacarídeos podem ser carregados negativamente, como a pectina, ou serem neutros, como o amido.

Modificadores de textura são substâncias utilizadas para modificar as propriedades reológicas das nanoemulsões, inibindo o movimento das gotículas e retardando a separação gravitacional, podendo também ser utilizados para conferir características de textura desejáveis (McClements; Jafari, 2018; Mushtaq *et al.*, 2023). Os modificadores de textura, geralmente, são adicionados à fase contínua e podem atuar como agentes espessantes ou agentes gelificantes. Os agentes espessantes usualmente são polímeros solúveis de cadeias longas, que agem aumentando a viscosidade (Hanan *et al.*, 2024), enquanto os agentes gelificantes formam ligações químicas ou físicas com outras moléculas dando às nanoemulsões propriedades tipicamente sólidas (Banasaz *et al.*, 2020).

2.3 Estabilidade das Nanoemulsões

Por serem formadas através de processos não espontâneos, as nanoemulsões estão sujeitas a fenômenos de instabilidade como floculação, coalescência, amadurecimento de Ostwald e separação gravitacional (Sundar; Parikh, 2023). Devido ao reduzido tamanho de gota, as nanoemulsões tendem a ser mais estáveis à floculação, coalescência e separação gravitacional, porém mais suscetíveis ao amadurecimento de Ostwald (Liu *et al.*, 2019).

O amadurecimento de Ostwald é um fenômeno em que as partículas maiores crescem em detrimento das menores devido à difusão de moléculas da fase dispersa através da fase contínua, impulsionada pela maior solubilidade das gotículas menores (Asadinezhad *et al.*, 2019; Zhao; Lan; Xie, 2023). A inibição desse fenômeno, que é considerado a principal causa de instabilidade das nanoemulsões, pode ser obtida através do uso de uma fase dispersa com baixa solubilidade na fase contínua ou com a adição de inibidores de amadurecimento (Barradas; de Holanda e Silva, 2020; Ozogul *et al.*, 2022).

A estabilidade cinética das nanoemulsões pode ser obtida através do ajuste da composição. É importante se atentar para a escolha das fases oleosa e aquosa, e principalmente do estabilizante, que são essenciais para a formulação de uma nanoemulsão cineticamente estável.

2.4 Métodos de fabricação

Os métodos de fabricação das nanoemulsões podem ser classificados em dois tipos de métodos: alta energia e baixa energia, como apresentado na Figura 1 (Sharma *et al.*, 2022). De acordo com McClements e Jafari (2018), a escolha do método para a fabricação da nanoemulsão está diretamente relacionada às propriedades da fase oleosa e do emulsificante, bem como das características funcionais e físico-químicas desejadas. O método de preparo também pode impactar diretamente no tamanho das gotas e na estabilidade da nanoemulsão (Ozogul *et al.*, 2022).

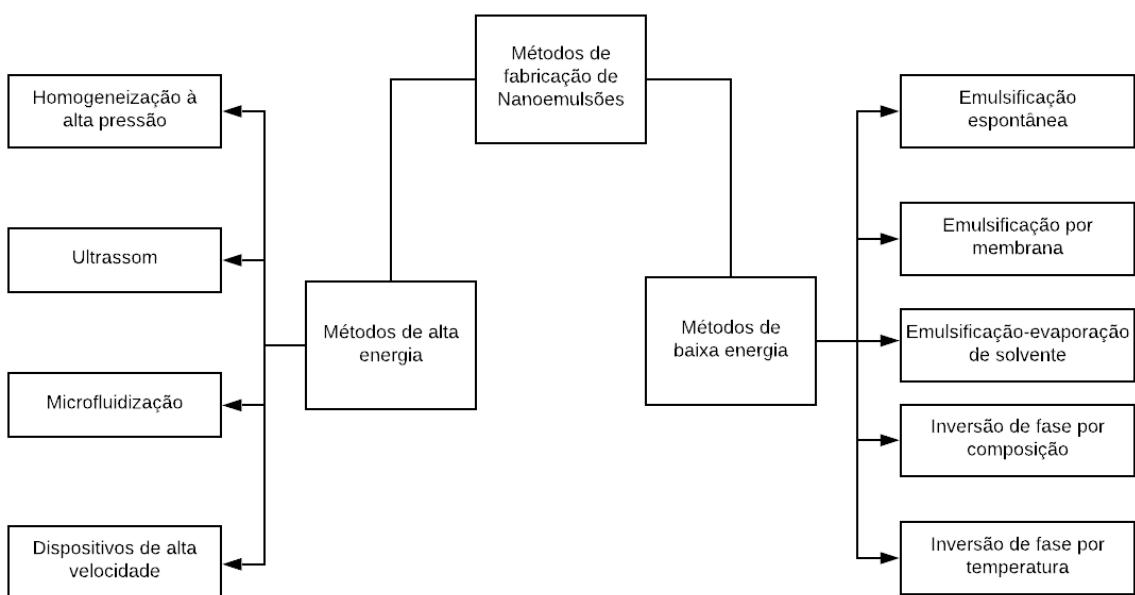


Figura 1 Métodos de fabricação de nanoemulsões

Fonte: Própria

Os métodos de alta energia são assim chamados pois necessitam de grandes quantidades de energia geradas por dispositivos mecânicos, que originam forças de cisalhamento, compressão ou cavitação que são capazes de romper a elevada tensão interfacial entre óleo e água (Barradas; de Holanda e Silva, 2020; Hanan *et al.*, 2024). Dentre os métodos de alta energia destacam-se a homogeneização a alta pressão, microfluidização, ultrassom e agitação com alto cisalhamento (Chaudhary *et al.*, 2020). Nessa abordagem, o processo ocorre através da quebra da interface óleo-água da emulsão, promovendo a redução do tamanho das gotas, seguida da absorção do emulsificante na interface das gotas formadas, prevenindo a recaudescência e promovendo a estabilidade (Barradas; de Holanda e Silva, 2020; Pavoni *et al.*, 2020). Nessas técnicas, grandes quantidades de energia são transferidas (50–500 MJ/m³) (Donsì; Ferrari, 2016; Prakash *et al.*, 2018).

Na homogeneização a alta pressão (HAP), as fases oleosa e aquosa são pressurizadas a altas pressões (50-400 MPa) através de uma válvula com passagem estreita, sendo que a ação de forças de cisalhamento, compressão e cavitação promovem a formação de gotículas nanométricas (Galvão; Vicente; Sobral, 2018; Sundar; Parikh, 2023). A microfluidização, outro método de alta energia comumente utilizado na produção de nanoemulsões, de forma similar à homogeneização a alta pressão, consiste em dividir o fluido em duas correntes sob pressão, as quais são levadas à câmara principal do microfluidizador, e, forças de impacto e cavitação são responsáveis pela formação de gotas nanométricas (Barradas; de Holanda e Silva, 2020; Chaudhary *et al.*, 2020). No entanto, a alta eficiência da câmara permite o uso de pressões mais baixas do que nos dispositivos HAP (Sundar; Parikh, 2023).

Na técnica de ultrassom são produzidas ondas ultrassônicas de alta frequência, maiores que 20 kHz, que promovem a cavitação e vibração mecânica (Jamir *et al.*, 2024). Durante o processo ocorre a formação de microbolhas que se colapsam e rompem a interface óleo-água, dando origem a gotas nanométricas e com distribuição de tamanho homogêneas (Chaudhary *et al.*, 2020; Jamir *et al.*, 2024). Os dispositivos de alta velocidade, como o Ultraturrax, promovem

a mistura dos componentes formadores da nanoemulsão. Esse método é menos eficiente quando comparados a HAP e ao ultrassom (Banasaz *et al.*, 2020), resultando em gotas de maior tamanho. A utilização dos métodos de alta energia na fabricação de nanoemulsões é considerada vantajosa por evitar os fenômenos de instabilidade sem adição de grandes quantidades de agentes estabilizantes (Hanan *et al.*, 2024).

Os métodos de baixa energia são baseados nas propriedades físico-químicas e na energia química interna dos componentes utilizados na fabricação da nanoemulsão. Os métodos de baixa energia incluem emulsificação espontânea e por membrana, emulsificação-evaporação de solvente e inversão de fase por temperatura (Banasaz *et al.*, 2020; Chaudhary *et al.*, 2020; Jamir *et al.*, 2024).

A emulsificação por membrana é um processo em que as gotas são formadas através de uma membrana em direção à fase contínua. É um método que não requer grande quantidade de surfactante, porém a taxa de fluxo da fase dispersa através da membrana é baixa (Banasaz *et al.*, 2020; Pandita *et al.*, 2024). O processo de emulsificação espontânea ocorre quando uma solução contendo água e um surfactante hidrofílico (fase aquosa) são misturadas a uma fase orgânica contendo óleo, um solvente miscível em água e um surfactante lipofílico. A fase orgânica é adicionada lentamente à fase aquosa, o que leva à formação espontânea das gotas devido à rápida difusão do surfactante da fase oleosa para a fase aquosa (Safaya; Rotliwala, 2020). A técnica de emulsificação-evaporação de solvente consiste na mistura da fase aquosa (contendo um surfactante) com a fase orgânica (solvente miscível em água com um emulsificante lipofílico). A emulsão se forma através da rápida difusão do solvente para a fase aquosa e posterior remoção do solvente sob vácuo (Pandita *et al.*, 2024).

A inversão de fase por composição ocorre através da mudança da composição do sistema sob temperatura constante (Jamir *et al.*, 2024). Consiste na adição de um componente, água ou óleo, em uma mistura óleo-surfactante ou água-surfactante, respectivamente, levando a uma mudança nas propriedades hidrofílicas-lipofílicas do sistema, que promove a inversão de fase (Banasaz *et al.*, 2020; Chaudhary *et al.*, 2020). Na técnica de inversão de fase por temperatura, a composição do sistema permanece a mesma, enquanto a temperatura varia com o intuito de mudar a afinidade do surfactante pela fase aquosa. A macroemulsão é preparada em temperatura superior à temperatura de inversão de fase, e quando a mistura água, óleo e surfactante atinge a temperatura de inversão de fase, através de um resfriamento rápido ou diluição repentina em água ou óleo, há a formação das gotas pequenas (Banasaz *et al.*, 2020; Safaya; Rotliwala, 2020).

3 REVESTIMENTOS BIODEGRADÁVEIS

As embalagens são itens essenciais na cadeia de alimentos, desempenhando papel importante na prevenção de danos, manutenção da qualidade e segurança, bem como na redução do desperdício de alimentos. A escolha adequada da embalagem pode reduzir alterações na qualidade dos alimentos, além de retardar o desenvolvimento microbiano, oxidação lipídica e degradação dos nutrientes (Daniloski *et al.*, 2019; Trajkovska Petkoska *et al.*, 2021). Apesar dos inúmeros benefícios fornecidos pelas embalagens, o uso de fontes não renováveis em sua produção e seu descarte de forma inadequada têm afetado diretamente o meio ambiente. Com o intuito de reduzir os danos ambientais causados pelas embalagens convencionais, embalagens biodegradáveis e comestíveis têm sido estudadas como substitutas às embalagens

convencionais, uma vez que os materiais utilizados são renováveis, recicláveis e facilmente degradáveis (Ahmadi *et al.*, 2020; Gupta; Biswas; Roy, 2022).

Filmes e revestimentos são finas camadas de material, com espessura geralmente menor que 0,3 mm, usados para envolver o produto com objetivo de melhorar e fortificar as barreiras do alimento, podendo ser consumidas juntamente com o produto, ou retiradas antes do consumo. Atuam como barreira seletiva de umidade, dióxido de carbono e oxigênio, além de reduzir perda de água, manutenção da textura e qualidade dos alimentos (Chaudhary *et al.*, 2020; Gupta; Biswas; Roy, 2022). Os revestimentos comestíveis são constituídos por pelo menos um biomaterial como proteínas, polissacarídeos e/ou lipídeos, sendo sua aplicação feita diretamente na superfície dos alimentos, formando um filme após a secagem (Al-Tayyar; Youssef; Al-Hindi, 2020). Os materiais utilizados devem obedecer às regulamentações para alimentos (Matloob *et al.*, 2023).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a aplicação de revestimentos nas superfícies dos alimentos. Os métodos mais comumente utilizados são a imersão, espalhamento e pulverização. A homogeneidade do revestimento aplicado dependerá de fatores como tempo de secagem, temperatura e método de aplicação (Chaudhary *et al.*, 2020; Matloob *et al.*, 2023). A pulverização é um método popular utilizado com soluções de viscosidade muito baixa e é aplicado a alta pressão na superfície dos produtos. Entretanto, essa técnica necessita que os produtos sejam virados de “cabeça para baixo”, para que a aplicação do revestimento ocorra de maneira uniforme (Ju *et al.*, 2019). O espalhamento é geralmente empregado quando soluções de revestimento de alta viscosidade são utilizadas. Esse método apresenta desvantagens devido a não uniformidade do revestimento. O teor de umidade e espalhabilidade são importantes para o espalhamento, uma vez que as propriedades de superfície e condições ambientais afetam a aplicação do revestimento (Chaudhary *et al.*, 2020; Gupta; Biswas; Roy, 2022). Outro método aplicado é a imersão, que consiste na submersão do alimento na solução de revestimento, por geralmente 5 a 30 segundos, formando uma camada na superfície do produto, seguida de secagem em temperatura ambiente. A imersão deve ser monitorada para que não ocorra a formação de uma camada muito espessa e, consequentemente, origine condições de anaerobiose (Gupta; Biswas; Roy, 2022; Matloob *et al.*, 2023). O “panning” é um método utilizado em alimentos e fármacos e consiste em uma “panela” ou recipiente rotativo para aplicação completa e uniforme do revestimento. Após a aplicação do revestimento, a secagem é realizada por aumento de temperatura ou uso de ar forçado (Chaudhary *et al.*, 2020).

Os revestimentos comestíveis apresentam vantagens por serem biocompatíveis, não-tóxicos, não poluentes. Além disso, podem servir de carreadores de agentes antimicrobianos, corantes, agentes antiescurecimento e antioxidantes, minimizando os impactos e deterioração dos alimentos (Al-Tayyar; Youssef; Al-Hindi, 2020), sendo neste caso denominados de revestimentos ativos. Os revestimentos ativos contendo compostos antimicrobianos são utilizados com o intuito de reduzir, retardar ou inibir o crescimento de microrganismos na superfície dos alimentos. A adição dos compostos antimicrobianos permite o controle da contaminação microbiana, uma vez que o revestimento ativo previne o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (Gupta; Biswas; Roy, 2022).

A utilização de revestimentos e filmes ativos na indústria de alimentos representam um solução inovadora e alinhada aos princípios do “clean label”, uma vez que esses materiais são elaborados a partir de ingredientes naturais e com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, permitindo a substituição de conservantes sintéticos, que atendem às demandas dos consumidores por alimentos mais saudáveis (Trujillo-Mayol *et al.*, 2021). Além disso, o uso de

revestimentos e filmes ativos na conservação de alimentos pode contribuir para a redução de perdas ao longo da cadeia produtiva, mitigando os impactos ambientais que estão relacionados à perda de recursos naturais (Umaraw *et al.*, 2020). A redução de perdas de alimentos e recursos naturais estão diretamente conectadas aos objetivos da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU) que preconiza o consumo e produção responsáveis, além da erradicação da fome, favorecendo um sistema alimentar sustentável e eficiente (Segovia-Hernández *et al.*, 2023; Walsh; Murphy; Horan, 2020).

3.1 Revestimentos incorporados de nanoemulsões à base de óleos essenciais (OE)

Nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) têm demonstrado um grande potencial como sistemas de entrega de compostos lipofílicos, como óleos essenciais (OE) (Islam *et al.*, 2023). As nanoemulsões podem ser adicionadas diretamente à matriz alimentícia em estado líquido ou podem ser aplicadas como revestimento comestível (RC) na superfície do alimento (Matloob *et al.*, 2023).

Diversos estudos têm sido realizados avaliando os efeitos da utilização de revestimentos incorporados de nanoemulsões contendo óleos essenciais. Fatias de mamão revestidos com nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) apresentaram contagem de bolores e leveduras inferiores a 3 log UFC/g até o 16º dia de armazenamento a 4 °C, enquanto as contagens nas amostras sem revestimento atingiram 8 log UFC/g (Tabassum *et al.*, 2023). Filés de truta revestidos com nanoemulsão de alginato contendo óleo essencial de *Zataria multiflora* apresentaram redução em torno de 2 log/UFC na contagem de viáveis totais, 1 log/UFC na contagem de psicrófilos totais e em torno de 3 log/UFC na contagem de Enterobactereacea (Khanzadi *et al.*, 2020). Das *et al.* (2020) obtiveram resultados semelhantes de redução de bactérias mesófilas, incluindo *Salmonella Typhi* e *Listeria monocytogenes*, em tomates cobertos por um revestimento à base de nanoemulsão e óleo essencial de *Citrus sinensis*. Os tomates revestidos também apresentaram melhora na firmeza e redução na perda de peso. O revestimento à base de nanoemulsão com alginato e óleo essencial de *Trachyspermum ammi* auxiliou na conservação de filés de peru, mantendo a contagem de *Listeria monocytogenes* em torno de 5 log UFC/g, enquanto os filés sem revestimento atingiram contagens superiores a 8,71 log UFC/g nos primeiros 12 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C) (Kazemeini; Azizian; Adib, 2021).

A incorporação de nanoemulsões como revestimentos comestíveis têm demonstrado maior eficácia quando comparadas ao uso de óleos essenciais puros na conservação de alimentos. Mavalizadeh *et al.* (2022) observaram que as contagens de Enterobactereacea foram menores nos filés de frango revestidos com nanoemulsão contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, atingindo 2,98 UFC/g no 6º dia de armazenamento sob refrigeração (4 °C), enquanto os filés com incorporação do óleo essencial puro apresentaram contagens superiores a 3,5 UFC/g.

Uma nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano foi avaliada como antifúngico em queijo Minas Padrão. A nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano apresentou efeito inibitório contra fungos do gênero *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Os autores ainda observaram que a atividade antifúngica é altamente dependente da quantidade de nanoemulsão, tempo de imersão das fatias de queijo e da temperatura de armazenamento (Bedoya-Serna *et al.*, 2018). Comportamento semelhante foi observado para fatias de queijo com baixo teor de gordura revestidas por nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano e fibra de tangerina. Foram identificadas reduções na contagem de *Staphylococcus aureus*, de 6,0

para 4,6 UFC/g após 15 dias, quando utilizado revestimento contendo 2,0% de óleo essencial. O revestimento contendo 2,5% de óleo essencial inibiu o crescimento de psicrófilos e bolores e leveduras por 6 e 24 dias, respectivamente. Além disso, o revestimento preservou a aparência das fatias de queijo ao longo do armazenamento (Artiga-Artigas; Acevedo-Fani; Martín-Belloso, 2017). Nanoemulsão contendo óleo essencial de lavanda foi utilizada para a conservação de cogumelos palhas, e os resultados mostraram que a nanoemulsão previniu o escurecimento e a perda de sólidos do cogumelo, estendendo a vida útil dos cogumelos para 96 horas (Khan *et al.*, 2024). Sun *et al.* (2025) avaliaram o efeito da combinação do ultrassom com a nanoemulsão de óleo essencial de *Litsea cubeba* na inibição de *Salmonella Typhimurium* e nas propriedades físico-químicas do suco de kiwi, e os resultados mostraram uma redução de 3,16 log UFC/mL na contagem microbiana preservando, além disso, o conteúdo de ácido ascórbico e flavonoides. Das e Chaudhary (2025) avaliaram a nanoemulsão de óleo essencial de *Pogostemon cablin* e quitosana como revestimento e seu efeito antibrotamento em batatas, e os resultados indicaram que o revestimento inibiu a brotação, diminuiu a taxa de respiração por 90 dias, e evitou a perda de peso sem afetar as propriedades sensoriais das batatas. A nanoemulsão de óleo essencial de canela foi utilizada na conservação de morangos, e os resultados demonstraram que os morangos imersos na nanoemulsão tiveram sua vida útil estendida para 7 dias e uma menor perda de peso quando comparado aos morangos em tratamento (Zhu *et al.*, 2025).

O uso de nanoemulsões no desenvolvimento de embalagens ativas para alimentos, tem demonstrado resultados promissores, contribuindo para a melhoria da qualidade e valor nutricional dos produtos, além de oferecer proteção contra deteriorações causadas por microrganismos e condições ambientais adversas. No entanto, o uso de revestimentos e filmes ativos pela indústria de alimentos apresenta desafios significativos a serem superados. Entre eles, destaca-se a necessidade de garantir a estabilidade físico-química das nanoemulsões que podem ser afetadas por condições ambientais, bem como o custo elevado associado a escalabilidade do processo (Ahmad; Qurashi; Sheehan, 2023). A regulamentação também é uma barreira crítica, exigindo estudos rigorosos sobre segurança alimentar e toxicologia, cujos requisitos variam entre os países (Ozogul *et al.*, 2022). Outro desafio é a compatibilidade das nanoemulsões com as matrizes alimentares, pois a interação com superfícies alimentares pode comprometer sua funcionalidade. Além disso, a aceitação pelo consumidor pode ser limitada pelo desconhecimento e receio em relação às nanotecnologias (Ahmad; Qurashi; Sheehan, 2023). Superar essas dificuldades requer esforços conjuntos entre pesquisa, desenvolvimento tecnológico e regulamento, permitindo a plena exploração do potencial das nanoemulsões na indústria de alimentos.

4 QUEIJOS E SEUS DESAFIOS DE CONSERVAÇÃO

A conservação e manutenção da qualidade dos queijos é uma questão crucial para a indústria alimentícia, devido as características intrínsecas e a diversidade de tipos desse produto, variando amplamente entre queijos frescos e maturados (Mureşan *et al.*, 2021). A conservação dos queijos é complexa devido a combinação de fatores físico-químicos, microbiológicos e sensoriais, que mudam de acordo com o tipo de queijo, processamento e condições de armazenamento (Nájera *et al.*, 2021). Enquanto os queijos frescos demandam condições de armazenamento rigorosas devido às suas características que o tornam altamente perecíveis, os queijos maturados apresentam desafios na preservação de suas características

sensoriais e estabilidade durante longos períodos de armazenamento (Moula Ali; Sant'Ana; Bavisetty, 2022). Essa diversidade de fatores torna de extrema importância a implementação de estratégias eficazes de conservação para garantir a segurança alimentar desses produtos e atender às demandas por queijos de qualidade.

Os queijos frescos são caracterizados por alto pH, baixo conteúdo de sal, alta atividade de água e elevada umidade, textura macia e vida útil limitada (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2023). Essas características tornam esse tipo de queijo propenso à deterioração por uma gama de microrganismos patogênicos e deteriorantes, que limitam a vida útil desses produtos de poucos dias a poucas semanas, mesmo sob refrigeração (Nájera *et al.*, 2021). Além disso, a ausência de barreira, como cascas ou crostas, permite o desenvolvimento de microrganismos na superfície do produto.

Em contrapartida, os queijos maturados passam por processos de cura que causam modificações em suas características físico-químicas e sensoriais ao longo do tempo (Santiago-López *et al.*, 2018). Durante a maturação ocorre redução na atividade de água, aumento da acidez, e desenvolvimento de compostos aromáticos que conferem certa resistência desses produtos a alguns tipos de microrganismos (Falih *et al.*, 2024; Khattab *et al.*, 2019). Entretanto, apesar dessas características, os queijos maturados também apresentam problemas de conservação, como desenvolvimento de fungos indesejáveis na superfície, além de alterações na textura e sabor, que podem ser acentuadas de acordo com as condições inadequadas de armazenamento.

A contaminação de queijos por microrganismos patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* representam riscos à segurança alimentar dos queijos, uma vez que esses microrganismos estão relacionados a doenças que podem, inclusive, levar à morte, assim como de deteriorantes, como *Escherichia coli*, cuja incidência pode ser indicativa de inadequação de boas práticas higiênico-sanitárias (Fox *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2023). Esses microrganismos podem contaminar o queijo em diferentes etapas da produção, desde a matéria-prima até manuseio e armazenamento. O microrganismo de maior preocupação para esses produtos é a *Listeria monocytogenes*, devido à sua capacidade de crescer mesmo em temperaturas de refrigeração (Falih *et al.*, 2024). Em populações vulneráveis, como idosos, gestantes e imunocomprometidos, a listeriose pode causar infecções sistêmicas, abortos espontâneos e levar ao óbito. Portanto, adotar medidas eficazes de controle e conservação é fundamental para minimizar riscos e garantir a segurança alimentar dos queijos (Ribeiro *et al.*, 2023).

As alterações nas propriedades físico-químicas são outro desafio para a conservação dos queijos. Mudanças na umidade, pH e textura são comuns ao longo do armazenamento e podem afetar diretamente a qualidade dos queijos (Falih *et al.*, 2024; Pieretti *et al.*, 2019). Em queijos frescos, a perda da umidade leva a um aumento da dureza, enquanto em queijos maturados, o desequilíbrio na atividade de água pode causar alterações no processo de maturação, causando modificações sensoriais indesejadas, como alterações de consistência e sabor (Moschopoulou *et al.*, 2019; Zhai *et al.*, 2024). Alterações no pH impactam na estabilidade microbiológica e nas propriedades sensoriais dos queijos, influenciando na aceitação do produto (Moula Ali; Sant'Ana; Bavisetty, 2022).

Problemas durante a produção e conservação inadequada podem impactar diretamente na qualidade sensorial dos queijos, resultando em alterações perceptíveis no sabor, aroma, textura e coloração (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2023). Nos queijos maturados, o desenvolvimento de mofos indesejáveis na superfície e alterações no perfil aromático podem

reduzir a aceitação do produto por parte do consumidor (Moschopoulou *et al.*, 2019). Os problemas sensoriais nos queijos, além de comprometerem a experiência do consumidor, acarretam perdas financeiras significativas para a indústria.

Frente a esses desafios, faz-se necessária a implementação de estratégias eficazes e sustentáveis para a conservação e segurança de queijos. Dessa forma, a busca por métodos naturais de conservação, como uso de óleos essenciais e/ou nanoemulsões de óleos essenciais, emergem como alternativa promissora para mitigar os problemas microbiológicos e físico-químicos, levando à produção de queijos mais saudáveis e com maior qualidade sensorial.

4.1 Queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal (QMF) é uma variedade de queijo fresco, popular e tradicional, produzido e amplamente comercializado no Brasil, apresentando grande importância regional, social e econômica no mercado crescente de queijos não maturados (Ribeiro Júnior *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021). De acordo com a Instrução Normativa nº62, de 30 de dezembro de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o queijo Minas Frescal é o “queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas” (Brasil, 2011). Trata-se de um queijo macio, semigordo, de alta atividade de água, não maturado, com pH variando entre 6,6 e 6,8, baixa concentração de sal (1,4%-1,6%) e sem adição de conservantes. Portanto, sua vida útil dificilmente excede 15 dias armazenado sob condições de refrigeração (Falih *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2021).

A fabricação do queijo Minas Frescal pode ser industrial ou caseira, considerando como caseiro o queijo que é produzido sem qualquer tecnologia mais elaborada e geralmente vendido sem rótulo (Silva *et al.*, 2019; Visotto *et al.*, 2011). A produção desse queijo pode ser realizada em três tipos de processos industriais: (1) tradicional, realizado através da acidificação do leite obtido a partir do crescimento da microbiota láctica e da adição de coalho; (2) acidificação direta, obtida pela adição de ácido láctico e coalho, e (3) adição apenas de coalho (Falih *et al.*, 2024).

Durante a produção do queijo Minas Frescal, algumas etapas de processamento podem facilitar a contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes, principalmente devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Além disso, as características físico-químicas desses queijos, como alta atividade de água e pH em torno de 6,0, exigem um controle adequado desde o início da produção até o consumidor final (Silva *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2024).

Os microrganismos presentes no queijo podem ser oriundos da matéria-prima de má qualidade, ineficácia do processo de pasteurização, contaminação durante o processamento por equipamentos, utensílios e/ou manipuladores e durante armazenamento inadequado. Destacam-se os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Penicillium*, entre outros (Fava *et al.*, 2012). Bolores, leveduras e bactérias do grupo coliformes estão entre os principais responsáveis pela deterioração do queijo (Ahmed *et al.*, 2022; Falih *et al.*, 2024). A Instrução Normativa nº161, de 01 de julho de 2022, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos que determina que, visando garantir a segurança e qualidade microbiológica dos queijos, são necessárias a realização de análises de *Escherichia coli*, *Salmonella*, estafilococos coagulase positiva e enterotoxinas estafilocócicas e bolores e leveduras (Brasil, 2022).

Diferentes estudos identificaram a presença de microrganismos patógenos em queijo Minas Frescal, indicando que a ausência de condições higiênico-sanitárias pode fazer desse alimento um veículo de agentes tóxicos e infecciosos (Ribeiro Júnior *et al.*, 2019, 2024; Silva *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2024). *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* são os microrganismos comumente associados à contaminação de queijo Minas Frescal e considerados um risco à saúde pública (Fox *et al.*, 2017).

5 APLICAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS NANOEMULSÕES NA CONSERVAÇÃO DE QUEIJOS

Os óleos essenciais têm sido amplamente estudados na conservação de diversos tipos de alimentos devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo, portanto, uma alternativa viável para prologar a vida útil e garantir a segurança dos queijos. Os óleos essenciais e as nanoemulsões podem ser adicionadas ao queijo durante a sua fabricação, ou após sua fabricação na forma de revestimento ou filmes ativos.

A aplicação direta é feita diretamente à massa do queijo durante a etapa de fabricação, garantindo que o composto se misture à matriz, podendo ocorrer após a coagulação do leite, durante a etapa de corte da coalhada ou antes da prensagem, para uma incorporação homogênea (Hamouda Ali; Boudriche, 2024; Nunes Silva *et al.*, 2020). A escolha da etapa é crucial para garantir a eficácia antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais na conservação e manutenção da qualidade microbiológica e sensorial do produto final (Dupas *et al.*, 2020; Nunes Silva *et al.*, 2020). Embora a aplicação direta de óleos essenciais e nanoemulsões à massa do queijo seja eficaz, pode apresentar problemas relacionados à homogeneização e impactos sensoriais. Dessa forma, a incorporação desses compostos em forma de revestimentos e filmes ativos oferecem uma alternativa de conservação minimizando possíveis alterações sensoriais (Lima, Rayssa Cruz *et al.*, 2021).

A incorporação de óleos essenciais em queijos tem demonstrado impactos positivos nas propriedades físico-químicas, antioxidantes, antimicrobianas e sensoriais desses alimentos, dependendo do tipo de óleo essencial utilizado e do método de incorporação desses compostos nos queijos. Estudos recentes têm avaliado os efeitos nessas funcionalidades de queijos tratados com óleos essenciais ou nanoemulsões, destacando os avanços na conservação e qualidade desses produtos. As tabelas 2 e 3 apresentam uma compilação de alguns estudos, fornecendo uma visão abrangente sobre a eficácia dessas abordagens na manutenção da qualidade e segurança dos queijos. A Tabela 2 compila os resultados dos óleos essenciais livres adicionados de forma direta ou em revestimentos e filmes ativos e seus efeitos de conservação em diferentes tipos de queijos.

Tabela 2 Efeito da adição de óleos essenciais na conservação de queijos

Tipo de queijo	Óleo essencial	Modo de aplicação	Funcionalidades	Efeitos de conservação	Referência
Cream cheese	<i>Ammoides pusilla</i>	Adição direta	Físico-química, antimicrobiana e sensorial	A adição do OE reduziu a acidez, aumentou a atividade antioxidante, diminuiu a taxa de amareamento e a perda de brilho, inibiu o desenvolvimento de bolores e leveduras, aumentando a vida útil de 16 para 23 dias. A aceitabilidade do cream cheese também aumentou.	Jalloul; Souhail; Abderrabba (2024)
Queijo fresco	Limão (LEO) (<i>Citrus limon L.</i>)	Adição direta	Antimicrobiana e sensorial	A adição do LEO manteve o pH do queijo inalterado ao longo de 28 dias (a 4 °C), reduziu em 0,5 ciclos log a contagem de bactérias mesófilas e impediu o desenvolvimento de <i>E. coli</i> e Enterobacteriaceae durante o armazenamento. Entretanto, adição de 1,25% (m/m) de LEO afetou a aceitabilidade dos queijos.	Hamouda Ali; Boudriche (2024)
Cottage	Orégano (OEO)	Adição direta	Físico-química	A adição do OEO protegeu os ácidos graxos poli-insaturados da oxidação, com menores índices de hidroperóxidos e dienos conjugados, além de reduzir a formação de ácidos orgânicos ao longo de 30 dias de armazenamento	Awasthi; Dwivedi; Patel (2023)
Quark	Orégano (OEO)	Adição direta	Físico-química, antimicrobiana e sensorial	A adição do OE inibiu o desenvolvimento de bolores e leveduras, principalmente a partir do 14º dia de armazenamento (35 dias/4 °C). As características físicas e sensoriais do queijo não foram afetadas, quando comparados ao controle.	Schuh <i>et al.</i> (2022)

Queijo fresco	Orégano (OEO) (<i>Origanum vulgare</i>)	Adição direta	Antimicrobiana e sensorial	O crescimento de <i>S. aureus</i> , bactérias mesófilas e psicrotróficas e coliformes reduziram, mas as contagens não diferiram significativamente do controle nos 8 dias (4 °C) de armazenamento. A adição de OEO não afetou a aceitação sensorial dos queijos.	Santos <i>et al.</i> (2022)
Queijo de ovelha	<i>Murta</i> (MEO) (<i>Myrtus communis</i> L.) <i>Alecrim</i> (AEO) (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	Adição direta	Antimicrobiana	A adição do AEO e MEO previnu o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> nos queijos, mantendo os níveis estáveis ao longo de 28 dias de armazenamento.	Saraiva <i>et al.</i> (2021)
Queijo salgado	<i>Zataria multiflora</i> (ZEO)	Adição direta	Antimicrobiana e sensorial	A combinação de ZEO com <i>Lactobacillus acidophilus</i> adicionados ao queijo inibiu o desenvolvimento de <i>E. coli</i> durante o armazenamento de 60 dias a 4 °C. A pontuação sensorial dos queijos em relação a textura, odor e sabor aumentou.	Mehdizadeh <i>et al.</i> (2018)
Cheddar	Canela (CEO) (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	Filme	Físico-química e antimicrobiana	O filme reduziu a perda de peso e mudanças na coloração dos queijos. O filme contendo 7% (m/m) do OE reduziu 6 log na contagem de <i>E. coli</i> até o 9º dia de armazenamento (4 °C), atingindo completa inativação após 12 dias.	Sharma <i>et al.</i> (2023)
Cheddar	Cravo da índia (CEO)	Filme	Físico-química e antimicrobiana	Queijos revestidos apresentaram perda de peso inferior a 5% após 30 dias, menor perda de brilho e de cor amarela. Durante 30 dias não foi observado desenvolvimento de bolores e leveduras nos queijos embalados com filme ativo.	Perera; Jaiswal; Jaiswal (2023)

Muçarela	Laranja (LEO)	Filme	Antimicrobiana	A adição de 15% (m/m) de OE nos filmes reduziu em 65% o crescimento de <i>E. coli</i> nos primeiros 6 dias, e em 28% do 9º ao 13º dia de armazenamento (4 °C).	Andrade <i>et al.</i> (2023)
Queijo branco iraniano	Cominho (COEO) (<i>Cuminum cyminum</i>)	Filme	Antimicrobiana e sensorial	Os filmes contendo 1 ou 2% (v/v) de OE reduziram 2 log UFC/g nas contagens de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , e 2,5 log UFC/g nas contagens de bolores e leveduras ao longo do armazenamento de 28 dias (4-5 °C). O filme preservou a umidade e não afetou as características sensoriais dos queijos.	Nemati <i>et al.</i> , (2023)
Coalho	Capim-limão (CLEO) (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Filme	Físico-química, antimicrobiana e sensorial	A adição dos filmes reduziu a perda de peso do queijo coalho, sem alterar pH, acidez, umidade e textura ao longo do armazenamento (20 dias/4 °C). As contagens de coliformes totais e aeróbios mesófilos foram reduzidas nos queijos coalhos com o filme de OE. O filme não afetou a aceitabilidade geral do queijo coalho.	Lima <i>et al.</i> (2021)
Queijo de corda	Canela (CNEO)	Membranas adesivas	Antimicrobiana	As membranas com CNEO impediram o crescimento de bolores e leveduras na superfície dos queijos por 8 semanas (4 °C). As membranas suprimiram o crescimento de bactérias mesófilas a partir da segunda semana. Houve redução na contagem de <i>E. coli</i> que foi indetectável ao fim do armazenamento.	Ali; Nada; Al-Moghazy (2021)
Queijo fresco	Orégano (OEO)	Filme	Físico-química e antimicrobiana	A combinação de OEO com nisina no filme previneu o crescimento de coliformes, bactérias mesófilas aeróbias e <i>S. aureus</i> ao	Reyes Méndez <i>et al.</i> (2023)

	<i>(Origanum vulgare)</i>			longo de 14 dias (4 °C), com redução de 2 log nas contagens de <i>S. aureus</i> ao final do armazenamento. Entretanto, os queijos embalados apresentaram maior perda de peso.	
Queijo semiduro	<i>Helichrysum italicum</i> (HIEO)	Revestimento	Antimicrobiana	O revestimento com OE causou a completa redução de <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. aureus</i> após 7 e 14 dias de armazenamento (10 °C). A contagem de <i>E. faecalis</i> se manteve em 1log UFC por 21 dias.	Erceg <i>et al.</i> (2024)
Queijo sem soro (Irã)	<i>Heracleum persicum</i> (HPEO)	Revestimento	Físico-química e antimicrobiana	Queijos revestidos apresentaram redução no crescimento de bactérias aeróbicas mesófilas, psicrotróficas, Enterobacteriaceae, bolores e leveduras durante 56 dias (4°C). O revestimento preservou a cor e a dureza, além de reduzir a perda de peso e oxidação lipídica dos queijos durante o armazenamento.	Rajaei Lak; Bazargani-Gilani; Karami (2024)
Queijo fresco	<i>Satureja khuzestanica</i> Jamzad (SEO)	Revestimento	Antimicrobiana	O revestimento contendo SEO reduziu as contagens de <i>L. monocytogenes</i> e mesófilos em 0,65 e 1,4 log UFC/g em 24 horas após o revestimento. O revestimento reduziu os valores de TBARS e a perda de peso ao longo do armazenamento (15 dias/4 °C). A pontuação de aceitabilidade dos queijos revestidos manteve-se estável durante 15 dias.	Aminian-Dehkordi <i>et al.</i> (2023)
Lighvan	Tomilho (TEO) <i>(Thymus fedtschenkoi</i> Ronniger)	Revestimento	Físico-química, antimicrobiana e sensorial	O revestimento reduziu 2 log na contagem de bactérias psicrotróficas e aeróbias mesófilas, e 1,69 log na contagem de bactérias ácido lácticas nos queijos lighvan armazenados por 42 dias (4 °C). O	Nourmohammadi <i>et al.</i> (2023)

					revestimento controlou o aumento nos valores de peróxido e TBARS. O queijo revestido apresentou valores maiores de aceitação geral ao longo dos 42 dias de armazenamento.	
Kasar	Tomilho (TEO)	Revestimento	Textura e antimicrobiana		As contagens de bolores e leveduras se mantiveram $< 2 \log$ UFC/g no queijo com revestimento com 2% (m/m) de OE. O queijo revestido apresentou dureza menor quando comparado ao queijo sem revestimento.	Erkaya-Kotan <i>et al.</i> (2023)
Queijo ultrafiltrado	Cominho (COEO) (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	Revestimento	Físico-química e antimicrobiana		A combinação do OE com extrato de casca de pepino no revestimento reduziu as contagens de bolores e leveduras e bactérias psicotróficas nos queijos ao longo de 56 dias (4 °C). Além disso, o revestimento preservou a cor, reduziu a perda de peso e diminuiu a dureza dos queijos. Os queijos revestidos apresentaram maior aceitabilidade.	Esparvarini <i>et al.</i> (2022)
Coalho	Orégano (OEO) (<i>Origanum vulgare</i>)	Filme	Antimicrobiana		Filmes com OEO reduziram as contagens de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> em 0,55; 1,08 e 0,95 log UFC/g, respectivamente. A combinação do filme com o tratamento de alta pressão hidrostática reduziu 0,12, 0,97 e 1,20 log UFC/g as contagens de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> na pressão de 300 MPa/5 min, e 0,43, 0,08 e 0,56 nas contagens de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> quando usado 400 MPa/10 min.	Gonçalves <i>et al.</i> (2021)

Resultados promissores têm sido observados na conservação da qualidade de queijos utilizando óleos essenciais como conservantes. No caso dos queijos Cheddar, filmes contendo óleo essencial de canela apresentaram resultados expressivos de conservação pois, além de reduzir a perda de peso e preservar a coloração dos queijos, ainda foi eficaz na inativação de *Escherichia coli* até o 12º dia de armazenamento (Sharma *et al.*, 2023). De forma semelhante, o filme com óleo essencial de cravo-da-Índia aplicado ao mesmo tipo de queijo foi eficaz em inibir o crescimento de bolores e leveduras por um período de 30 dias de armazenamento, preservando o brilho e aparência (Perera; Jaiswal; Jaiswal, 2023). Gonçalves *et al.* (2021) avaliaram o efeito do filme com óleo essencial de orégano e a combinação do filme com o tratamento de alta pressão hidrostática (APH) na conservação de queijo coalho ao longo de 21 dias de armazenamento (5 °C), e os resultados demonstraram que os filmes foram eficazes na redução das contagens de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Entretanto, os efeitos inibitórios foram mais pronunciados quando os filmes foram combinados ao tratamento de APH (300 MPa/5 min).

A incorporação dos óleos essenciais em revestimentos também apresentou resultados satisfatórios. O revestimento contendo óleo essencial de *Helichrysum italicum* eliminaram completamente a *Salmonella Typhimurium* em queijos semiduros após 14 dias de armazenamento refrigerado (4 °C) (Erceg *et al.*, 2024). No caso do queijo Lighvan, o revestimento com óleo essencial de *Thymus fedtschenkoi* Ronniger reduziu as contagens de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas e ácido lálicas, e retardou a oxidação do queijo. Além disso, a adição do óleo essencial aumentou a aceitação do queijo pelo consumidor (Nourmohammadi *et al.*, 2023). Esses resultados reforçam o potencial do uso de revestimentos com óleos essenciais como uma estratégia eficaz pois, ao mesmo tempo que agem na conservação, podem aumentar a aceitação sensorial de queijos.

A adição direta dos óleos essenciais também tem apresentado resultados promissores, embora seja limitada pelas alterações sensoriais. O cream cheese com adição direta de óleo essencial de *Ammoides pusilla* teve o processo de acidificação retardado e o desenvolvimento de bolores e leveduras inibido, ampliando a vida útil do produto de 16 para 23 dias (Jalloul; Souhaiel; Abderrabba, 2024). Da mesma forma, a adição direta de óleo essencial de orégano em queijo fresco inibiu o desenvolvimento de *Escherichia coli* e Enterobacteriaceae durante os 28 dias de armazenamento a 4°C, entretanto essa adição afetou a aceitabilidade do queijo por parte do consumidor (Hamouda Ali; Boudriche, 2024). No caso do queijo tipo Quark, a adição direta do óleo essencial de orégano inibiu o crescimento de bolores e leveduras, especialmente após o 14º dia de armazenamento a 4 °C, sem afetar as características sensoriais (Schuh *et al.*, 2022). Tais pesquisas reforçam que, quando bem dosados, os óleos essenciais podem ser utilizados sem acarretar prejuízos à aceitabilidade dos queijos, fornecendo, ao mesmo tempo, benefícios na conservação físico-química e microbiológica. No contexto das nanoemulsões, os resultados se mostram ainda mais interessantes como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 Efeito da adição de nanoemulsões com fase dispersa contendo óleos essenciais na conservação de queijos

Tipo de queijo	Óleo essencial	Modo de aplicação	Funcionalidades	Efeito de conservação	Referência
Ricota	Coentro (CEO) (<i>Coriandrum sativum L.</i>)	Adição direta	Antimicrobiana	A adição da NE na ricota manteve a contagem de mesófilos em aproximadamente 10^7 UFC/g durante 48 horas de armazenamento.	Cruz <i>et al.</i> (2025)
Karish	Alecrim (AEO) (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Adição direta	Antimicrobiana	Redução de 100% na contagem de <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , e <i>P. aeruginosa</i> em 5, 10 e 7 dias, respectivamente, e 96% para <i>A. flavus</i> em 7 dias. A qualidade do queijo ao longo do armazenamento (28 dias/4°C) não foi afetada.	Gadallah <i>et al.</i> (2024)
Queijo fresco	Laranja (LEO)	Adição direta	Antimicrobiana	A adição de nanoemulsão diminuiu a contagem de coliformes totais, mesófilos aeróbios e bolores e leveduras nos queijos armazenados por 45 dias (4 °C)	Pérez-Soto <i>et al.</i> (2021)
Karish	Tomilho (TEO)	Revestimento	Antimicrobiana e sensorial	O revestimento com a NE (2% (v/v) TEO) reduziu as contagens de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> a níveis não detectáveis ao fim do armazenamento de 4 semanas (4 °C). O uso de revestimento aumentou as notas de flavor e aceitação dos queijos na análise sensorial.	Kader; Rashed; Mohamed (2024)
Queijo Ras	Moringa (MGEO)	Revestimento	Barreira e Antimicrobiana	Queijos revestidos apresentaram menor perda de peso e umidade. Desenvolvimento de bolores na superfície dos queijos revestidos não foi observado ao longo de 90 dias/12 °C.	Mohamed Adel (2023)
Kasar	Murta (MEO)	Revestimento	Antimicrobiana e Sensorial	Revestimentos contendo 1,0% e 2,0% (m/m) de óleo essencial de murta reduziram	Polat Yemiş; Sezer; Sıçramaz (2022)

	<i>(Myrtus communis L.)</i>			a população de <i>L. monocytogenes</i> durante o armazenamento em 0,42 e 0,88 log UFC/g, respectivamente. A aceitação global dos queijos reduziu com a adição do revestimento com NE.	
Queijo branco	Cominho (COEO) (<i>Cuminum cyminum L.</i>)	Revestimento	Antimicrobiana e sensorial	Leveduras, bolores e contagens de psicrotróficos não foram detectadas no queijo conservado em nanoemulsão com 1% (m/m) do OE durante todo o período de armazenamento até 60 dias. A aceitação sensorial foi melhor para queijos com NE com 0,5 e 0,75% (m/m) do OE.	El-Sayed; El-Sayed (2021)
Queijo Minas Padrão	Orégano (OEO) (<i>Origanum vulgare</i>)	Revestimento	Antimicrobiana	A NE foi capaz de inibir o crescimento de <i>Cladosporium</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp. durante 30 dias de armazenamento, e inibiu o crescimento de <i>Penicillium</i> sp. até o sétimo dia de armazenamento.	Bedoya-Serna <i>et al.</i> (2018)
Queijo magro	Orégano (OEO)	Revestimento	Antimicrobiana	A contagem de <i>S. aureus</i> diminuiu 1,4 e 1,5 UFC/g no queijo revestido com NE contendo 2,0 e 2,5% m/m de OE, respectivamente, após 15 dias de armazenamento (4 °C). A NE com 2,5% m/m de OE inibiu o crescimento de bactérias psicrófilas e bolores e leveduras por 6 ou 24 dias, respectivamente.	Artiga-Artigas; Acevedo-Fani; Martín-Belloso (2017)
Queijo branco	Orégano (OEO) (<i>Origanum minutiflorum</i>)	Revestimento	Barreira	Queijos revestidos apresentaram menor perda de peso (20%) ao longo de 21 dias quando comparados a queijos sem revestimento (35%).	Miljković <i>et al.</i> (2017)

As nanoemulsões de óleos essenciais têm se mostrado eficientes na conservação de queijos. Um exemplo disso é o uso de revestimentos contendo nanoemulsões de óleo essencial de manjerona em queijos ultrafiltrados, que reduziu de forma significativa as contagens de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* armazenados por 9 dias sob refrigeração (4 °C) (Mohammadi Jarchelo; Hosseini Ghaboos; Almasi, 2022). Queijos Ras revestidos com nanoemulsão contendo óleo essencial de moringa apresentaram menor perda de peso e umidade, além de não apresentarem desenvolvimento superficial de bolores e leveduras ao longo de 90 dias armazenados a 12 °C (Mohamed Adel, 2023). Esses estudos ressaltam as vantagens de veicular óleos essenciais em nanoemulsões, permitindo uma atuação mais eficaz na preservação dos queijos. Além disso as nanoemulsões podem reduzir a quantidade de óleo essencial necessária para a conservação, minimizando os impactos sensoriais.

Apesar dos inúmeros benefícios conferidos pela encapsulação dos óleos essenciais em nanoemulsões, é necessário controle e otimização das formulações a fim de equilibrar as eficáciais antioxidantes e antimicrobianas com a preservação das características sensoriais do produto. Um estudo relevante é o de queijos Kasar, em que o revestimento com óleo essencial de murta exerceu um controle no crescimento de *Listeria monocytogenes* em duas concentrações diferentes de óleo essencial, entretanto a concentração mais alta (2 % m/m) afetou negativamente a aceitação sensorial do queijo (Polat Yemiş; Sezer; Sıçramaz, 2022). Entretanto, o queijo Karish revestido com nanoemulsão de óleo de tomilho foi percebido pelo consumidor com um *flavor* melhor, impactando positivamente na aceitação do produto (Kader; Rashed; Mohamed, 2024). El-Sayed e El-Sayed (2021) observaram que apesar da inibição de bolores e leveduras e bactérias psicrotróficas em queijo branco promovida pelo revestimento com nanoemulsão com 1% (m/m) de óleo essencial de cominho, a aceitação sensorial dos queijos foi maior quando o revestimento com 0,5 ou 0,75% (m/m) de óleo essencial (menor concentração) foi usado. De forma geral, a utilização das nanoemulsões de óleos essenciais foi eficaz na preservação da cor, textura e umidade dos queijos, impactando em menor grau nas propriedades sensoriais.

Esses resultados demonstraram que apesar dos desafios da utilização direta dos óleos essenciais na conservação de queijos, principalmente os impactos sensoriais, as nanoemulsões oferecem uma alternativa para mitigar essas limitações. Além do mais, os revestimentos e filmes ativos com óleos essenciais têm apresentado um grande potencial não apenas no aprimoramento das técnicas de conservação para queijos, mas também na preservação das características físico-químicas e sensoriais, prolongando a vida útil dos queijos, e atendendo às demandas da indústria e dos consumidores por produtos mais naturais, saudáveis e seguros.

6 CONCLUSÃO

A utilização de nanoemulsões em revestimentos e filmes ativos destaca-se como uma abordagem promissora na conservação de alimentos, inclusive e dos queijos, ao combinar a eficácia antimicrobiana e antioxidante com atributos sustentáveis e alinhados às exigências do mercado de produtos mais naturais e saudáveis e seguros. Esses materiais, elaborados com compostos bioativos como óleos essenciais, não apenas garantem maior proteção contra deterioração microbiana e condições ambientais adversas, mas também contribuem para a preservação das características físico-químicas e sensoriais dos alimentos, fundamentais para a aceitação dos consumidores.

No entanto, a aplicabilidade em larga escala ainda enfrenta uma série de desafios, como a necessidade de garantir a estabilidade físico-química das nanoemulsões sob diferentes condições ambientais, o custo elevado dos processos de produção, além das barreiras regulatórias que demandam estudos rigorosos de segurança alimentar e toxicologia. A compatibilidade das nanoemulsões com diferentes matrizes alimentares e a aceitação do consumidor, muitas vezes limitada pelo desconhecimento acerca de nanotecnologia, são outros aspectos que requerem atenção e soluções estratégicas.

Mesmo diante de tantos desafios, os resultados de estudos científicos evidenciam que a incorporação de nanoemulsões pode representar uma revolução na conservação de alimentos, e de queijos em particular, promovendo uma abordagem sustentável que reduz perdas ao longo da produção e atende às metas globais da Agenda 2030 da ONU, como consumo sustentável e redução do desperdício de alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. CRUZ, Gizele *et al.* Nanoemulsion of Kefiran and Coriander (*Coriandrum sativum L.*) Essential Oil: Chemical and Technological Aspects. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], 2025. Disponível em: https://jbcs.sbn.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=12816&nomeArquivo=2024-0202AR.pdf.
- AHMAD, Atika; QURASHI, Ahsanulhaq; SHEEHAN, David. Nano packaging – Progress and future perspectives for food safety, and sustainability. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 35, p. 100997, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214289422001892>.
- AHMADI, Parisa *et al.* Development of Ethyl Cellulose-based Formulations: A Perspective on the Novel Technical Methods. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1741007>, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2020.1741007>. Acesso em: 7 set. 2021.
- AHMED, Abeer *et al.* Detection of some microorganisms of public health hazards in cheese. **الباحثين الشباب سوهاج مجلة**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 33–43, 2022. Disponível em: https://sjyr.journals.ekb.eg/article_228847.html.
- AL-TAYYAR, Nasser A.; YOUSSEF, Ahmed M.; AL-HINDI, Rashad R. **Edible coatings and antimicrobial nanoemulsions for enhancing shelf life and reducing foodborne pathogens of fruits and vegetables: A review**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020.
- ALGAHTANI, Mohammed S.; AHMAD, Mohammad Zaki; AHMAD, Javed. Investigation of Factors Influencing Formation of Nanoemulsion by Spontaneous Emulsification: Impact on Droplet Size, Polydispersity Index, and Stability. **Bioengineering**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 384, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-5354/9/8/384>.
- ALI, Eman AboBakr; NADA, Ahmed A.; AL-MOGHAZY, Marwa. Self-stick membrane based on grafted gum Arabic as active food packaging for cheese using cinnamon extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 189, p. 114–123, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181302101730X>.
- ALIZADEH BEHBAHANI, Behrooz; NOSHAD, Mohammad; FALAH, Fereshteh. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 136, p. 103716, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401019314020>. Acesso em: 17 mar. 2021.
- ALSHERBINY, Muhammad A. *et al.* **Ameliorative and protective effects of ginger and its main constituents against natural, chemical and radiation-induced toxicities: A comprehensive review**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019.
- AMINIAN-DEHKORDI, Arezou *et al.* Layer-by-Layer Coating Approach Based on Sodium Alginate, Sage Seed Gum, and Savory Oil: Shelf-Life Extension of Fresh Cheese. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 1149–1164, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11947-022-02990-2>.

ANDRADE, Michelle Félix de *et al.* Active antimicrobial extruded films for mozzarella cheese from poly (butylene adipate co-terephthalate) (PBAT) and orange oil. **Polímeros**, [s. l.], v. 33, n. 2, 2023. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282023000200402&tlang=en.

ARTIGA-ARTIGAS, María; ACEVEDO-FANI, Alejandra; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. **Food Control**, [s. l.], v. 76, p. 1–12, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517300014>.

ASADINEZHAD, Shabnam *et al.* Effect of different parameters on orange oil nanoemulsion particle size: combination of low energy and high energy methods. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 2501–2509, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00170-z>. Acesso em: 24 mar. 2021.

ASBAHANI, A. El *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517314009661>.

AWASTHI, Aishwary; DWIVEDI, Shubha; PATEL, K. G. Organic Cottage Cheese Reliability Maintenance Using Oregano Essential Oils. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 18–24, 2023.

BANASAZ, Shahin *et al.* **Encapsulation of Lipid-Soluble Bioactives by Nanoemulsions**. [S. l.]: MDPI AG, 2020. Disponível em: www.mdpi.com/journal/molecules. Acesso em: 1 mar. 2021.

BARRADAS, Thaís Nogueira; DE HOLANDA E SILVA, Katty Gyselle. **Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review**. [S. l.]: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01142-2>. Acesso em: 1 mar. 2021.

BASUMATARY, Indra Bhushan *et al.* Chitosan-based active coating for pineapple preservation: Evaluation of antimicrobial efficacy and shelf-life extension. **LWT**, [s. l.], v. 168, p. 113940, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643822008751>.

BEDOYA-SERNA, Carolina M *et al.* Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: in vitro study and application in Minas Padrão cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 929–935, 2018. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838218301242>.

BRASIL. Ministério do Saúde. Instrução Normativa N° 161, de 01 de julho de 2022. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 jul. 2022, Seção I, Edição 126, p. 235 - 246.

BRASIL. Instrução Normativa No 62, de 29 de Dezembro de 2011. Alterar a Instrução

Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez., 2011. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=6&data=30/12/2011>>.

CARPENA, Maria *et al.* Essential Oils and Their Application on Active Packaging Systems: A Review. **Resources**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 7, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-9276/10/1/7>. Acesso em: 15 mar. 2021.

CHAUDHARY, Sahil *et al.* Chitosan nanoemulsions as advanced edible coatings for fruits and vegetables: Composition, fabrication and developments in last decade. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 152, p. 154–170, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020304463>.

CHOI, Inyoung *et al.* Characterization of ionically crosslinked alginate films: Effect of different anion-based metal cations on the improvement of water-resistant properties. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 131, p. 107785, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X22003058>.

CHU, Yifu *et al.* Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsion. **LWT**, [s. l.], v. 122, p. 109054, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643820300426>.

DA SILVA, Bruno Dutra *et al.* Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. **Meat Science**, [s. l.], v. 176, p. 108463, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174021000395>.

DANILOSKI, Davor *et al.* The effect of barrier properties of polymeric films on the shelf-life of vacuum packaged fresh pork meat. **Meat Science**, [s. l.], v. 158, p. 107880, 2019.

DANNENBERG, Guilherme da Silva *et al.* Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 81, p. 314–318, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817302219>.

DAS, Shatabdi *et al.* Sodium alginate-based edible coating containing nanoemulsion of Citrus sinensis essential oil eradicates planktonic and sessile cells of food-borne pathogens and increased quality attributes of tomatoes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 162, p. 1770–1779, 2020.

DAS, Somenath; CHAUDHARI, Anand Kumar. Efficacy of Pogostemon cablin essential oil loaded chitosan nanoemulsion as novel coating agent for inhibition of potato sprouting and maintenance of storage quality. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 463, p. 141400, 2025. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814624030504>.

DONSI, Francesco; FERRARI, Giovanna. **Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2016.

DOS SANTOS CAVALCANTI, Adriano *et al.* Volatiles composition and extraction kinetics from Schinus terebinthifolius and Schinus molle leaves and fruit. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 356–362, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X15001246>.

DUPAS, Coralie *et al.* Plants: A natural solution to enhance raw milk cheese preservation?. **Food Research International**, [s. l.], v. 130, p. 108883, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919307690>.

EL-SAYED, Hoda S.; EL-SAYED, Samah M. A modern trend to preserve white soft cheese using nano-emulsified solutions containing cumin essential oil. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, [s. l.], v. 16, p. 100499, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221515322100074X>.

ERCEG, Tamara *et al.* Preparation and characterization of carboxymethylated pullulan/butyric acid-modified chitosan active sustainable bi-layer coatings intended for packaging of cheese slices. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 277, p. 134053, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181302404858X>.

ERKAYA-KOTAN, Tuba *et al.* Utilization of edible coating based on quince seed mucilage loaded with thyme essential oil: Shelf life, quality, and ACE-inhibitory activity efficiency in Kaşar cheese. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 54, p. 102895, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429223005461>.

ESPARVARINI, Zahra *et al.* Gelatin-starch composite coating containing cucumber peel extract and cumin essential oil: Shelf life improvement of a cheese model. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 964–978, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fsn3.2730>.

FALIH, Mohammed A. *et al.* Enhancing safety and quality in the global cheese industry: A review of innovative preservation techniques. **Helijon**, [s. l.], v. 10, n. 23, 2024. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S2405844024164900/fulltext>. Acesso em: 20 jan. 2025.

FAVA, L. W. et al. Características de queijos artesanais tipo colonial comercializados em uma feira agropecuária. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, p. 1-6, 2012. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/2890/289023924019.pdf>>.

FOX, Patrick F. *et al.* **Fundamentals of Cheese Science**. Boston, MA: Springer US, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7681-9>.

GADALLAH, Ahmed Hussein *et al.* Application of rosemary oil nano-emulsion as antimicrobial and antioxidant natural alternative in pasteurized cream and Karish cheese. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 422, p. 110823, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160524002678>.

GALVÃO, K C S; VICENTE, A A; SOBRAL, P J A. Development, Characterization, and Stability of O/W Pepper Nanoemulsions Produced by High-Pressure Homogenization. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 355–367, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2016-y>.

GONÇALVES, Sheyla M *et al.* Antimicrobial packaging and high hydrostatic pressure: Combined effect in improving the safety of coalho cheese. **Food Science and Technology International**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 301–312, 2021. Disponível em:

[https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1082013220953238.](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1082013220953238)

GOUVEA, Fabiola dos Santos; ROSENTHAL, Amauri; FERREIRA, Elisa Helena da Rocha. **Extractos vegetais e óleos essenciais adicionados a queijos como antimicrobianos: Uma revisão.** [S. l.]: Universidade Federal de Santa Maria, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160908>. Acesso em: 11 mar. 2021.

GUERRA-ROSAS, M. I. *et al.* Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. **Food Control**, [s. l.], v. 77, p. 131–138, 2017.

GUPTA, Vatsla; BISWAS, Deblina; ROY, Swarup. A Comprehensive Review of Biodegradable Polymer-Based Films and Coatings and Their Food Packaging Applications. **Materials**, [s. l.], v. 15, n. 17, p. 5899, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/17/5899>.

HAMOUDA ALI, Imane; BOUDRICHE, Lilya. LEMON LEAF ESSENTIAL OIL AS NATURAL FOOD PRESERVATIVE IN FRESH CHEESE. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, [s. l.], p. e10472, 2024. Disponível em: <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/10472>.

HANAN, Entesar *et al.* New insights into essential oil nano emulsions loaded natural biopolymers recent development, formulation, characterization and packaging applications: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 280, p. 135751, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813024065590>.

ISLAM, Fakhar *et al.* Food grade nanoemulsions: promising delivery systems for functional ingredients. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 1461–1471, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s13197-022-05387-3>.

JAIN, Harsha; CHELLA, Naveen. Methods to improve the solubility of therapeutical natural products: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 111–121, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10311-020-01082-x>.

JALLOUL, Amel ben; SOUHAIEL, Najet; ABDERRABBA, Manef. Application of Ammoides Pusilla as a Natural Food Preservative for Shelf-Life Extension of Cream Cheese. **Journal of Culinary Science & Technology**, [s. l.], p. 1–20, 2024. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15428052.2024.2303001>.

JAMIR, Yangerdenla *et al.* Plant-based essential oil encapsulated in nanoemulsions and their enhanced therapeutic applications: An overview. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 415–433, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.28590>.

JU, Jian *et al.* Application of edible coating with essential oil in food preservation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 59, n. 15, p. 2467–2480, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2018.1456402>.

KADER, Rania A. Abdel; RASHED, Dina M.; MOHAMED, Salma S.E. EVALUATION OF THE EFFECT OF THYME OIL NANOPARTICLES ON THE SHELF LIFE OF KARISH

CHEESE. **Assiut Veterinary Medical Journal**, [s. l.], v. 70, n. 180, p. 162–173, 2024. Disponível em: https://avmj.journals.ekb.eg/article_332365.html. Acesso em: 20 nov. 2024.

KAZEMEINI, Hamidreza; AZIZIAN, Asghar; ADIB, Hasti. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in turkey fillets by alginate edible coating with *Trachyspermum ammi* essential oil nano-emulsion. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 344, p. 109104, 2021.

KHAN, Asif Ali *et al.* Fabrication and characterization of bioactive curdlan and sodium alginate films for enhancing the shelf life of *Volvariella volvacea*. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 62, p. 105137, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429224015670>.

KHANZADI, Saeid *et al.* Alginate coarse/nanoemulsions containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil as edible coatings and the impact on microbial quality of trout fillet. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 873–881, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/are.14418>. Acesso em: 1 mar. 2021.

KHATTAB, Amira R. *et al.* Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 88, p. 343–360, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224419300597>.

LI, Siqi *et al.* Development of antibacterial nanoemulsions incorporating thyme oil: Layer-by-layer self-assembly of whey protein isolate and chitosan hydrochloride. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 339, p. 128016, 2021.

LIMA, Antonia Elaine Frutuoso *et al.* Development and application of galactomannan and essential oil-based edible coatings applied to “coalho” cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 45, n. 1, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.15091>.

LIMA, Rayssa Cruz *et al.* Green and Healthier Alternatives to Chemical Additives as Cheese Preservative: Natural Antimicrobials in Active Nanopackaging/Coatings. **Polymers**, [s. l.], v. 13, n. 16, p. 2675, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/16/2675>.

LIU, Qingqing *et al.* Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability and Application in Encapsulation of Bioactive Compounds. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 23, p. 4242, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/23/4242>.

LOCALI-PEREIRA, Adilson Roberto *et al.* Active packaging for postharvest storage of cherry tomatoes: Different strategies for application of microencapsulated essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 29, p. 100723, 2021.

LOCALI-PEREIRA, Adilson Roberto; LOPES, Nathalie Almeida; NICOLETTI, Vânia Regina. Pink Pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) from Extracts to application: Truths about a Fake Pepper. **Food Reviews International**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 5185–5214, 2023. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2022.2062767>.

MARHAMATI, Masoumeh; RANJBAR, Golnaz; REZAIE, Mitra. Effects of emulsifiers on the physicochemical stability of Oil-in-water Nanoemulsions: A critical review. **Journal of**

Molecular Liquids, [s. l.], v. 340, p. 117218, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732221019425>.

MARIA NETO, Rebeca *et al.* Steam distillation, supercritical fluid extraction, and anti-Trypanosoma cruzi activity of compounds from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Natural Product Research**, [s. l.], p. 1–9, 2024. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2024.2371108>.

MATLOOB, Anam *et al.* A Review on Edible Coatings and Films: Advances, Composition, Production Methods, and Safety Concerns. **ACS Omega**, [s. l.], v. 8, n. 32, p. 28932–28944, 2023. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.3c03459>.

MAVALIZADEH, A. *et al.* The effect of separate and combined treatments of nisin, *Rosmarinus officinalis* essential oil (nanoemulsion and free form) and chitosan coating on the shelf life of refrigerated chicken fillets. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 4497–4513, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-022-01541-9>. Acesso em: 31 mar. 2023.

MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C2SM06903B>.

MCCLEMENTS, David Julian; JAFARI, Seid Mahdi. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. In: **NANOEMULSIONS**. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 3–20. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128118382000011>.

MCCLEMENTS, David Julian; RAO, Jiajia. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011. Disponível em: <https://www.tandfonline.ez30.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1080/10408398.2011.559558>. Acesso em: 2 mar. 2021.

MEHDIZADEH, Tooraj *et al.* Antimicrobial effects of *Zataria multiflora* essential oil and *Lactobacillus acidophilus* on *Escherichia coli* O157 stability in the Iranian probiotic white-brined cheese. **Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 38, n. 4, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfs.12476>.

MENEGALI, Beatriz Schmidt *et al.* Pink pepper extract as a natural antioxidant in chicken burger: Effects on oxidative stability and dynamic sensory profile using Temporal Dominance of Sensations. **LWT**, [s. l.], v. 121, p. 108986, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819313283>.

MILJKOVIĆ, Miona *et al.* The use of nanoemulsion-based edible coatings to prolong the shelflife of cheese. **Journal of International Scientific Publications Agriculture & Food**, [s. l.], v. 5, p. 131–138, 2017. Disponível em: <https://technorep.tmf.bg.ac.rs/handle/123456789/6247>. Acesso em: 19 nov. 2024.

MOHAMED ADEL, Khaled. Development of CS/WPC/MO-NE bionanocomposites for coating Ras cheese based on *Moringa* essential oil nanoemulsion. **Al-Azhar Journal of Agricultural Research**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 41–53, 2023. Disponível em:

https://ajar.journals.ekb.eg/article_316055.html. Acesso em: 19 nov. 2024.

MOHAMMADI JARCHELO, H.; HOSSEINI GHABOOS, S. H.; ALMASI, H. Investigation of the physical properties of gluten-based active film containing free and encapsulated Marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil and evaluation of its performance in the control of microbial spoilage in UF cheese and red meat. **Journal of food science and technology (Iran)**, [s. l.], v. 19, n. 130, p. 121–129, 2022. Disponível em: <http://fsct.modares.ac.ir/article-7-62575-en.html>. Acesso em: 19 nov. 2024.

MOSCHOPOULOU, E. *et al.* Food quality changes during shelf life. In: FOOD QUALITY AND SHELF LIFE. [s. l.]: Elsevier, 2019. p. 1–31. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012817190500001X>.

MOULA ALI, Ali Muhammed; SANT'ANA, Anderson S.; BAVISETTY, Sri Charan Bindu. Sustainable preservation of cheese: Advanced technologies, physicochemical properties and sensory attributes. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 129, p. 306–326, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224422004095>.

MUREŞAN, Crina Carmen *et al.* Changes in Physicochemical and Microbiological Properties, Fatty Acid and Volatile Compound Profiles of Apuseni Cheese during Ripening. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 258, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/2/258>.

MUSHTAQ, Abeeda *et al.* Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. **Food Chemistry: X**, [s. l.], v. 18, p. 100684, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590157523001268>.

NÁJERA, Ana Isabel *et al.* A Review of the Preservation of Hard and Semi-Hard Cheeses: Quality and Safety. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 18, n. 18, p. 9789, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/18/9789>.

NAZZARO, Filomena *et al.* Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1451>. Acesso em: 17 mar. 2021.

NEMATI, Vaez *et al.* Application of a Whey Protein Edible Film Incorporated with Cumin Essential Oil in Cheese Preservation. **Coatings**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1470, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6412/13/8/1470>.

NI, Zhi-Jing *et al.* Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 110, p. 78–89, 2021.

NOURMOHAMMADI, Azadeh *et al.* The effects of whey protein/nanoclay biocomposite containing Thymus fedtschenkoi Ronniger essential oil and resveratrol on the shelf life of liqvan cheese during refrigerated storage. **LWT**, [s. l.], v. 187, p. 115175, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643823007545>.

NUNES SILVA, Beatriz *et al.* Effects of Essential Oils on *Escherichia coli* Inactivation in Cheese as Described by Meta-Regression Modelling. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 716, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/6/716>.

OLIVEIRA, Kátia C. *et al.* Essential Oil from the Leaves, Fruits and Twigs of *Schinus terebinthifolius*: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Potential. **Molecules**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 469, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/2/469>.

OLIVEIRA FILHO, Josemar Gonçalves de *et al.* Novel Approach for Improving Papaya Fruit Storage with Carnauba Wax Nanoemulsion in Combination with *Syzygium aromaticum* and *Mentha spicata* Essential Oils. **Coatings**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 847, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6412/13/5/847>.

OLIVEIRA JÚNIOR, L. F.G. *et al.* Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 150–157, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722013000100021&lng=en&nrm=iso&tlang=pt. Acesso em: 19 abr. 2021.

OZOGUL, Yesim *et al.* Recent developments in industrial applications of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 304, p. 102685, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868622000872>.

PANDITA, Ghumika *et al.* Recent progress on Pickering emulsion stabilized essential oil added biopolymer-based film for food packaging applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 269, p. 132067, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813024028721>.

PAVONI, Lucia *et al.* An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 135, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/1/135>. Acesso em: 9 abr. 2021.

PERERA, Kalpani Y.; JAISWAL, Amit K.; JAISWAL, Swarna. Extending cheese shelf-life using eco-friendly sodium alginate-gelatin films reinforced with nanoclay. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 56, p. 103304, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429223009550>.

PÉREZ-SOTO, Elizabeth *et al.* The Addition of Microencapsulated or Nanoemulsified Bioactive Compounds Influences the Antioxidant and Antimicrobial Activities of a Fresh Cheese. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 2170, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/8/2170>.

PERUMAL, Anand Babu *et al.* Application of essential oils in packaging films for the preservation of fruits and vegetables: A review. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 375, p. 131810, 2022.

PIERETTI, Gabriella Giani *et al.* Effect of an edible alginate coating with essential oil to improve the quality of a Fresh cheese. **Acta Scientiarum. Technology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 36402, 2019. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/36402>.

PIROZZI, Annachiara *et al.* Edible Coatings Containing Oregano Essential Oil Nanoemulsion for Improving Postharvest Quality and Shelf Life of Tomatoes. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1605, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/11/1605>.

POLAT YEMİŞ, Gökçe; SEZER, Elif; SIÇRAMAZ, Hatice. Inhibitory Effect of Sodium Alginate Nanoemulsion Coating Containing Myrtle Essential Oil (*Myrtus communis L.*) on *Listeria monocytogenes* in Kasar Cheese. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 21, p. 7298, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/21/7298>.

PRAKASH, Anand *et al.* **Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2018.

PRAKASH, Anand; BASKARAN, Revathy; VADIVEL, Vellingeri. Citral nanoemulsion incorporated edible coating to extend the shelf life of fresh cut pineapples. **LWT**, [s. l.], v. 118, p. 108851, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819311934>.

RAJAEI LAK, Hadis; BAZARGANI-GILANI, Behnaz; KARAMI, Mostafa. Different coating application methods: Zein-based edible coating containing *Heracleum persicum* essential oil for shelf-life enhancement of whey-less cheese. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 5990–6010, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fsn3.4269>.

REHMAN, Abdur *et al.* Pesticide-loaded colloidal nanodelivery systems; preparation, characterization, and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 298, p. 102552, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868621001937>.

REYES MÉNDEZ, Laura María *et al.* Active chitosan/gelatin-based films and coatings containing eugenol and oregano essential oil for fresh cheese preservation. **Journal of Food Process Engineering**, [s. l.], v. 46, n. 11, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpe.14396>.

RIBEIRO-SANTOS, Regiane; ANDRADE, Mariana; SANCHES-SILVA, Ana. **Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2017.

RIBEIRO, Alessandra Casagrande *et al.* *Listeria monocytogenes*: An Inconvenient Hurdle for the Dairy Industry. **Dairy**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 316–344, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2624-862X/4/2/22>.

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos *et al.* Perfil do consumidor brasileiro e hábitos de consumo de leite e derivados. **Archives of Veterinary Science**, [s. l.], v. 25, n. 2, 2020. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/72429>.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* Short communication: Molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 102, n. 12, p. 10850–10854, 2019.

RIBEIRO JÚNIOR, J.C. *et al.* Toxigenic characterization, spoilage potential, and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococcus* species isolated from Minas Frescal cheese. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 1386–1396, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030223007361>.

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y.C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 27, p. 454–459, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214785319339537>.

SALDAÑA, Erick *et al.* Sensory and hedonic impact of the replacement of synthetic antioxidant for pink pepper residue extract in chicken burger. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 617–627, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04093-x>.

SANTIAGO-LÓPEZ, Lourdes *et al.* Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 101, n. 5, p. 3742–3757, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218301462>.

SANTOS, Isabela Carvalho dos *et al.* *Origanum vulgare* extract as a natural additive in fresh cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 1705–1720, 2022. Disponível em: <https://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/44601>.

SARAIVA, Cristina *et al.* Antimicrobial Activity of *Myrtus communis* L. and *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils against *Listeria monocytogenes* in Cheese. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1106, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/5/1106>.

SCHUH, Janaina *et al.* Basil, marjoram, nutmeg and oregano essential oils as natural preservatives of Quark-type cheese. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 42, 2022. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612022000101209&tlang=en.

SEGOVIA-HERNÁNDEZ, Juan Gabriel *et al.* Challenges and opportunities in process intensification to achieve the UN's 2030 agenda: Goals 6, 7, 9, 12 and 13. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, [s. l.], v. 192, p. 109507, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270123002441>.

SHARMA, Shubham *et al.* Active film packaging based on bio-nanocomposite TiO2 and cinnamon essential oil for enhanced preservation of cheese quality. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 405, p. 134798, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814622027601>.

SHARMA, Shubham *et al.* **Essential oils as additives in active food packaging**. [s. l.]: Elsevier Ltd, 2021.

SHARMA, Palak *et al.* Physicochemical and thermal characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) films incorporating thyme essential oil for active packaging of white bread. **Food Control**, [s. l.], v. 133, p. 108688, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713521008264>.

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

SILVA, Renato F. da. A Difração de Raios X: uma Técnica de Investigação da Estrutura

Cristalina de Materiais. **Revista Processos Químicos**, [s. l.], v. 14, n. 27, p. 73–82, 2020. Disponível em: http://ojs.rpqsenai.org.br/index.php/rpq_n1/article/view/577.

SILVA, Simone Faria *et al.* Impact of different modified atmosphere packaging on quality parameters and probiotic survival during storage of Minas Frescal cheese. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 43, p. 101338, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429221004636>.

SILVA, Cíntia B. *et al.* Microbiological quality and cultivable bacterial community of fresh and ripened Minas cheeses made from raw and pasteurised milk. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 143, p. 105662, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095869462300081X>.

SILVA, Thamiris Evangelista *et al.* Shelf life study of handmade and industrially processed Minas frescal cheese. **Nutrition & Food Science**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 1207–1218, 2019. Disponível em: <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/NFS-12-2018-0359/full/html>.

SONI, Monisha *et al.* Advances in Designing Essential Oil Nanoformulations: An Integrative Approach to Mathematical Modeling with Potential Application in Food Preservation. **Foods**, [s. l.], v. 12, n. 21, p. 4017, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/21/4017>.

SOUZA, Estefania Júlia Dierings de *et al.* Applications of nanotechnology in essential oil protection to extend the shelf life of fruits and vegetables: A review. **Food Control**, [s. l.], v. 170, p. 111044, 2025.

SOUZA, Mayara Andrade Martins *et al.* Characterisation of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal unripened cheeses produced in São Paulo State, Brazil. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 149, p. 105825, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694623002443>.

SUN, Runyang *et al.* Antibacterial effect of ultrasound combined with *Litsea cubeba* essential oil nanoemulsion on *Salmonella Typhimurium* in kiwifruit juice. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 426, p. 110898, 2025. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160524003428>.

SUNDAR, S.K.; PARIKH, Jigisha K. Advances and trends in encapsulation of essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 635, p. 122668, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517323000881>.

TABASSUM, Nazia *et al.* Application of nanoemulsion based edible coating on fresh-cut papaya. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 355, p. 111579, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877423001772>.

TRAJKOVSKA PETKOSKA, Anka *et al.* Edible packaging: Sustainable solutions and novel trends in food packaging. **Food Research International**, [s. l.], v. 140, p. 109981, 2021.

TRUJILLO-MAYOL, Igor *et al.* Incorporation of avocado peel extract to reduce cooking-induced hazards in beef and soy burgers: A clean label ingredient. **Food Research International**, [s. l.], v. 147, p. 110434, 2021. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996921003331>.

UMARAW, Pramila *et al.* **Edible films/coating with tailored properties for active packaging of meat, fish and derived products.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020.

VISOTTO, Rafaella Guedes *et al.* Queijo minas frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, [s. l.], p. 8–15, 2011. Disponível em: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2011/ses-21302/ses-21302-2735.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2021.

WALSH, P.P.; MURPHY, E.; HORAN, D. The role of science, technology and innovation in the UN 2030 agenda. **Technological Forecasting and Social Change**, [s. l.], v. 154, p. 119957, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040162519303919>.

XIONG, Yun *et al.* Effect of oregano essential oil and resveratrol nanoemulsion loaded pectin edible coating on the preservation of pork loin in modified atmosphere packaging. **Food Control**, [s. l.], v. 114, p. 107226, 2020.

ZHAI, Wenxuan *et al.* Impact of reduced sucrose content on processed cheese: Sensory, textural, and storage stability analysis. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 60, p. 104405, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429224008356>.

ZHAO, Jiaxin; LAN, Weiqing; XIE, Jing. Recent developments in nanoemulsions against spoilage in cold-stored fish: A review. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 429, p. 136876, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814623014942>.

ZHU, Yue *et al.* Preparation and characterization of a novel green cinnamon essential oil nanoemulsion for the enhancement of safety and shelf-life of strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 427, p. 110935, 2025. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160524003799>.

CAPÍTULO II
PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION, RHEOLOGICAL
PROPERTIES, AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SODIUM
ALGINATE-PINK PEPPER ESSENTIAL OIL (PPEO)
NANOEMULSIONS

**Artigo publicado na revista Foods
(Foods 2024, 13, 3090)**

**Mariah Almeida Lima^{1*}, Juliana Carusi²,
Liliana de Oliveira Rocha², Renata Valeriano Tonon³,
Rosiane Lopes Cunha⁴ and Amauri Rosenthal³**

1 Institute of Technology, Food Technology Department, University Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, Brazil; mariahhalmeidalima@gmail.com

2 Department of Food Science and Nutrition, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil; jucarusi@unicamp.br, lrocha@unicamp.br

3 Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, Brazil; renata.tonon@embrapa.br; amauri.rosenthal@embrapa.br

4 Department of Food Engineering and Technology, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil; rosiane@unicamp.br

Correspondence: mariahhalmeidalima@gmail.com

ABSTRACT

Essential oils (EOs) have antimicrobial properties, but their low solubility in water and strong flavor poses challenges for direct incorporation into food, as they can negatively impact organoleptic properties. To overcome these issues, strategies such as oil-in-water (O/W) nanoemulsions have been developed to improve EO dispersion and protection while enhancing antimicrobial efficacy. The objective of this study was to create sodium alginate-pink pepper essential oil (PPEO) nanoemulsions using microfluidization. Various formulations were assessed for physicochemical, physical, and antimicrobial properties to evaluate their potential in food applications. The microfluidized emulsions and nanoemulsions had droplet size ranging from 160 to 443 nm, polydispersity index (PDI) ranging from 0.273 to 0.638, and zeta potential (ζ) ranging from -45.2 to 66.3 mV. The nanoemulsions exhibited Newtonian behavior and remarkable stability after 20 days of storage. Antimicrobial testing revealed effectiveness against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, with minimum inhibitory concentrations (MIC) of 200 μ g/mL for both microorganisms and minimum bactericidal concentrations (MBC) of 800 μ g/mL and 400 μ g/mL, respectively, proving that encapsulation of PPEO in nanoemulsions significantly increased its antibacterial activity. These results present the possibility of using PPEO nanoemulsions as a more effective natural alternative to synthetic preservatives in food systems.

Keywords: Pink pepper essential oil, Nanoemulsion, Microfluidization, Antimicrobial activity, Sodium alginate.

<https://doi.org/10.3390/foods13193090>

1 INTRODUCTION

There demand for safe and high-quality foods is increasing among from consumers. In this regard, the food sector has endeavored to offer safer and more natural alternatives as substitutes for synthetic and chemical antimicrobial agents, given the evidence indicating their adverse effects on human health(Al-zoreky; Al-Taher, 2015; Hsouna *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2019). Thus, natural preservatives derived from diverse plant components, including leaves, roots, fruits, and seeds, have been utilized to fulfill consumer demand for more natural foods (Hyldgaard; Mygind; Meyer, 2012). Essential oils (EOs) are metabolites secondary to aromatic vegetal species that act naturally to protect against microbial and insect attacks (Asbahani *et al.*, 2015). They are acknowledged with the designation Generally Recognized as Safe (GRAS) for applications in foodstuffs. Their role as an ingredient is mainly as substitute for synthetic preservatives due to their antioxidant and antimicrobial activities (Almasi; Azizi; Amjadi, 2020). Pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) is a plant indigenous to Brazil that is found in South and Central America, Europe, Asia, and Africa. Pink pepper essential oil (PPEO) has been suggested to have antitumor, antioxidant, and antimicrobial activities (Andrade; Poncelet; Ferreira, 2017). Prior research has established that the chemical constituents are primarily limonene, myrcene, α -pinene, and β -pinene, with a minor concentration of sesquiterpenes, including as D-germacrene (dos Santos Cavalcanti *et al.*, 2015). The Antimicrobial effects of PPEO are thought to be due to presence of either to monoterpene or sesquiterpene hydrocarbons, as well as their oxygenated derivatives, including as limonene and α -pinene (Dannenberg *et al.*, 2019). The effects of PPEO as an antioxidant and antimicrobial agent have been studied in foods such as cheese and meats (Cordeiro *et al.*, 2019; Dannenberg *et al.*, 2017; Menegali *et al.*, 2020), however, its nanoencapsulated form has been little studied in terms of its antimicrobial activity against pathogenic microorganisms. Due to their volatility, flavor, and low solubility, the direct addition of these and other EOs becomes a challenge as they may negatively affect the organoleptic characteristics of foods (McClements, 2011).

To mitigate these issues, encapsulating EOs in nanoemulsions may provide a promising alternative, addressing the challenges associated with their direct application in foods, but also to enhance their effectiveness when used in active coatings (Almasi; Azizi; Amjadi, 2020). Oil-in-water (O/W) nanoemulsions are defined as colloidal dispersions composed of nanometric oil droplets ($d < 200$ nm) dispersed in an aqueous phase (McClements, 2012; McClements; Rao, 2011). Nanoemulsions are highly stable with regard to gravitational processes, including coalescence, creaming, flocculation, and sedimentation. Nevertheless, they are susceptible to Ostwald ripening (Asadinezhad *et al.*, 2019; Guerra-Rosas *et al.*, 2017). The Ostwald ripening describe the phenomenon whereby larger droplets in a dispersed system, such as an emulsion, grow at the expense of smaller droplets. This occurs due to the difference in solubility between small and large droplets, resulting in a phase separation and a subsequent decrease in system stability (Tadros *et al.*, 2004). The low water solubility of essential oils facilitates Ostwald ripening, which can occur immediately following emulsion formation. Consequently, the combination of water-insoluble oils, such as sunflower oil, and emulsifiers, like lecithin, with essential oils can reduce surface tension which impedes droplet growth due to the entropy of mixing effect that opposes Ostwald ripening (Chang; McClements, 2014). The nanometric size of the oil droplets in nanoemulsions results in an increase in surface area, thereby enhancing the efficacy of the added compounds. This, in turn, permits a reduction in concentration (10-50%) while minimizing the potential for sensory alterations (Dávila-Rodríguez *et al.*, 2019; McClements, 2011).

The combination of emulsifiers, surfactants and stabilizers can facilitate the formation of the emulsion, in addition to improve its properties and increase its stability (Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A reviewMcClements;

Jafari, 2018). Medium or long chain triglycerides, such as corn and sunflower oil, are defined as "ripening inhibitors", as they form a kinetic barrier making EOs less soluble in water, reducing the rate at which smaller particles dissolve and reprecipitate into larger particles (Donsì *et al.*, 2014; Pavoni *et al.*, 2020). Soy lecithin is a natural emulsifier derived from the cell membrane of soybeans containing hydrophobic groups and alkyl side chains that make it amphiphilic, reducing the interfacial tension between the phases of the emulsion and improving its stability (Zhao *et al.*, 2023). Polysorbates, also designated as Tweens, are non-ionic surfactants derived from sorbitan and are commonly utilized in the encapsulation of essential oils. Tweens 20 and 80, though derived from the same compound, possess distinct structures (Guo *et al.*, 2020). Tween 20 contains a side chain comprising lauric acid, whereas Tween 80 has oleic acid in its side chain, rendering it less hydrophilic than Tween 20 (Brandner, 1998; Pavoni *et al.*, 2020). The structural differences between polysorbates allow them to stabilize nanoemulsions in different ways, which directly impacts the size and stability of the droplets.

Polysaccharide-based nanoemulsions, such as sodium alginate, incorporating EO as an antimicrobial agent, can be utilized to form edible active coatings. Using these coatings can increase shelf life and help prevent spoilage of food products. A number of studies report on various properties associated with polysaccharide-based nanoemulsions developed using microfluidization, as well as their applications in active films and coatings (Artiga-Artigas, María; Acevedo-Fani; Martín-Belloso, 2017; Chen; Zhong, 2022; Huang *et al.*, 2020; Khanzadi *et al.*, 2020). Khanzadi *et al.* (2020) observed an inhibition of microbial growth in trout fillet coated with sodium alginate nanoemulsion containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil. Kazemeini, Azizian and Adib (2021) demonstrated that nanoemulsion comprising sodium alginate-*Trachyspermum ammi* essential oil, when used as a coating, was capable of inhibiting the growth of *Listeria monocytogenes* in turkey fillets even after 12 days of storage at 4 °C.

Despite a few studies focused on the nanoencapsulation of pink pepper essential oil (PPEO) in nanoemulsions, no studies have specifically evaluated the antimicrobial potential of these nanoemulsions against foodborne pathogenic microorganisms, which can be of great interest for food industry. Additionally, the combination of sunflower oil and lecithin with surfactants may prove an effective strategy for obtaining stable nanoemulsions, preventing destabilization phenomena such as Ostwald ripening and creaming. The aim of this study was to develop sodium alginate-pink pepper essential oil (PPEO) nanoemulsions using sunflower oil and lecithin as stabilizers and to characterize their physicochemical and rheological properties after microfluidization. Furthermore, the antimicrobial potential of these nanoemulsions was assessed against foodborne pathogenic microorganisms, specifically *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*, aiming their application as active coatings in animal-based products, such as cheeses.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Material

PPEO was acquired from Ferquima (São Paulo, Brazil). The company provided the composition of the essential oil: γ -terpinene (32%), α -phellandrene (20%), δ -limonene (15%), α -pinene (10%), and β -cimene (4%). Surfactants Tween 20 and Tween 80, as well as glycerol were purchased from Dinamica (Brazil). Sodium alginate was obtained from GastronomyLab® (Brazil). Mueller-Hinton Agar and Mueller-Hinton broth were obtained from OXOID® (England). Soy lecithin and sunflower oil were kindly donated by Bremil (RS, Brazil) and Cargill Global (SP, Brazil), respectively. Nanoemulsions were produced using ultrapure water from a Milli-Q Plus system. The bacteria employed in the investigation of antimicrobial activity study included *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 and *Salmonella* sp. (LMA 32 – Unicamp internal code).

2.2 Nanoemulsion Preparation

The oil-in-water nanoemulsions were developed by keeping the concentration for all components fixed in relation to the amount of water. Based on the study by Salvia-Trujillo *et al.* (2015), amount of PPEO, sodium alginate, and non-ionic surfactant (Tween 20 or Tween 80) remained constant at 1.0% (w/w). In some formulations, sunflower oil (0.5 or 0.75% w/w) or soy lecithin (0.2% w/w) was also added. These concentrations were chosen from our preliminary experiments to be published elsewhere, based on the work of Ghaderi *et al.* (2017) and Asadinezhad *et al.* (2019) with modifications, where the concentrations of sunflower oil varied from 0.25 to 1% (w/w) and lecithin from 0.1 to 0.2% (w/w), and the concentrations selected were based on the smallest droplet size and the best physical stability of the nanoemulsions. The identification and composition of the formulations are presented in Table 1. For identification, the samples were prefixed as CE- (coarse emulsion) and the nanoemulsions were prefixed with M- (microfluidized), before the sample name.

Aqueous phase was produced by solubilizing sodium alginate and an emulsifier in ultrapure water heated to 70 °C under magnetic stirring until complete dissolution, followed by cooling at refrigeration temperature. Non-ionic surfactant was added to aqueous phase. The emulsion was obtained by combining the aqueous and oil phases (PPEO, PPEO + sunflower oil or lecithin) in an Ultra Turrax® T18 digital (S 18 N- 19 G dispersing tool element with a diameter of 19 mm, IKA, Staufen, Germany) for a period of 5 minutes at 13,000 rpm at 20 °C. Nanoemulsion was produced by subjecting the coarse emulsion to a microfluidizer (LM20-20, Z-Type Interaction Chamber model H210Z, Microfluidics, Massachusetts, USA) at 15,000 psi for a total of five cycles. Subsequently, the product was cooled in an ice-water bath at the outlet of the microfluidizer interaction chamber, ensuring that the sample temperature remained below 30 °C. Besides, pH of all the samples were measured after microfluidization using a pH-meter (Metrohm 827 pH Lab, METROHM, Brazil) with values approximately 6.8 ± 0.2. Experiments were conducted in triplicate.

Table 1 Composition and identification of the different nanoemulsion formulations.

Sample	PPEO (%w/w)	Sodium Alginate (%w/w)	T20 (%w/w)	T80 (%w/w)	Sunflower Oil (%w/w)	SL (%w/w)
T20	1.0	1.0	1.0	-	-	-
0.5T20	1.0	1.0	1.0	-	0.5	-
0.75T20	1.0	1.0	1.0	-	0.75	-
SLT20	1.0	1.0	1.0	-	-	0.2
T80	1.0	1.0	-	1.0	-	-
0.5T80	1.0	1.0	-	1.0	0.5	-
0.75T80	1.0	1.0	-	1.0	0.75	-
SLT80	1.0	1.0	-	1.0	-	0.2

PPEO: pink pepper essential oil; T20: Tween 20; T80: Tween 80; and SL: soy lecithin.

2.3 Physicochemical Properties of the Nanoemulsions

2.3.1 Particle size, size distribution, and polydispersity index

Particle size distribution of the emulsions and nanoemulsions was determined using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) at a wavelength of 633 nm and temperature 25 °C, with a backscatter detector of 173°. Prior to analysis, each sample was diluted with ultrapure water at a ratio of 1:99 in order to minimize multiple scattering effects. Size distribution was measured by setting the Mie theory, and a refractive index value of 1.46 was used for the disperse phase (pink pepper essential oil) and 1.33 for the continuous phase (water) (Okuro *et al.*, 2022). Mean size and polydispersity index were evaluated based on the

intensity particle size distribution. D10, D50, and D90 were derived from the volume-weighted distribution, indicating the size below which 10%, 50%, or 90% of all particles are located, respectively.

2.3.2 ζ -Potential

The zeta (ζ) potentials (mV) were measured by electrophoretic light scattering using a Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Prior to analysis, the emulsions were diluted in ultrapure water using a dilution factor 1:9 (sample to solvent). Measurements were made on the pH of the samples (6.8 ± 0.2).

2.3.3 Whiteness Index

The chromatic properties of emulsions and nanoemulsions were determined with a Hunter Lab colorimeter model UltraScanVIS (HunterLab, Reston, VA, USA) employing the CIE Lab scale (L^* , a^* , and b^*) at room temperature. The device was calibrated with a standard white plate using the illuminant D65 and 10° observer angle settings, and the whiteness index (WI) value using the following Equation (1) (Vargas *et al.*, 2008):

$$WI = 100 - ((100 - L^*)^2 + (a^{*2} + b^{*2}))^{0.5} \quad (1)$$

where L^* determines the brightness of the color, a^* determines the position between green and red, and b^* determines the position between blue and yellow.

2.3.4 Rheology Characterization

Emulsions and nanoemulsions flow curves were obtained using an AR1500ex rheometer (TA Instruments, Crawley, UK) equipped with double concentric cylinder geometry comprising an internal cylinder (external radius of 17.53 mm, internal radius of 16.02 mm) and an external cup (external radius of 18.45 mm, inner radius of 15.10 mm). A gap of 500 μ m and the shear was adjusted within a range of 0 and 300 s^{-1} . In order to eliminate any potential effects of shear time, the flow curves were generated using up-down-up cycles. Emulsions and nanoemulsions were evaluated just after their preparation. Triplicate measurements were taken at 25°C . The data obtained from the third flow curve were modeled using the Newtonian and power-law (Equation (2)) fluid models:

$$\sigma = k \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (2)$$

In this context, σ represents shear stress (Pa), k denotes the consistency index (Pa.s^n), $\dot{\gamma}$ signifies the shear rate (s^{-1}) and n is the flow behavior (dimensionless) (Trujillo-Cayado *et al.*, 2015).

2.3.5 Emulsion Stability

The stability of the emulsions and nanoemulsions was evaluated in accordance with the methodology proposed by Ushikubo and Cunha (2014), with modifications. Twenty-five milliliters of the emulsions were transferred to cylindrical glass tubes, which were then sealed and stored for a period of 30 days at a temperature of 25°C . The percentage separation of the oil phase was expressed as a separation index (SI), calculated with Equation (3).

$$SI(\%) = \left(\frac{H}{H_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

where H is the height of the separated oil phase, and H_0 is the total height of the sample.

The stability of the emulsion was also measured by the average droplet diameter. Measurements were performed every 10 days for 4 weeks at a temperature of 25°C .

2.3.6 Optical Microscopy

The microstructure of emulsions and nanoemulsions was observed in an optical microscope (Axio Scope.A1, Carl Zeiss, Jena, Germany) with a 100 \times oil immersion objective lens. The images were captured using the AxioVision Rel. 4.8 software (Carl Zeiss, Germany). The microstructure of emulsion and nanoemulsions was observed after preparation.

2.3.7 Oil Retention

The total oil retained in emulsions and nanoemulsions was quantified via hydrodistillation in a Clevenger apparatus in triplicate, in accordance with the methodology delineated by Garcia, Tonon, and Hubinger (2012), with modifications. Firstly, 100 mL of the sample was transferred to a 500 mL round-bottomed flask. The distillation process was conducted for a period of 60 min, and the distilled oil volume was directly read directly into the Clevenger apparatus. The percentage of oil retention was calculated according to Equation (4):

$$\text{Oil retention (\%)} = \left(\frac{V \times \rho}{m} \right) \times 100 \quad (4)$$

The volume of oil, denoted V, is that collected following distillation process. The term ρ represents the density of pink pepper essential oil or the mixture (PPEO and sunflower oil), while m denotes the mass of essential oil added to the sample.

2.4 Antimicrobial Activity

2.4.1 Agar Disk Diffusion

Firstly, the antimicrobial activity of non-encapsulated PPEO (control) and nanoemulsions was determined via the disk diffusion technique, as previously described by CLSI (CLSI, 2015a). Additionally, solutions of Tween 20, Tween 80, and sodium alginate at a concentration of 1% (w/w) were also tested. The bacterial cultures were suspended in peptone water (0.1% w/v) to achieve a concentration of 10⁸ CFU/mL, which is equivalent to a 0.5 Mc Farland standard. A volume of 100 μ L of the inoculum was distributed with a sterilized swab onto the surface of Petri dishes with Mueller-Hinton Agar (MH-Oxoid[®]) as the growth medium. After that, the sterilized paper disks positioned on the plate received 10 μ L of sample solution (non-encapsulated PPEO or microfluidized emulsion). The Petri dishes underwent incubation at 37 °C (*E. coli*, *Salmonella* sp., and *S. aureus*) and 30 °C (*L. monocytogenes*) for 24 h. After the incubation period, the presence of the inhibition zone was confirmed and quantified using a digital caliper.

2.4.2 Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations

The broth technique was utilized to establish the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), according to CLSI methodology (CLSI, 2015b). The non-encapsulated PPEO (control) and nanoemulsions were diluted in Mueller-Hinton broth (MH-Oxoid[®]) supplemented with a Tween 80 solution (0.5% v/v) up to a concentration of 6400 μ g/mL. Then, 5 mL of this solution was transferred to a glass tube containing 5 mL of pure Mueller-Hinton broth until 3200 to 25 μ g/mL concentrations were obtained. A total of 250 μ L of inoculum (10⁸ CFU/mL) was added to each tube, which was then incubated at 37 °C (*E. coli*, *Salmonella* sp., and *S. aureus*) and 30 °C (*L. monocytogenes*) for 24 h. Subsequently, the tubes were evaluated, and the MIC was defined as the highest dilution without cell growth (compared to the negative control) through visual analysis.

MBC was obtained through inoculation of 10 μ L from each tube that exhibited no growth in the MIC test onto Tryptic Soy Agar (TSA) plates. The lowest concentration that did not

demonstrate growth was identified as the minimum bactericidal concentration (MBC) following a 24-h incubation period at 37 °C and 30 °C, respectively.

2.5 Statistical Analysis

The data were subjected to statistical analyses using the R i386 software (version 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) to verify the behavior of the samples through analysis of variance (ANOVA). When a statistical difference was observed ($p < 0.05$), a Tukey test was employed for further investigation into the disparity between the corresponding means.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Particle size distribution, PDI and ζ -potential

Microfluidization broke the primary emulsion droplets (micrometer size) into smaller sizes in microfluidized emulsions (mean size lower than 400 nm). This can be clearly observed in the z-average and D50 values (Table 2). There is still a lack of consensus on the size that defines what is classified as a nanoemulsion and an emulsion. A droplet diameter of less than 200 nm is indicative of nanoemulsion (McClements, 2012; McClements; Jafari, 2018; Tadros *et al.*, 2004). Considering this classification, only samples M-T20, M-T80, and M-0.5T20 cannot be classified as nanoemulsions, considering the z-average and D50 values. Mechanical stress caused by microfluidization promotes the formation of smaller droplets that are promptly enveloped by surfactant molecules, thereby reducing interfacial tension (Maa; Hsu, 1999). A lower mean size indicates a higher stability of nanoemulsions in comparison to coarse emulsions. Additionally, the size significantly affects the physicochemical, rheological, antimicrobial, and sensory properties and stability of nanoemulsion formulations (Haghju *et al.*, 2016).

The determination of particle size by DLS is predicated on the variation in the intensity of the laser beams that are scattered when they encounter the moving particles in a suspension (Malvern Instruments, 2013). This information is employed to ascertain the diffusion coefficient, which is used to calculate the hydrodynamic size in accordance with the Stoke-Einstein equation. DLS values are generated in relation to intensity; however, based on the intensity-weighted distribution, it is possible to generate volume-weighted and number-weighted distributions. According to the Rayleigh approximation, the intensity of the scattered light is proportional to the sixth power of the diameter (d^6), being dominated by large particles that contribute disproportionately to the measured intensity, even when in smaller quantities. In contrast, the volume distribution is proportional to the third power of the diameter (d^3), providing a more accurate representation of the material distribution and facilitating visualization of the smaller particles (Lim *et al.*, 2013; Yeap *et al.*, 2018). The particle size distribution showed a multimodal distribution in all nanoemulsions (Figure 1), which indicates a polydisperse distribution of particle sizes. The particle size distribution of the coarse emulsions can be found in the supplementary material (Figure S1).

The small peak observed around 5000 nm could be aggregates of biopolymer molecules and/or surfactants, as demonstrated by Artiga-Artigas *et al.* (2017). When formulating a nanoemulsion with a low concentration of essential oil, the surfactant adsorbed at the droplet interface can lead to interaction between the biopolymer chains. Alternatively, these chains may exhibit a preference for binding to unbound surfactant molecules in preference to those situated on the oil droplet surface (Goddard, 2002). Sodium alginate interacts with the surfactant chains surrounding the oil droplets, resulting in the induction of steric and/or electrostatic repulsion between the droplet interfaces. This interaction effectively prevents destabilization phenomena, including coalescence and gravitational separation (Artiga-Artigas, M.; Acevedo-Fani; Martín-

Belloso, 2017). Silva *et al.* (2019) investigated the interfacial tension between the components of an emulsion comprising sacha inchi oil, sodium alginate, and polysorbates (Tween 20 and 80). The times required to reach equilibrium tension were approximately 600 s for both Tween 20 and 80 (1.0 wt%), indicating that the equilibrium tension was achieved due to the steric stabilization capacity of sodium alginate in conjunction with the rapid diffusion of polysorbate molecules. Moreover, in a system comprising sodium alginate and Tween, the surfactant exerts a dominant influence on the surface of the drop, given its superior active surface area in comparison to sodium alginate.

According to Salvia-Trujillo *et al.* (2015), z-average in non-monodispersed distributions can lead to misinterpretation, and for this, D10, D50, and D90 values are also displayed. These values allowed us to observe the effect of the addition of another surfactant (lecithin) and sunflower oil. Sunflower oil acted as an Ostwald ripening inhibitor and soy lecithin as a co-surfactant, resulting in the generation of nanoemulsions with diminished droplet dimensions, which is in agreement with other studies (Donsì *et al.*, 2015; Taghavi *et al.*, 2021). Due to the increased surface area resulting from reduced droplet size and the greater water solubility of EO, nanoemulsions become more susceptible to Ostwald ripening, which occurs when smaller droplets merge from large ones, driven by the molecular propagation of the dispersed phase through the continuous phase (Asadinezhad *et al.*, 2019; McClements, 2007). Medium or long-chain triglycerides act by reducing the water solubility of EO, stabilizing the nanoemulsion by minimizing the propensity for larger droplets to form from smaller droplets, which is crucial to maintaining the desired properties and effectiveness of the formulation (Chang; McLandsborough; McClements, 2013; Donsì *et al.*, 2014). Low molecular mass surfactants, including polysorbate (Tweens) and lecithin, are promptly adsorbed at the oil-water interface during emulsification, leading to a particle size reduction (Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Lecithin played a crucial role as a co-surfactant in nanoemulsion formulation, contributing to the reduction in droplet size. Its complex composition, primarily consisting of phospholipids such as phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), and phosphatidylcholine (PC), along with other lipids, contributes to its effectiveness. The lamellar structures formed by these phospholipids, including mono- and bilayers, create a layer of protection around the dispersed droplets in nanoemulsion, preventing coalescence or fusion of the droplets, resulting in a decrease in droplet size and enhanced nanoemulsion stability (Artiga-Artigas; Lanjari-Pérez; Martín-Belloso, 2018; Taghavi *et al.*, 2021).

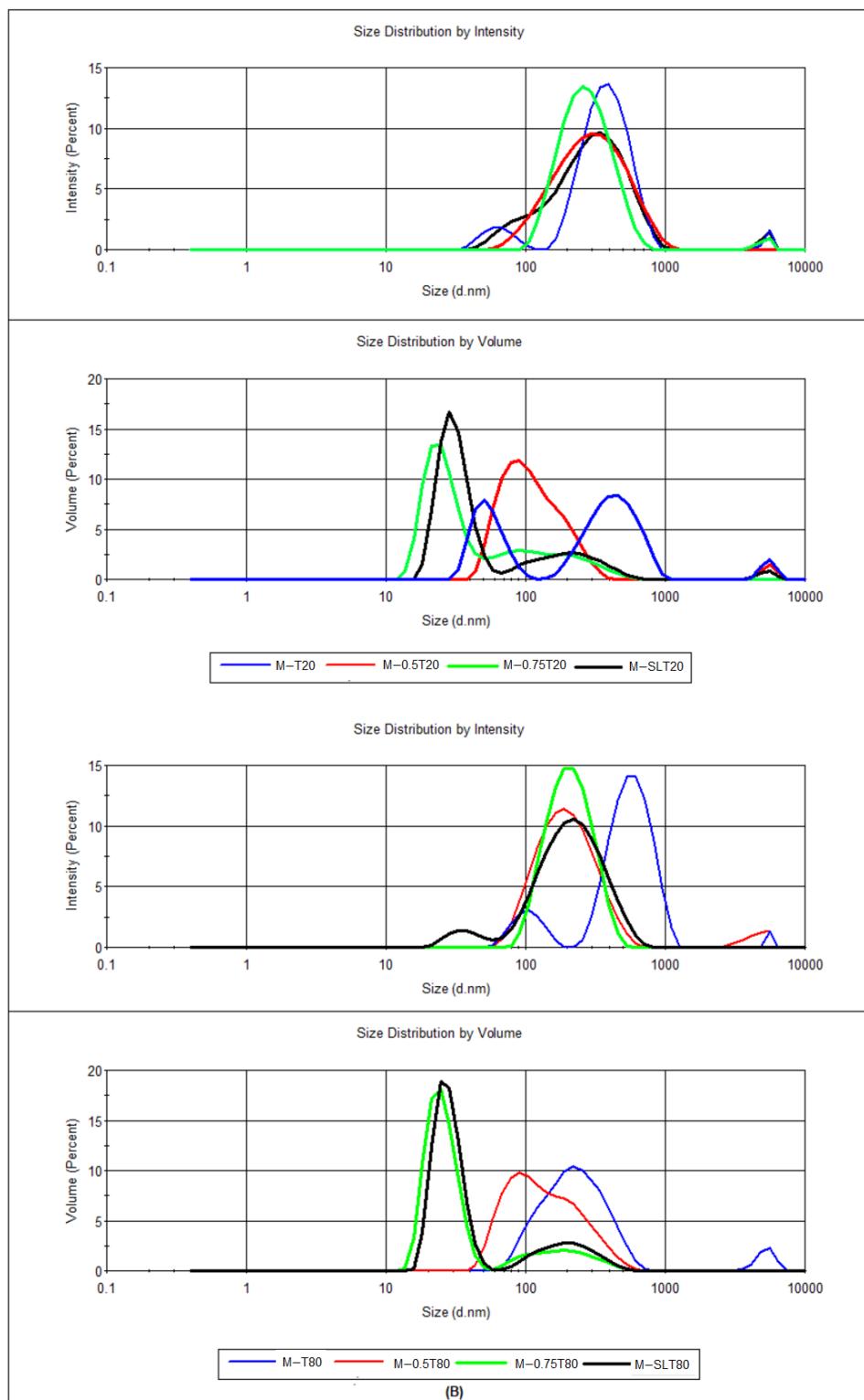


Figure 1 Particle size distribution (nm) of the sodium alginate-PPEO nanoemulsion expressed in intensity and volume stabilized by (A) Tween 20 and (B) Tween 80. M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin.

Table 2 Mean particle size (z-average, D10, D50, and D90) and polydispersity index (PdI) of coarse emulsions (CE) and nanoemulsions (M).

Samples	Z-Average (nm)	Particle Size (nm)			PdI
		D ₉₀	D ₅₀	D ₁₀	
CE-T20	1323 ± 156 ^a	1950 ± 1 ^a	804 ± 6 ^b	59.3 ± 5.5 ^b	0.891 ± 0.168 ^a
CE-T80	998 ± 29 ^b	1570 ± 101 ^b	1010 ± 10 ^a	87.7 ± 3.9 ^a	0.830 ± 0.140 ^a
M-T20	443 ± 10 ^c	468 ± 23 ^c	214 ± 5 ^c	103 ± 2 ^c	0.568 ± 0.091 ^b
M-T80	434 ± 27 ^c	498 ± 16 ^c	229 ± 8 ^c	113 ± 4 ^c	0.638 ± 0.073 ^b
M-0.5T20	221 ± 2 ^d	229 ± 15 ^{de}	106 ± 8 ^e	61.4 ± 3.6 ^e	0.303 ± 0.005 ^c
M-0.5T80	162 ± 2 ^d	298 ± 6 ^d	126 ± 7 ^d	65.4 ± 5.1 ^d	0.367 ± 0.044 ^c
M-0.75T20	187 ± 3 ^d	198 ± 12 ^{de}	30.1 ± 4.0 ^f	18.3 ± 2.6 ^f	0.294 ± 0.010 ^c
M-0.75T80	161 ± 4 ^d	175 ± 10 ^{de}	26.6 ± 3.5 ^f	18.4 ± 4.5 ^f	0.273 ± 0.007 ^c
M-SLT20	183 ± 3 ^d	257 ± 16 ^{de}	34.3 ± 4.1 ^f	22.7 ± 4.7 ^f	0.411 ± 0.060 ^c
M-SLT80	160 ± 5 ^d	213 ± 9 ^{de}	29.8 ± 2.6 ^f	21.0 ± 4.3 ^f	0.391 ± 0.039 ^c

Significant differences within each column are indicated by different letters ($p < 0.05$) by the Tukey test. CE: coarse emulsion; M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin. The data are expressed as means values ± standard deviation.

Polydispersity index values are presented in Table 2. PdI is a parameter that denotes the range of the particle size distribution. Values below 0.3 indicate a narrow size distribution, suggesting enhanced droplet uniformity since less variation in emulsion droplet size may indicate better stability against the phenomena of coalescence or Ostwald ripening (Ghadetaj; Almasi; Mehryar, 2018). Regarding PdI, the only samples exhibiting indices below 0.3 were those containing 0.75% w/w sunflower oil (M-0.75T20 and M-0.75T80), which demonstrated superior kinetic stability outcomes over a 30-day storage period. The observed reduction in polydispersity index values may be attributed to the incorporation of sunflower oil, as the increase in the oil phase may facilitate a more uniform distribution of the surfactant (Tween) within the emulsion. Furthermore, sunflower oil comprises natural emulsifiers, including lecithin, which, due to its amphiphilic nature, provides stability to nanoemulsions by forming a stable layer at the oil-water interface. This contributes to a reduction in interfacial tension and the promotion of the development of smaller, more uniform droplets (N; Sontakke, 2023). Moreover, the presence of phosphate groups facilitates the establishment of repulsive electrostatic interactions, which are essential for preventing coalescence (Zhang *et al.*, 2012). The remaining samples exhibited higher PdI values, exceeding 0.3, indicative of a significant variability in the size of the emulsion droplets. This often renders them less stable, as the extensive range of droplet size renders them susceptible to destabilization phenomena, resulting in visual or creaming phase separation. As observed by Artiga-Artigas *et al.* (2017), high PdI values may result from the re-coalescence phenomena, which can occur after the microfluidization process.

Figure 2 presents ζ -potential values for sodium alginate-PPEO emulsions. All nanoemulsions displayed negative ζ -potentials, with a range of -35.0 mV to -66.3 mV. When the ζ -potential is less than -30 mV, the considerable electrical charge on the particles indicates that repulsive forces are the dominant force, contributing to the system stability. The negative ζ -potential values observed in every tested sample are attributed to the preferential adsorption of non-ionic surfactants, such as Tweens, onto the surface of the oil in conjunction with polymeric stabilizers, as is the case with sodium alginate (Nambam; Philip, 2012). The incorporation of sodium alginate into nanoemulsion formulations is instrumental in the electrostatic stabilization of these systems. This is due to the carboxylate and hydroxyl groups, which can readily dissociate in the hydrophilic phase and be adsorbed onto the oil droplet surface, thereby conferring sufficient negative charge to prevent destabilization phenomena (Heurtault *et al.*, 2003). Additionally, deprotonated alcohols (R-O-) and carboxylic acids (R'CO₂-) are responsible for an increase in electron density that consequently results in higher

negative ζ -potential values (Artiga-Artigas, María; Acevedo-Fani; Martín-Beloso, 2017). Tweens are vulnerable to oxidative breakdown brought on by exposure to light, oxygen, and heat, resulting in the formation of hydroperoxides, aldehydes, and carboxylic acids. This process introduces new functional groups, such as carboxyl groups, which ionize in the water phase, altering the surface of nanoemulsion droplets and increasing negative charge. Furthermore, the presence of impurities and ionic contaminants can also contribute to negative zeta potential values (Kozuch *et al.*, 2023; McClements; Xiao, 2012; Okuro; Gomes; Cunha, 2020).

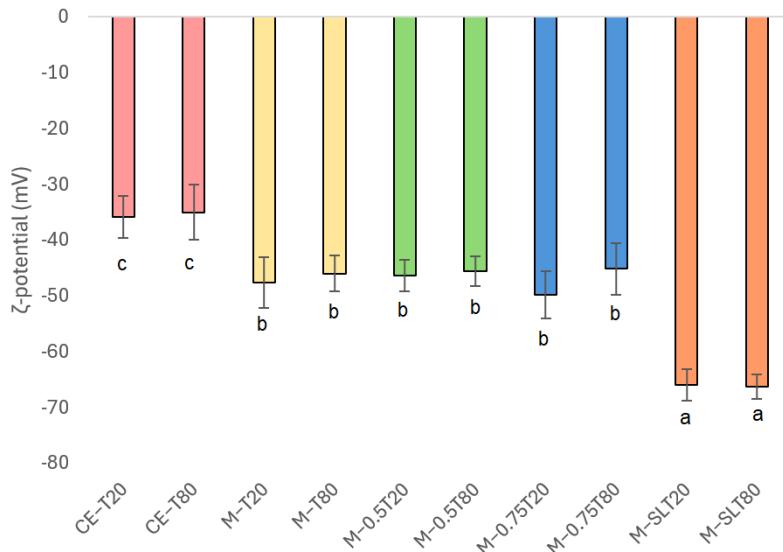


Figure 2 ζ -potential (mV) of coarse emulsions and nanoemulsions. Significant differences within each column are indicated by different letters ($p < 0.05$) by the Tukey test. CE: coarse emulsion; M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin. The data are expressed as means values \pm standard deviation.

The nanoemulsion formulated with lecithin exhibited the lowest ζ -potential values, with M-SLT20 and M-SLT80 displaying -65.9 and -66.3 mV, respectively. These values are the result of lecithin phosphate groups and their negative charges that contribute to reducing the charge on the surface of the droplets, thereby increasing the negative ζ -potential (Zhang *et al.*, 2012).

3.2 Whiteness Index

The Whiteness index (WI) is an important parameter employed to evaluate the optical properties of emulsions, reflecting the degree of light scattering by droplets within these systems, directly impacting their appearance and stability. In general, nanoemulsions are described as slightly cloudy systems, attributed to the weak scattering of light by their small droplets. As the size of the droplets increases, light scattering becomes more intense, making the emulsions appear more opaque (Acevedo-Fani *et al.*, 2015). Figure 3 presents the WI values of coarse and microfluidized emulsions. Despite the reduction in droplet size, all microfluidized emulsions and nanoemulsions presented an opaque visual appearance after microfluidization, and the whiteness index of some nanoemulsions was even higher than that of primary emulsions (Figure 4). Regardless of the surfactant, emulsions showed a similar behavior. Nanoemulsions with a lower oil content, M-T20, M-T80, M-SLT20, and M-SLT80, showed the highest WI values, which can be attributed to some factors associated with the composition. Firstly, the high polydispersity in the particle distribution shows a population size on the micrometer scale that may be aggregated alginate particles. Larger particles exhibit more intense light scattering compared to smaller ones, leading to amplified luminosity, opacity, and an enhanced whiteness

index measurement for the nanoemulsions (McClements; Rao, 2011; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Additionally, the inclusion of soy lecithin, which exhibits a pronounced color, alters the overall hue of the nanoemulsion (McClements, 2002) and contributes to an increment in the WI value.

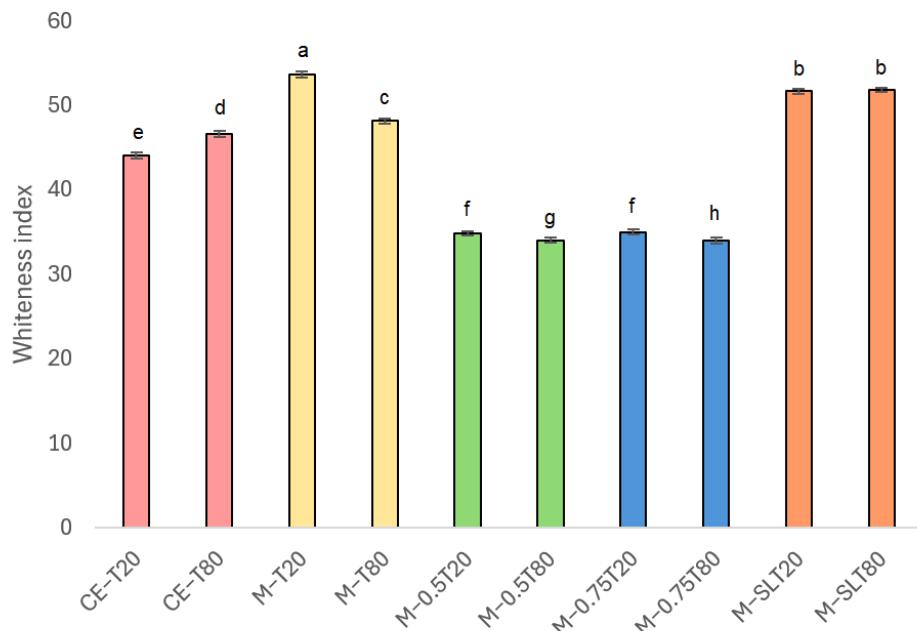


Figure 3 Whiteness index of coarse emulsions and nanoemulsions. Significant differences within each column are indicated by different letters ($p < 0.05$) by the Tukey test. CE: coarse emulsion; M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin. The data are expressed as means values \pm standard deviation.

Notably, the addition of sunflower oil, M-0.5T20, M-0.5T80, M-0.75T20, and M-0.75T80, reduced WI values. Smaller average droplet size, lower PdI, and narrower size distribution are some of several factors that may influence the reduction of WI values. In nanoemulsions, smaller droplets have a reduced capacity to scatter light effectively compared to larger droplets, resulting in decreased whiteness (Acevedo-Fani *et al.*, 2015). Therefore, the combination of these factors leads to a weakened light scattering effect, reducing the perception of whiteness in samples (Chantrapornchai; Clydesdale; McClements, 1999). Light scattering is most effective when the droplet size is closer to 380–780 nm (the wavelength of visible light). However, nanoemulsions typically comprise droplet sizes well below 200 nm, which results in reduced light scattering and a corresponding decrease in the whiteness index (Chantrapornchai; Clydesdale; McClements, 2008). A lower polydispersity index indicates a more uniform droplet size distribution within the nanoemulsion, which, in turn, reduces the variability in light scattering. Consequently, there is a decrease in diffuse reflection and an associated reduction in the whiteness index. These characteristics contribute to a smoother, more consistent appearance, which is why nanoemulsions are used in products such as creams, gels, or liquid foods. In fact, the specific type and composition of the oil utilized and nanoemulsions formulation have a notable impact on the whiteness index of the emulsions. In their study, Salvia-Trujillo *et al.* (2015) produced nanoemulsions using ten distinct essential oils, and only three nanoemulsions achieved transparency after microfluidization (150 MPa/3 cycles). This finding highlights the significant impact of formulation composition on the optical and visual characteristics exhibited by nanoemulsions.

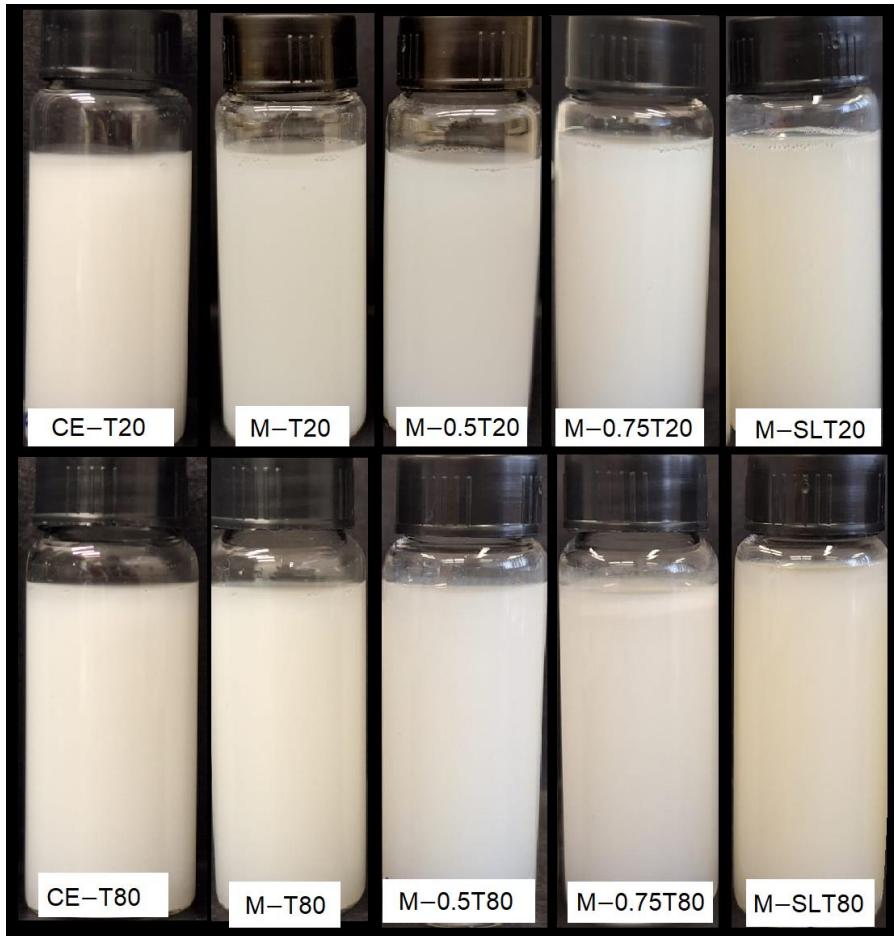


Figure 4 Images of sodium alginate-pink pepper essential oil (PPEO) emulsions and nanoemulsions. CE: coarse emulsion; M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin.

3.3 Rheological Properties

The viscosity and concentration of the dispersed phase play a crucial role in the formation of nanometric emulsion droplets (Branco; Sen; Rinaldi, 2020). The sodium alginate-PPEO emulsions flow curves, shown in Figure 5, were well-fitted to the power-law model (Table 3). The coarse emulsions exhibited a flow index (n) of approximately 0.72 and evidenced pseudoplastic fluids behavior. The value of n is less than 1, which indicates pseudoplasticity or shear-thinning behavior, which is defined by a decrease in viscosity as the shear rate increases (Quemada, 1998). After the microfluidization process, all samples, regardless of the formulation, showed low viscosity and Newtonian behavior. The microfluidization process may result in the deterioration of sodium alginate, which could lead to a reduction in the molecular weight of the alginate chains and the viscosity of PPEO nanoemulsions. The degradation may be caused by shear stress, cavitation, and turbulence, which can lead to chemical and physical changes in the material (Branco; Sen; Rinaldi, 2020; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013). Furthermore, the decrease in droplet size promotes lower interaction between them, also contributing to Newtonian behavior.

The apparent viscosities of the samples after microfluidization were significantly lower than those observed for coarse emulsions (Table 3), which may be attributed to the reduced interaction between the droplets. The apparent viscosity values were obtained at a shear rate of 10.8 s^{-1} , as this allows observation of the influence of forces of attraction and repulsion between dispersed droplets on viscosity, thus facilitating understanding of the rheological behavior of the samples in states of slow flow or rest, which are quite common in the food industry.

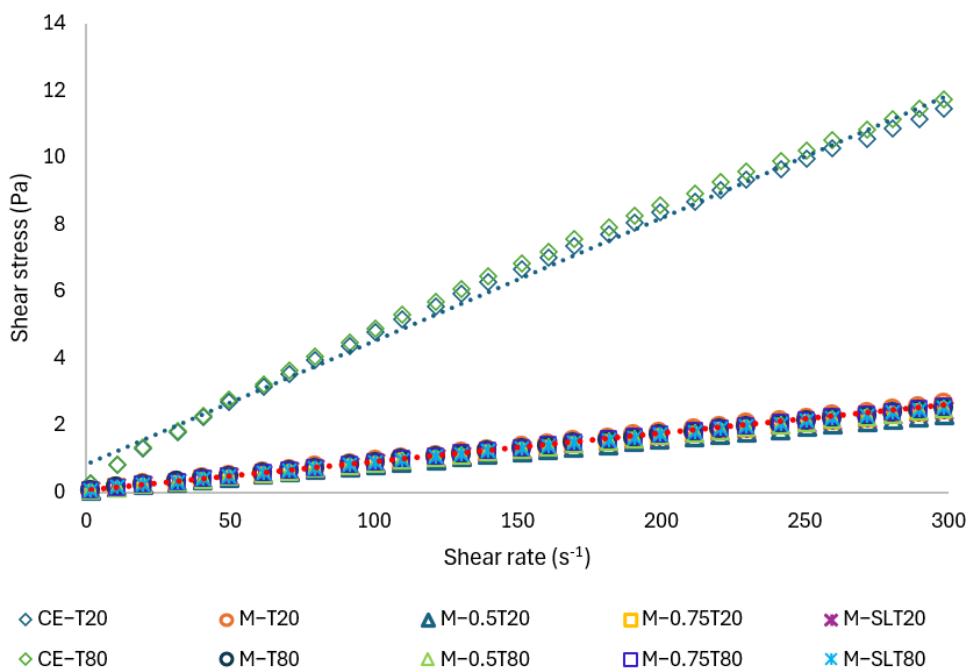


Figure 5 Flow curves of coarse emulsions and sodium alginate-PPEO nanoemulsions as a function of the shear rate. CE: coarse emulsion; M: microfluidized; Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin.

Table 3 Viscosity (m Pa·s) and rheological properties of coarse emulsions (CE) and nanoemulsions (M) at 10.8 s⁻¹ from the power-law model.

Samples	Viscosity (mPa·s)	n	k (Pa·s ⁿ)	R ²
CE-T20	172.11 ± 3.18 ^a	0.727 ± 0.006 ^b	0.4239 ± 0.0101 ^b	0.998
CE-T80	172.08 ± 5.68 ^a	0.727 ± 0.005 ^b	0.4218 ± 0.0209 ^b	0.998
M-T20	35.33 ± 0.53 ^b	0.986 ± 0.002 ^a	0.0304 ± 0.0011 ^a	1.000
M-T80	33.45 ± 0.41 ^b	0.988 ± 0.001 ^a	0.0286 ± 0.0015 ^a	1.000
M-0.5T20	31.23 ± 0.43 ^b	0.990 ± 0.001 ^a	0.0261 ± 0.0001 ^a	0.999
M-0.5T80	32.94 ± 0.14 ^b	0.988 ± 0.001 ^a	0.0285 ± 0.0001 ^a	1.000
M-0.75T20	32.36 ± 0.35 ^b	0.988 ± 0.001 ^a	0.0274 ± 0.0004 ^a	1.000
M-0.75T80	33.92 ± 0.51 ^b	0.988 ± 0.005 ^a	0.0293 ± 0.0008 ^a	1.000
M-SLT20	34.54 ± 0.20 ^b	0.987 ± 0.001 ^a	0.0293 ± 0.0008 ^a	0.999
M-SLT80	33.84 ± 0.76 ^b	0.986 ± 0.002 ^a	0.0290 ± 0.0009 ^a	0.999

k: consistency coefficient, n: flow behavior index. Significant differences within each column are indicated by different letters ($p < 0.05$) by the Tukey test. CE: coarse emulsion; M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin. The data are expressed as means values ± standard deviation.

The rheological properties of sodium alginate dispersions depend on their possibility of forming intermolecular bonds, such as hydrogen bonds, with the viscosity directly linked to polymer-solvent interactions, in addition to factors such as alginate size, structure, and flexibility (Branco; Sen; Rinaldi, 2020; Peres; Leite; Silveira, 2015). For instance, larger alginate molecules or those with more complex structures may exhibit higher viscosities due to increased resistance to flow. Similarly, the flexibility of polymer chains can affect their ability to align and flow in response to shear forces, thereby influencing the viscosity (Feng *et al.*, 2017). Considering that the viscosity of coarse emulsions is much higher than that of nanoemulsions that have the same composition, the difference in rheological behavior may be associated with the greater interaction between alginate molecules under conditions of exposure

to lower mechanical forces (unbroken alginate clusters) or greater ease of interaction between polysaccharide molecules on larger droplets (greater proximity between droplets).

The low viscosity and Newtonian behavior of nanoemulsions represent characteristics that render these systems interesting for the food and pharmaceutical industries, allowing the addition of nanoemulsions to improve the texture and mouthfeel without affecting the rheological properties of foods. In the pharmaceutical field, these characteristics make nanoemulsions optimal delivery systems for controlled-release drugs, in addition to improving the absorption and spreadability of compounds added to cosmetics (Ozogul *et al.*, 2022). An understanding of the rheological properties of emulsions and nanoemulsions allows for the enhancement of their performance and functionality. Furthermore, it facilitates the development of novel, stable, and high-quality foods that align with the demands of the food market and consumers.

3.4 Emulsion Stability

The stability of emulsions and nanoemulsions is an important parameter for the effective encapsulation of bioactive compounds such as essential oils. The formation of an oil layer, gravitational separation, indicates instability. The curves showing the phase separation indices of the samples are shown in Figure 6.

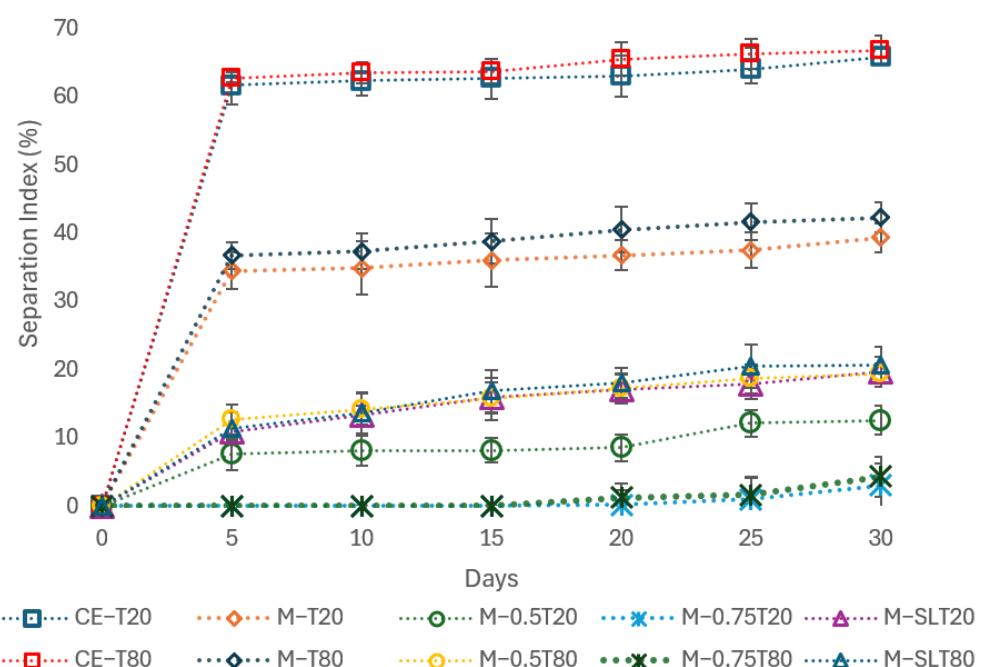


Figure 6 Separation index (SI) of coarse emulsions (CE) and nanoemulsions (M). CE: coarse emulsion; M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin. The data are expressed as means values \pm standard deviation.

At the end of 30 days of storage, despite their formulations, the samples showed phase separation ranging from 3.02 to 62.65% (Figure 7). During the first 20 days of storage, only samples M-0.75T20 and M-0.75T80 had no phase separation. The greater stability of these samples may be related to the addition of sunflower oil combined with their reduced droplet size and PdI values.

The coarse emulsions, CE-T20 and CE-T80, and the microfluidized emulsions, M-T20 and M-T80, showed higher phase separation rates, ranging from 34 to 62%. The high SI values indicate the low stability of the samples, which may be correlated to their larger droplet sizes and PdI. These samples showed instability right after microfluidization, which is the result of

the droplets migrating to the top of the emulsion (Tadros *et al.*, 2004). According to McClements (McClements, 2007), phase separation in emulsions is the result of an increase in droplet size caused by the phenomena of flocculation and coalescence. Guerra-Rosas *et al.* (2016) observed different separation rates according to the essential oil used in the nanoemulsion. While the nanoemulsions with lemongrass and mandarin essential oil showed no phase separation over 56 days of storage, the samples with thyme and oregano essential oil showed separation rates of 6.5 and 17.08%, respectively, indicating that the composition plays a fundamental role in the stability of emulsions and nanoemulsions.

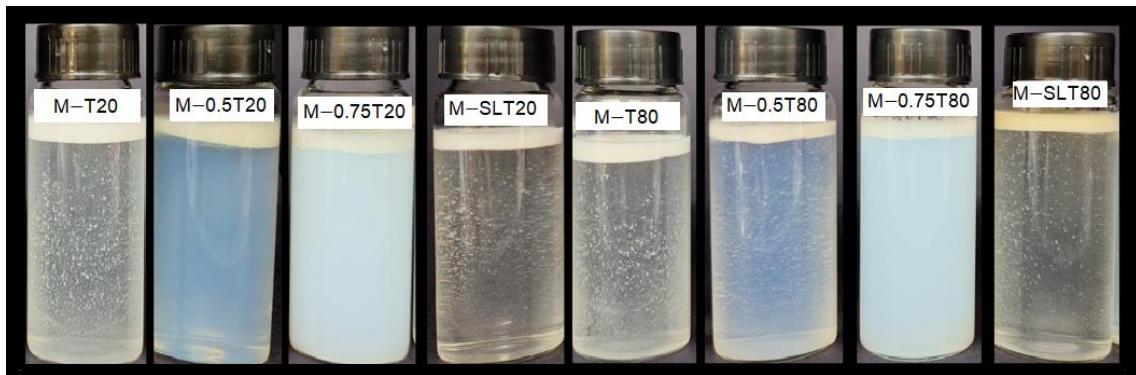


Figure 7 Phase separation of sodium alginate-pink pepper essential oil (PPEO) microfluidized emulsions and nanoemulsions after 30 days of storage. M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin.

The physical stability of nanoemulsions is essential for their commercial use, ensuring that there are no changes in droplet size or phase separation (Chang; McLandsborough; McClements, 2015). Figure 8 presents the evolution over time of the mean droplet diameter in emulsions and nanoemulsions stored at 25 °C for 30 days. After microfluidization, all samples except M-0.75T20 and M-0.75T80 showed a significant increase in droplet size. In particular, samples M-T20 and M-T80 showed a significant increase in droplet size and phase separation in the first 24 h, with a stability index (SI) of about 40% after 30 days. Samples containing soy lecithin and 0.5% sunflower oil showed similar behavior, but the SI was reduced to about 20% at the end of the storage period. The destabilization of nanoemulsions is attributed to the Ostwald ripening phenomenon, where the droplet size increases due to the diffusion of smaller oil droplets into larger ones through the aqueous phase. The addition of Ostwald ripening inhibitors, such as sunflower oil and soybean lecithin, can be an effective strategy to improve the stability of nanoemulsions (Nouri; Baghaee-Ravari; Emadzadeh, 2021). In this study, the addition of 0.75% sunflower oil conferred greater stability to samples M-0.75T20 and M-0.75T80, which showed only a slight increase in droplet size over 30 days and remained without phase separation for up to 20 days. A similar result was described by Wan *et al.* (2018), who observed no significant changes in the droplet size of clove oil nanoemulsions with corn oil (75% w/w) over 30 days of storage at 4 and 25 °C. The stability of nanoemulsions is closely related to their small droplet size and PDI values, indicating that these nanoemulsions are resistant to droplet growth caused by coalescence, flocculation, and Ostwald ripening (Gharibzahedi; Mohammadnabi, 2016). Ensuring this stability is critical to maintaining the integrity of the active ingredients and ensuring the efficacy of the nanoemulsions, resulting in superior-quality products.

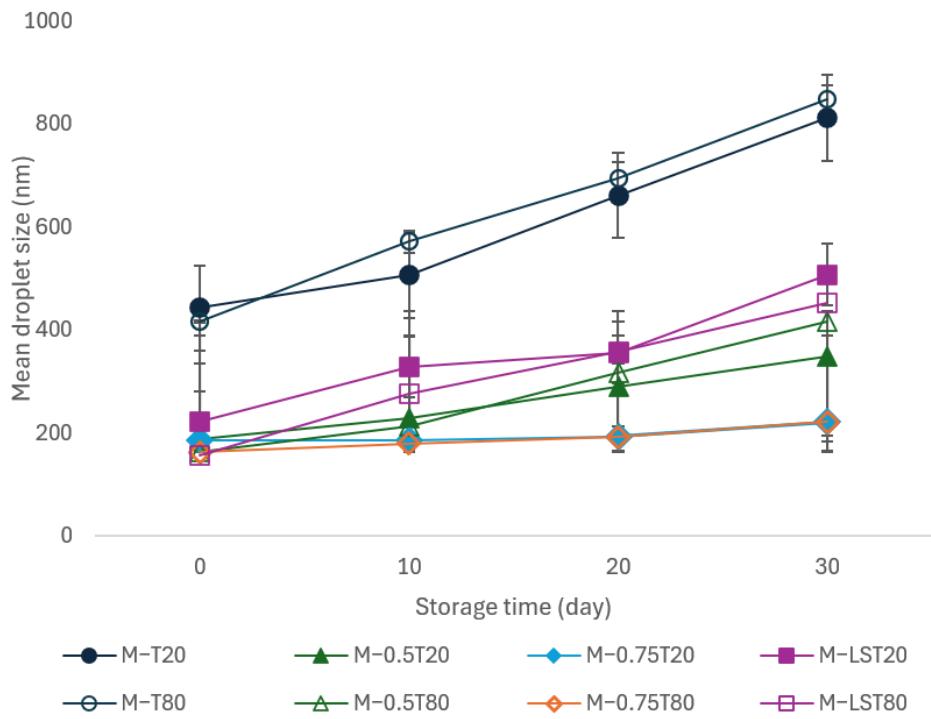


Figure 8 Storage stability of sodium alginate-pink pepper essential oil (PPEO) microfluidized emulsions and nanoemulsions at 25 °C. M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin. The data are expressed as means values \pm standard deviation.

3.5 Microscopy

The optical microscopy images of the emulsions and nanoemulsions are shown in Figure 9. The coarse emulsions are shown in images A and B, and it is possible to see the larger droplet size and the aggregation of these droplets. Larger droplets and aggregation lead to the instability of the emulsions, which can induce creaming and phase separation. Sodium alginate-PPEO nanoemulsions can be observed in images B to J, and it is possible to observe a reduction in nanoemulsion droplet size after microfluidization. The samples M-T20 and M-T80 exhibited a larger droplet size distribution and lower pink pepper essential oil retention, and their micrographs (C and D) evidence a higher occurrence of aggregates. The limited accuracy of the images obtained is due to the tiny droplets since accurate observation using optical microscopy techniques diminishes notably when their size falls below 500 nanometers (Liang *et al.*, 2012).

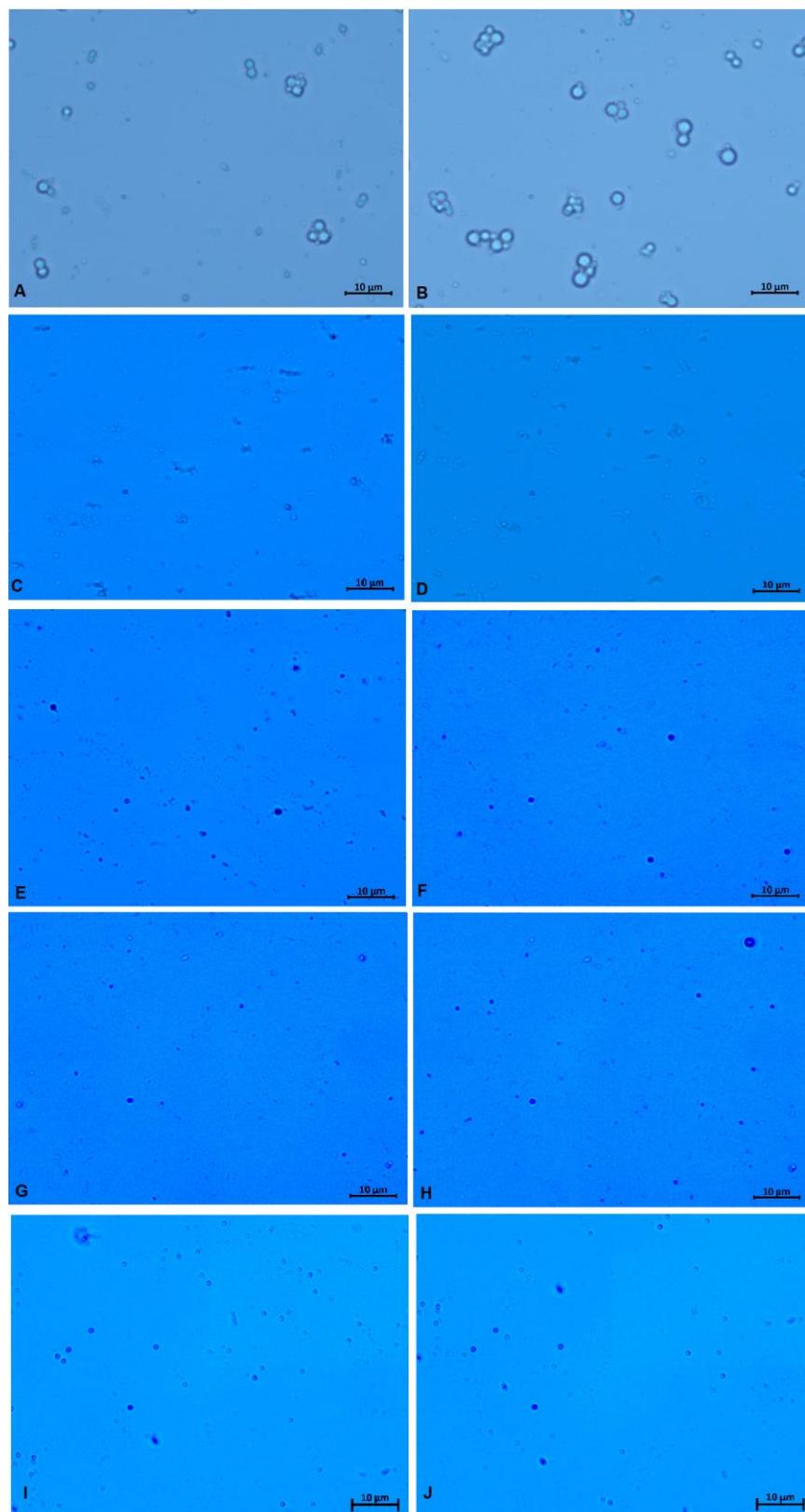


Figure 9 Optical microscopic images of coarse emulsion and sodium alginate-PPEO nanoemulsions. (A): CE-T20; (B): CE-T80; (C): M-T20; (D): M-T80; (E): M-0.5T20; (F): M-0.5T80; (G): M-0.75T20; (H): M-0.75T80; (I): M-SLT20, and (J): M-SLT80. CE: coarse emulsion; M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% sunflower oil; 0.75: 0.75% sunflower oil; SL: soy lecithin.

3.6 Oil Retention

Figure 10 shows that the oil content decreased after the microfluidization process. Pink pepper oil-loaded nanoemulsions exhibited oil retention ranging between 68.48% and 82.16%, differing significantly ($p < 0.05$) from the coarse emulsion, which showed oil retention (OR) values greater than 90%. Nanoemulsions M-T80 and M-T20 exhibited the lowest OR values (around 70%). Oil retention is closely associated with droplet size, as higher OR values are associated with smaller droplet sizes (Dávila-Rodríguez *et al.*, 2019). Furthermore, when an essential oil has high water solubility, it displays a tendency to partition predominantly into the aqueous phase. This phenomenon results in a reduction in encapsulation efficiency because a portion of the essential oil may be lost to the aqueous phase and may not be effectively nano-encapsulated within the oil droplets of the nanoemulsion (Zhao *et al.*, 2023). However, considering the above, coarse emulsions should have lower OR compared to M-T80 and M-T20 nanoemulsions. Although microfluidization produces stable and uniform nanoemulsions, it can also impact the oil retention within these systems. The high shear rates and elevated temperatures during the process may compromise droplet structure and increase diffusion rates, leading to the loss of encapsulated oil (Mahdi Jafari; He; Bhandari, 2006). By understanding these challenges and optimizing process conditions, such as controlling shear rates and temperature, along with proper formulation, essential oil retention can be improved, thereby enhancing the effectiveness of nanoemulsions in various applications.

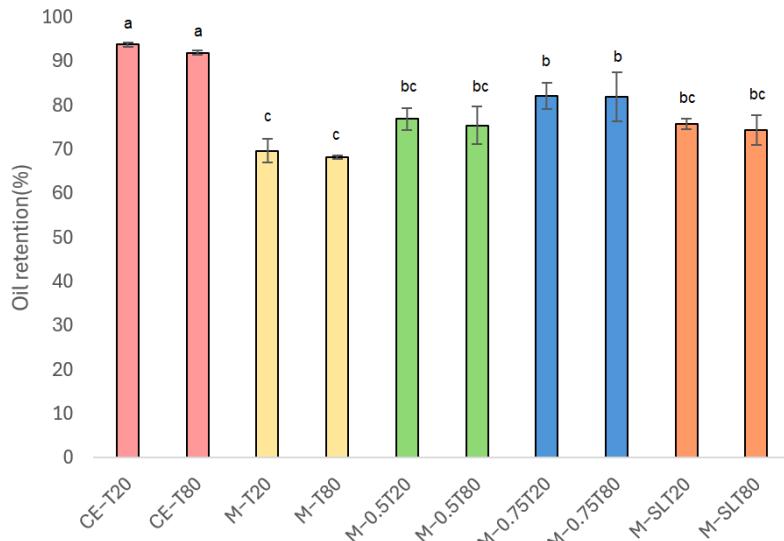


Figure 10 Oil retention of coarse emulsions (CE) and nanoemulsions (M). Significant differences within each column are indicated by different letters ($p < 0.05$) by the Tukey test. CE: coarse emulsion; M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin. The data are expressed as means values \pm standard deviation.

The addition of soy lecithin to the composition of the emulsions (M-SLT20 and M-SLT80) increased the OR to values above 75%. This protective effect is due to the ability of lecithin to form hydrogen bonds between its phosphate groups and the hydroxyl groups of the essential oils (Artiga-Artigas; Lanjari-Pérez; Martín-Belloso, 2018). Lecithin aliphatic phospholipid chains envelop the essential oil, effectively trapping it within the nanoemulsion structure (Kumar; Ahuja; Sharma, 2008; Zhang *et al.*, 2012). Nanoemulsions containing 0.75% (w/w) of sunflower oil showed even higher encapsulation levels, ranging from 81.91% to 82.16%. Dávila-Rodrígues *et al.* (2019) observed 82% retention of oregano essential oil after producing a nanoemulsion by high-frequency ultrasound. However, the amount of *Coriandrum sativum* essential oil in the Das *et al.* (2019) nanoemulsion produced by ultrasonication ranged from 26 to 76%. The difference in the oil content of the nanoemulsions can be directly related

to losses in the process since essential oils are volatile, and high-energy processes generate heat that can induce the volatilization of these oils. According to Niu *et al.* (2016), nanoemulsions with encapsulation efficiency above 80% are considered highly stable. The incorporation of essential oils into vegetable oil, such as sunflower oil, offers protection against microfluidization heating, minimizing its degradation and volatilization (Donsì *et al.*, 2011). The lipophilic nature of sunflower oil acts as a protective matrix, increasing solubility and reducing exposure to aqueous phases where temperature fluctuations occur (López *et al.*, 2023). The protection mechanisms provided by both sunflower oil and lecithin contribute to the stability and integrity of the encapsulated essential oils in the nanoemulsion system.

The hydro distillation process, commonly used to extract essential oils from plant materials, can also be applied to extract oil from emulsified systems. This process involves three main physicochemical processes: hydrodiffusion, hydrolysis, and thermal decomposition, which can significantly affect the retention of oil in the system (Oreopoulou; Tsimogiannis; Oreopoulou, 2019). The oil retention rate is closely linked to the stability of the emulsions and the conditions of the process. As heating is applied, the stability of the emulsions may decrease, leading to coalescence and phase separation, which releases oil from the structure, ultimately reducing oil retention. Additionally, volatilization and thermal degradation of oil components can occur, leading to evaporation losses and alterations in the chemical composition of the oil (Cossetin *et al.*, 2021; Karthik; Ezhilarasi; Anandharamakrishnan, 2017; Pavoni *et al.*, 2020). Therefore, the greater the stability of the emulsion, the higher the amount of oil retained in the system. The retention of oil in the nanoemulsion is directly influenced by the interaction between the components of the formulation, such as surfactant, oil, polymer, and fabrication method, which will directly affect the stability and release properties of the nanoemulsion (Pavoni *et al.*, 2020). Therefore, the right choice of manufacturing process and formulation can guarantee the development of a nanoemulsion with the right properties for its purpose.

3.7 Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of pure PPEO (non-encapsulated) and its nanoemulsions was investigated against gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and gram-negative bacteria, and *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. Disk diffusion test results are shown in Table 4. Sodium alginate, Tween 20, and Tween 80 showed no antimicrobial activity against the microorganisms evaluated. PPEO and two nanoemulsions, M-0.75T80 and M-0.75T20, showed antimicrobial action against the gram-positive bacteria *L. monocytogenes* and *S. aureus*, while *E. coli* and *Salmonella* sp. were not sensitive (Figure 11). Pure PPEO was previously tested by Dannenberg *et al.* (Dannenberg *et al.*, 2019) against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, and *S. Typhimurium* and exhibited antimicrobial activity exclusively against the gram-positive bacteria *L. monocytogenes* and *S. aureus* with inhibition zones of 24.30 and 23.09 mm, respectively (similar to our results). The heightened susceptibility of gram-positive bacteria to PPEO is attributed to the facile penetration of nanometer-scale hydrophobic molecules through the peptidoglycan layer that constitutes the structure of gram-positive bacteria. However, the double layer of lipopolysaccharide found in gram-negative bacteria acts as a defense mechanism to the passage of antimicrobial molecules (Donsì; Ferrari, 2016; Nazzaro *et al.*, 2013). However, Salvia-Trujillo *et al.* (2015) documented the inhibition of *E. coli* with sodium alginate nanoemulsion loaded with lemongrass and clove oil produced in a microfluidization process. The results demonstrated that the antimicrobial effect is predominantly influenced by the active compounds of essential oils rather than their concentration (Moore-Neibel *et al.*, 2013).

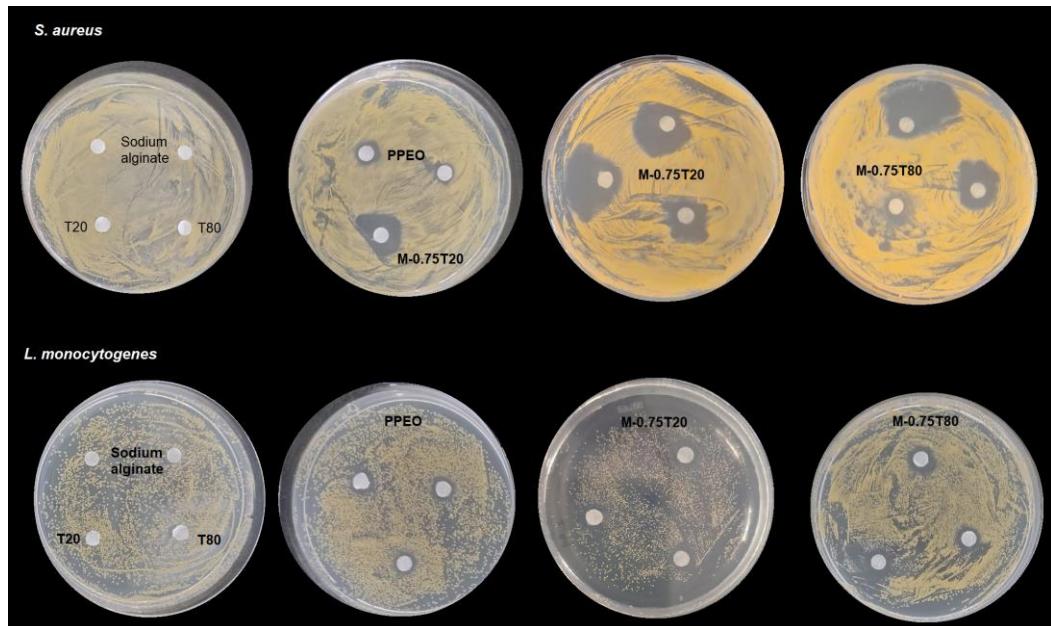


Figure 11 Antimicrobial activity of non-encapsulated PPEO and its encapsulated forms, as well as Tween 20, Tween 80, and sodium alginate solution against *S. aureus* and *L. monocytogenes*. PPEO: pink pepper essential oil (non-encapsulated); M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil.

Table 4 Diameters of inhibition zone (mm) demonstrated by non-encapsulated pink pepper essential oil and sodium alginate-PPEO nanoemulsions against both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains

	Inhibition Zone (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
PPEO	14.13 ± 0.19 ^a	12.36 ± 1.90 ^a	ND	ND
M-T20	ND	ND	ND	ND
M-T80	ND	ND	ND	ND
M-0.5T20	ND	ND	ND	ND
M-0.5T80	ND	ND	ND	ND
M-0.75T20	26.18 ± 3.87 ^b	17.13 ± 0.73 ^{ab}	ND	ND
M-0.75T80	26.57 ± 6.99 ^b	23.28 ± 4.50 ^b	ND	ND
M-SLT20	ND	ND	ND	ND
M-SLT80	ND	ND	ND	ND

Significant differences within each column are indicated by different letters ($p < 0.05$); PPEO: pink pepper essential oil (non-encapsulated); M: microfluidized; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0.5: 0.5% (w/w) sunflower oil; 0.75: 0.75% (w/w) sunflower oil; SL: soy lecithin. The data are expressed as means values ± standard deviation; ND = Not Detected.

MIC and MBC values of samples that exhibited antimicrobial activity in the disk diffusion test are presented in Table 5. The differences in the inhibition halos and MIC and MBC values were greater than those exhibited by PPEO (non-encapsulated). The antimicrobial activity of nanoemulsions is associated with several factors, including oil retention (approximately 82% in emulsions with 0.75% sunflower oil), the small average droplet size of nanoemulsions (160.7–186.6 nm), and their stability. The reduction in droplet size of nanoemulsions enhances the functionality of EOs due to the increase in the surface area of the droplets (Guerra-Rosas *et al.*, 2016). Some authors have reported that encapsulation of essential oil (EO) can increase their antimicrobial activity (Ghaderi *et al.*, 2017; Moghimi *et al.*, 2016; Salvia-Trujillo *et al.*, 2014); however, in other cases, this activity may be reduced (Chang; McLandsborough; McClements, 2015; Xue; Michael Davidson; Zhong, 2015), indicating that the antimicrobial efficacy of nanoemulsions-based EO can be significantly affected due to the

influence of EO components, formulation, and the nanoemulsion droplet size (Donsì; Ferrari, 2016).

Table 5 Values for the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values ($\mu\text{g/mL}$) pink pepper essential oil and sodium alginate-PPEO nanoemulsions.

	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
PPEO	200	800	400	1600
M-0.75T20	200	400	200	800
M-0.75T80	200	400	200	800

PPEO: pink pepper essential oil (non-encapsulated); M: microfluidized; Tween 80; T20: Tween 20; 0.75: 0.75% (*w/w*) sunflower oil.

4 CONCLUSIONS

Different sodium alginate-PPEO nanoemulsions were produced via microfluidization, and the findings demonstrated a notable influence of this process on their physicochemical, rheological, and antimicrobial properties. Sodium alginate-PPEO nanoemulsions showed small droplet size, multimodal particle size distribution, and high (absolute) and negative zeta potential values. Among the eight formulations outlined in the current study, M-0.75T80 and M-0.75T20 showed remarkable performance concerning the evaluated properties. The incorporation of sunflower oil into the formulation improved the stability of nanoemulsions during long storage and led to an increase in the PPEO retention within the nanoemulsion. The sodium alginate-PPEO nanoemulsion demonstrated remarkable antimicrobial activity against *L. monocytogenes* and *S. aureus*, which was associated with the formulation, oil retention, and droplet size.

Nevertheless, the production of nanoemulsions via microfluidization represents a significant challenge, primarily due to the elevated costs associated with the requisite equipment and the necessity for precise processing conditions to guarantee the stability and uniformity of emulsions on a large scale. These challenges need to be addressed to facilitate the commercial application of these nanoemulsions. Even so, the results obtained are noteworthy due to the promising advantages of using nanoemulsions as delivery systems, with potential for applications in food packaging. Future investigation is required to ascertain the efficacy of these nanoemulsions as coatings in enhancing food quality and prolonging the shelf life of foods. This will be crucial to elucidate their real potential for incorporation into food products.

Funding

This work was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ (grant number E-26/202.710-2019), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (grant number 2019/27354-3), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (grant number 311529/2021-6, 141604/2020-4 and 465335/2014-4).

5 REFERENCES

- ACEVEDO-FANI, Alejandra *et al.* Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 47, p. 168–177, 2015.
- AL-ZOREKY, Najeeb S.; AL-TAHER, Abdulla Y. Antibacterial activity of spathe from Phoenix dactylifera L. against some food-borne pathogens. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 65, p. 241–246, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014007791>.
- ALMASI, Hadi; AZIZI, Saeedeh; AMJADI, Sajed. Development and characterization of pectin films activated by nanoemulsion and Pickering emulsion stabilized marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 99, p. 105338, 2020.
- ANDRADE, Kátia S; PONCELET, Denis; FERREIRA, Sandra R S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 204, p. 38–45, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877417300651>.
- ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 70, p. 191–200, 2017.
- ARTIGA-ARTIGAS, María; ACEVEDO-FANI, Alejandra; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. **Food Control**, [s. l.], v. 76, p. 1–12, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517300014>.
- ARTIGA-ARTIGAS, María; LANJARI-PÉREZ, Yamel; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Curcumin-loaded nanoemulsions stability as affected by the nature and concentration of surfactant. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 266, p. 466–474, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461831015X>.
- ASADINEZHAD, Shabnam *et al.* Effect of different parameters on orange oil nanoemulsion particle size: combination of low energy and high energy methods. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 2501–2509, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00170-z>. Acesso em: 24 mar. 2021.
- ASBAHANI, A. El *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517314009661>.
- BRANCO, Ivanise Guilherme; SEN, Kacoli; RINALDI, Carlos. Effect of sodium alginate and different types of oil on the physical properties of ultrasound-assisted nanoemulsions. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, [s. l.], v. 153, p. 107942, 2020.
- BRANDNER, John D. The Composition of NF-Defined Emulsifiers: Sorbitan Monolaurate, Monopalmitate, Monostearate, Monooleate, Polysorbate 20, Polysorbate 40, Polysorbate 60, and Polysorbate 80. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 24, n. 11, p.

1049–1054, 1998. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03639049809089948>.

CHANG, Yuhua; MCCLEMENTS, David Julian. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: Influence of the oil phase, surfactant, and temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 10, p. 2306–2312, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Acesso em: 24 mar. 2021.

CHANG, Yuhua; MCLANDSBOROUGH, Lynne; MCCLEMENTS, David Julian. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 172, p. 298–304, 2015.

CHANG, Yuhua; MCLANDSBOROUGH, Lynne; MCCLEMENTS, David Julian. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 37, p. 8906–8913, 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Acesso em: 24 mar. 2021.

CHANTRAPORNCHAI, Withida; CLYDESDALE, Fergus; MCCLEMENTS, D. Julian. Influence of droplet characteristics on the optical properties of colored oil-in-water emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 155, n. 2–3, p. 373–382, 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775799000047>.

CHANTRAPORNCHAI, Withida; CLYDESDALE, Fergus M.; MCCLEMENTS, D. Julian. Understanding Colors in Emulsions. In: COLOR QUALITY OF FRESH AND PROCESSED FOODS. 983. ed. [S. l.]: ACS Symposium Series, 2008. p. 364–387. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2008-0983.ch026>.

CHEN, Huaiqiong; ZHONG, Qixin. Physical and antimicrobial properties of self-emulsified nanoemulsions containing three synergistic essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 365, p. 109557, 2022.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically M07–A10; Approved standard. 10. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratorial Standards Institute, 2015.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests M02–A12; Approved standard. 12. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratorial Standards Institute, 2015.

CORDEIRO, Cecília de Souza *et al.* Utilization of zein-based coatings containing vegetable oils on the physicochemical characteristics of vacuum-packaged lamb meat. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 49, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782019001000753&nrm=iso.

COSSETIN, Luciana Filippin *et al.* Development of nanoemulsions containing *Lavandula dentata* or *Myristica fragrans* essential oils: Influence of temperature and storage period on

physical-chemical properties and chemical stability. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 160, p. 113115, 2021.

DANNENBERG, Guilherme da Silva *et al.* Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, [s. l.], v. 95, p. 115–120, 2019. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713518303712>.

DANNENBERG, Guilherme da Silva *et al.* Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 81, p. 314–318, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817302219>.

DAS, Somenath *et al.* Encapsulation in chitosan-based nanomatrix as an efficient green technology to boost the antimicrobial, antioxidant and in situ efficacy of *Coriandrum sativum* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 133, p. 294–305, 2019.

DÁVILA-RODRÍGUEZ, Mónica *et al.* Antimicrobial activity of nanoemulsions of cinnamon, rosemary, and oregano essential oils on fresh celery. **LWT**, [s. l.], v. 112, p. 108247, 2019.

DONSÌ, Francesco *et al.* Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion- based delivery systems. **Procedia Food Science**, [s. l.], v. 1, p. 1666–1671, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002471>.

DONSÌ, Francesco *et al.* Green beans preservation by combination of a modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil with high pressure or pulsed light processing. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 106, p. 21–32, 2015.

DONSÌ, Francesco *et al.* Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s. l.], v. 22, p. 212–220, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856414000204>.

DONSÌ, Francesco; FERRARI, Giovanna. **Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2016.

DOS SANTOS CAVALCANTI, Adriano *et al.* Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 356–362, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X15001246>.

FENG, Liping *et al.* Molecular weight distribution, rheological property and structural changes of sodium alginate induced by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 34, p. 609–615, 2017.

GARCIA, Lorena Costa; TONON, Renata Valeriano; HUBINGER, Miriam Dupas. Effect of Homogenization Pressure and Oil Load on the Emulsion Properties and the Oil Retention of Microencapsulated Basil Essential Oil (*Ocimum basilicum* L.). <http://dx.doi.org/10.1080/07373937.2012.685998>, [s. l.], v. 30, n. 13, p. 1413–1421, 2012.

Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373937.2012.685998>. Acesso em: 2 dez. 2021.

GHADERI, L. *et al.* Development of antimicrobial nanoemulsion-based delivery systems against selected pathogenic bacteria using a thymol-rich *Thymus daenensis* essential oil. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 123, n. 4, p. 832–840, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13541>. Acesso em: 25 mar. 2021.

GHADETAJ, Ali; ALMASI, Hadi; MEHRYAR, Laleh. Development and characterization of whey protein isolate active films containing nanoemulsions of *Grammosciadium pterocarpum* Bioss. essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 16, p. 31–40, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214289417303174>.

GHARIBZAHEDI, Seyed Mohammad Taghi; MOHAMMADNABI, Sara. Characterizing the novel surfactant-stabilized nanoemulsions of stinging nettle essential oil: Thermal behaviour, storage stability, antimicrobial activity and bioaccessibility. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 224, p. 1332–1340, 2016.

GODDARD, E. D. Polymer/Surfactant Interaction: Interfacial Aspects. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 256, n. 1, p. 228–235, 2002.

GUERRA-ROSAS, M. I. *et al.* Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. **Food Control**, [s. l.], v. 77, p. 131–138, 2017.

GUERRA-ROSAS, María Inés *et al.* Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 52, p. 438–446, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X15300278>.

GUO, Liang *et al.* Influence of polysorbates (Tweens) on structural and antimicrobial properties for microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 590, p. 119939, 2020.

HAGHJU, Sara *et al.* Chitosan films incorporated with nettle (*Urtica dioica* L.) extract-loaded nanoliposomes: I. Physicochemical characterisation and antimicrobial properties. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 438–448, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652048.2016.1208294>.

HEURTAULT, Béatrice *et al.* Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, [s. l.], v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 2003.

HSOUNA, Anis Ben *et al.* Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 148, n. 1, p. 66–72, 2011.

HUANG, Mingyuan *et al.* Effects of nanoemulsion-based edible coatings with composite mixture of rosemary extract and ε-poly-l-lysine on the shelf life of ready-to-eat carbonado chicken. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 102, p. 105576, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X19320818>.

- HYLDGAARD, Morten; MYGIND, Tina; MEYER, Rikke Louise. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 3, 2012. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00012/abstract>.
- KARTHIK, P.; EZHILARASI, P. N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 1435–1450, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2015.1006767>.
- KAZEMEINI, Hamidreza; AZIZIAN, Asghar; ADIB, Hasti. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in turkey fillets by alginate edible coating with *Trachyspermum ammi* essential oil nano-emulsion. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 344, p. 109104, 2021.
- KHANZADI, Saeid *et al.* Alginate coarse/nanoemulsions containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil as edible coatings and the impact on microbial quality of trout fillet. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 873–881, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/are.14418>. Acesso em: 1 mar. 2021.
- KOZUCH, Benedykt *et al.* Comparative Stability Study of Polysorbate 20 and Polysorbate 80 Related to Oxidative Degradation. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 2332, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/9/2332/htm>. Acesso em: 8 jul. 2024.
- KUMAR, Neeraj *et al.* Toxicity of Food Additives. **Food Safety and Human Health**, [s. l.], p. 67–98, 2019.
- KUMAR, Mukesh; AHUJA, Munish; SHARMA, Surendra Kumar. Hepatoprotective study of curcumin-soya lecithin complex. **Scientia Pharmaceutica**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 761–774, 2008. Disponível em: [http://www.mdpi.com/2218-0532/76/4/761](https://www.mdpi.com/2218-0532/76/4/761).
- LIANG, Rong *et al.* Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 60, n. 30, p. 7548–7555, 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Acesso em: 25 mar. 2021.
- LIM, Jitkang *et al.* Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–14, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1556-276X-8-381>. Acesso em: 20 ago. 2024.
- LÓPEZ, Paloma Lucía *et al.* Oxidative Protection of Sunflower Oil Used in Industrial Process at High Temperature by Volatile Components from *Origanum vulgare* and *Humulus lupulus* Essential Oils. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 2813–2824, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11947-023-03105-1>.
- MAA, Yuh-Fun; HSU, Chung C. Performance of Sonication and Microfluidization for Liquid–Liquid Emulsification. **Pharmaceutical Development and Technology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 233–240, 1999. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/PDT-100101357>.
- MAHDI JAFARI, Seid; HE, Yinghe; BHANDARI, Bhesh. Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. **International Journal of Food**

Properties, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 475–485, 2006. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942910600596464>.

MALVERN INSTRUMENTS. Size Theory. In: Worcestershire: Zetasizer Nano User Manual MAN 0485, 2013. p. 1–8.

MCCLEMENTS, David Julian. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408390701289292>.

MCCLEMENTS, David Julian. Colloidal basis of emulsion color. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, [s. l.], v. 7, n. 5–6, p. 451–455, 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029402000754>.

MCCLEMENTS, David Julian. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 2011. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C0SM00549E>.

MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C2SM06903B>.

MCCLEMENTS, David Julian; JAFARI, Seid Mahdi. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. In: **NANOEMULSIONS**. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 3–20. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128118382000011>.

MCCLEMENTS, David Julian; JAFARI, Seid Mahdi. **Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018.

MCCLEMENTS, David Julian; RAO, Jiajia. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011. Disponível em: <https://www.tandfonline.ez30.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1080/10408398.2011.559558>. Acesso em: 2 mar. 2021.

MCCLEMENTS, David Julian; XIAO, Hang. Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics. **Food & Function**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 202–220, 2012. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2012/fo/c1fo10193e>. Acesso em: 8 jul. 2024.

MENEGALI, Beatriz Schmidt *et al.* Pink pepper extract as a natural antioxidant in chicken burger: Effects on oxidative stability and dynamic sensory profile using Temporal Dominance of Sensations. **LWT**, [s. l.], v. 121, p. 108986, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819313283>.

MOGHIMI, Roya *et al.* Investigations of the effectiveness of nanoemulsions from sage oil as antibacterial agents on some food borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 71, p. 69–76, 2016.

MOORE-NEIBEL, Katherine *et al.* Antimicrobial activity of oregano oil against antibiotic-resistant *Salmonella enterica* on organic leafy greens at varying exposure times and storage temperatures. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 123–129, 2013.

N, Adharsh Ashok; SONTAKKE, Manmath. Plant-based emulsifiers: Sources, extraction, properties and applications. **The Pharma Innovation**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 08–16, 2023. Disponível em: <https://www.thepharmajournal.com/archives/?year=2023&vol=12&issue=5&ArticleId=20043>.

NAMBAM, J. S.; PHILIP, John. Competitive adsorption of polymer and surfactant at a liquid droplet interface and its effect on flocculation of emulsion. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 366, n. 1, p. 88–95, 2012.

NAZZARO, Filomena *et al.* Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1451>. Acesso em: 17 mar. 2021.

NIU, Fuge *et al.* Physical and antimicrobial properties of thyme oil emulsions stabilized by ovalbumin and gum arabic. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 212, p. 138–145, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616308640>.

NOURI, Mojgan; BAGHAEE-RAVARI, Sareh; EMADZADEH, Bahareh. Nano-emulsified savory and thyme formulation show limited efficacy to suppress *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* compared with pure oil. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 161, p. 113216, 2021.

OKURO, Paula K. *et al.* Lipid Recovery from Concentrated Emulsions by Freezing–Thawing as an Alternative to Solvent-Based Extraction: A Case Study on Mayonnaise. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], v. 124, n. 11, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.202200101>.

OKURO, Paula K.; GOMES, Andresa; CUNHA, Rosiane L. Hybrid oil-in-water emulsions applying wax(lecithin)-based structured oils: Tailoring interface properties. **Food Research International**, [s. l.], v. 138, p. 109798, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920308231>.

OREOPOULOU, Antigoni; TSIMOGIANNIS, Dimitrios; OREOPOULOU, Vassiliki. Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. **Polyphenols in Plants**, [s. l.], p. 243–259, 2019.

OZOGUL, Yesim *et al.* Recent developments in industrial applications of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 304, p. 102685, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868622000872>.

PAVONI, Lucia *et al.* An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 135, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/1/135>. Acesso em: 9 abr. 2021.

PAVONI, Lucia *et al.* Properties and stability of nanoemulsions: How relevant is the type of

surfactant?. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 58, p. 101772, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224720302768>.

PERES, Gisele Louro; LEITE, Daiani Canabarro; SILVEIRA, Nadya Pesce da. Ultrasound effect on molecular weight reduction of amylopectin. **Starch - Stärke**, [s. l.], v. 67, n. 5–6, p. 407–414, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/star.201400230>.

QUEMADA, D. Rheological modelling of complex fluids. I. The concept of effective volume fraction revisited. **The European Physical Journal Applied Physics**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 119–127, 1998. Disponível em: <http://www.epjap.org/10.1051/epjap:1998125>.

SALVIA-TRUJILLO, Laura *et al.* Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against Escherichia coli of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. **Food Control**, [s. l.], v. 37, p. 292–297, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513004611>.

SALVIA-TRUJILLO, Laura *et al.* Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 43, p. 547–556, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X14002550>.

SALVIA-TRUJILLO, Laura *et al.* Physicochemical Characterization of Lemongrass Essential Oil-Alginate Nanoemulsions: Effect of Ultrasound Processing Parameters. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 2439–2446, 2013. Disponível em: <https://link.springer-com.ez30.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s11947-012-0881-y>. Acesso em: 24 mar. 2021.

SILVA, Klycia Fidelis Cerqueira e *et al.* Sacha inchi oil encapsulation: Emulsion and alginate beads characterization. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 116, p. 118–129, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308518308174>.

TADROS, Tharwat *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAGHAVI, Elham *et al.* Formulation and functionalization of linalool nanoemulsion to boost its antibacterial properties against major foodborne pathogens. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 44, p. 101430, 2021.

TRUJILLO-CAYADO, L. A. *et al.* Rheological properties and physical stability of ecological emulsions stabilized by a surfactant derived from cocoa oil and high pressure homogenization. **Grasas y Aceites**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. e087, 2015. Disponível em: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1553/1751>.

USHIKUBO, F.Y.; CUNHA, R.L. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 34, p. 145–153, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X12002810>.

VARGAS, Maria *et al.* Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 18, n. 12, p.

1146–1152, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694608001179>.

WAN, Jing *et al.* Influence of oil phase composition on the antifungal and mycotoxin inhibitory activity of clove oil nanoemulsions. **Food and Function**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 2872–2882, 2018. Disponível em: <https://pubs-rsc-org.ez30.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2018/fo/c7fo02073b>. Acesso em: 25 mar. 2021.

XUE, Jia; MICHAEL DAVIDSON, P.; ZHONG, Qixin. Antimicrobial activity of thyme oil co-nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 210, p. 1–8, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515300283>.

YEAP, Swee Pin *et al.* Role of Particle–Particle Interaction Towards Effective Interpretation of Z -Average and Particle Size Distributions from Dynamic Light Scattering (DLS) Analysis . **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 6957–6964, 2018.

ZHANG, H. Y. *et al.* Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 618–627, 2012.

ZHAO, Siqi *et al.* Characterization of Nanoemulsions Stabilized with Different Emulsifiers and Their Encapsulation Efficiency for Oregano Essential Oil: Tween 80, Soybean Protein Isolate, Tea Saponin, and Soy Lecithin. **Foods**, [s. l.], v. 12, n. 17, p. 3183, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/17/3183>.

CAPÍTULO III

REVESTIMENTO ATIVO COM NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA PARA CONSERVAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL

RESUMO

O queijo Minas Frescal é o quarto tipo de queijo mais consumido no Brasil, porém bastante suscetível à contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos, devido ao teor de umidade e pH elevados. O óleo essencial de pimenta rosa (PPEO) apresenta propriedades antioxidantes e antimicrobianas, podendo ser encapsulado em nanoemulsões para utilização como revestimentos ativos na conservação de alimentos. Com intuito de estender a vida útil do queijo Minas Frescal, um revestimento à base de alginato de sódio e nanoemulsão de PPEO foi aplicado em miniqueijos. A formulação da nanoemulsão consistiu em fase contínua contendo 1,0% (m/m) de alginato de sódio e 1,0% (m/m) de Tween 80 ou 20, enquanto a fase dispersa foi constituída de 0,75% (m/m) de óleo de girassol e 1,0% (m/m) de óleo essencial de pimenta rosa. Distribuição de tamanho de gota e índice de polidispersidade dos revestimentos à base de nanoemulsões foram avaliados. A eficiência antimicrobiana do revestimento foi testada contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* inoculados em miniqueijos Minas Frescal. Além disso, os efeitos do revestimento sobre as propriedades físico-químicas dos miniqueijos foram avaliados. O revestimento foi eficaz em manter o pH, umidade e os níveis de acidez controlados, e manteve a textura e a coloração preservadas. Entretanto, a eficácia antimicrobiana do revestimento foi comprometida devido ao alto grau de sinérese e interação dos componentes do PPEO com a matriz do queijo. Assim, o presente trabalho evidencia a viabilidade do uso do revestimento à base de alginato de sódio e nanoemulsão de PPEO nas propriedades físico-químicas e de textura dos queijos Minas Frescal. Entretanto, torna-se necessário avaliar cuidadosamente a formulação para garantir que a eficiência antimicrobiana seja preservada.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, Biopreservação, Óleo essencial de pimenta rosa, nanoemulsão, Queijo Minas Frescal.

ABSTRACT

Minas Frescal cheese is a popular product and the fourth most consumed type of cheese in Brazil. However, due to its high pH and moisture content, it is highly susceptible to contamination by spoilage and pathogenic microorganisms. Pink pepper essential oil (PPEO) exhibits antioxidant and antimicrobial properties, making it suitable for encapsulation in nanoemulsions and use as active coatings in food preservation. To extend the shelf life of Minas Frescal cheese, a coating based on sodium alginate and PPEO nanoemulsion was applied. The nanoemulsion formulation consisted of 1.0% (w/w) sodium alginate, 0.75% (w/w) sunflower oil, 1.0% (w/w) Tween 80 or Tween 20, and 1.0% (w/w) pink pepper essential oil. Droplet size and polydispersity index of the nanoemulsion-based coatings were evaluated. The antimicrobial efficiency of the coating was tested against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* inoculated in Minas Frescal mini cheeses. Additionally, the effects of the coating on the physicochemical properties of the mini cheeses were assessed. The coating effectively maintained pH, moisture, and acidity levels, and preserved the texture and color of the mini cheeses. However, its antimicrobial efficacy was compromised due to the high degree of syneresis and interactions between PPEO components and the cheese matrix. Therefore, this study highlights the feasibility of using a sodium alginate and PPEO nanoemulsion-based coating for maintaining the physicochemical and textural properties of Minas Frescal cheese. Nevertheless, careful evaluation of the formulation is necessary to ensure antimicrobial efficiency is preserved.

Keywords: Antimicrobial activity, Biopreservation, Pink pepper essential oil, Nanoemulsion, Minas Frescal cheese.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento na preferência dos consumidores por alimentos mais saudáveis e livres de aditivos químicos, tornando o uso de conservantes naturais uma alternativa promissora para a preservação de alimentos sem comprometer sua qualidade e segurança. Na indústria alimentícia, o crescimento de microrganismos é o principal fator de controle, uma vez que estes são os responsáveis por contaminações que causam riscos à saúde dos consumidores (Rather *et al.*, 2021). Nesse cenário, compostos naturais com atividade biopreservativa têm sido utilizados como substitutos aos conservantes sintéticos comumente empregados na conservação de alimentos (Dong *et al.*, 2024).

Entre essas alternativas, os óleos essenciais (OEs) têm ganhado destaque entre os compostos naturais com atividade antioxidante e antimicrobiana (A. Shaaban, 2020). Os OEs são metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas que conferem proteção contra condições adversas como ataque de microrganismos, insetos e variações climáticas (Aqeel *et al.*, 2023). Os OEs são constituídos por uma complexa mistura de compostos voláteis e não voláteis que são responsáveis por conferir inúmeras propriedades, incluindo atividades antioxidantes e antimicrobianas, que são propriedades importantes para o uso de OEs na indústria de alimentos (Falleh *et al.*, 2020).

Dentre os óleos essenciais com potencial aplicação, o óleo essencial de pimenta rosa (PPEO) obtido da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) tem se destacado (Fontes *et al.*, 2023; Locali-Pereira; Lopes; Nicoletti, 2022). Essa árvore, nativa do Brasil, Paraguai e Argentina, que se encontra difundida especialmente na costa brasileira e pela América do Sul, possui um fruto conhecido como pimenta rosa, do qual se extrai o óleo essencial composto predominantemente por monoterpenos, que conferem propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Andrade; Poncelet; Ferreira, 2017; Oliveira *et al.*, 2024). Estudos anteriores demonstraram efetividade antimicrobiana do PPEO tanto *in vitro* quanto *in situ* e como revestimento ativo (Dannenberg *et al.*, 2016, 2017, 2019; Lima *et al.*, 2024; Locali-Pereira; Lopes; Nicoletti, 2022; Uliana *et al.*, 2016). No entanto, estudos avaliando a atividade antimicrobiana do PPEO encapsulado contra microrganismos patógenos são escassos.

Apesar das propriedades benéficas dos óleos essenciais, a sua incorporação direta em alimentos enfrenta desafio técnicos, como sua baixa solubilidade em água, sua volatilidade, e seu aroma e sabor característicos que impactam negativamente as propriedades sensoriais dos alimentos, além de sua instabilidade quando em contato com outros componentes alimentares (Pavoni *et al.*, 2019; Weisany *et al.*, 2022). Desse modo, para superar essas limitações, as nanoemulsões têm sido amplamente estudadas como uma estratégia para proteger e estabilizar os óleos essenciais, aumentando sua eficácia (Pavoni *et al.*, 2020; Reis; Ambrosi; Luccio, 2022).

As nanoemulsões óleo-em-água são sistemas coloidais caracterizados por gotas de óleo nanométricas ($d < 200$ nm) dispersas em uma fase aquosa e estabilizadas por um surfactante (McClements, 2012; McClements; Rao, 2011). O tamanho nanométrico das gotas confere à nanoemulsão estabilidade contra processos gravitacionais, além de melhorar a atividade biológica dos compostos lipofílicos devido ao aumento da área superficial (Asadinezhad *et al.*, 2019). Essa tecnologia possibilita a redução da quantidade necessária do ingrediente ativo, como OEs, para atingir o efeito desejado (Radi *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2019). Apesar de seus benefícios, as nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e suscetíveis a fenômenos como coalescência, floculação e amadurecimento de Ostwald, que comprometem sua eficácia (Asadinezhad *et al.*, 2019). O uso de óleo de girassol como estabilizante auxilia na melhoria da estabilidade física-química, reduzindo a separação de fases e aumentando a retenção de compostos ativos, como os óleos essenciais, dentro da formulação (Pavoni *et al.*, 2020). Devido às suas vantagens, as nanoemulsões podem ser aplicadas diretamente aos

alimentos na forma líquida ou como revestimento ativo na superfície dos alimentos, sendo este último obtido pela adição de um biopolímero à fase aquosa da nanoemulsão, como o alginato de sódio (Parreidt; Müller; Schmid, 2018; Ramos *et al.*, 2021).

O revestimento ativo é caracterizado por uma camada fina de biopolímero contendo compostos com propriedades que prolonguem a vida útil e preservem a qualidade dos alimentos (Artiga-Artigas, María; Acevedo-Fani; Martín-Bellos, 2017; Gupta; Biswas; Roy, 2022). A combinação do alginato de sódio com nanoemulsões de óleos essenciais para produção de revestimentos ativos e sua utilização na manutenção da qualidade e segurança de alimentos tem sido estudada, e os resultados demonstraram sua eficiência na extensão do *shelf life* de tomates (Pirozzi *et al.*, 2020), conservação de fatias de abacaxi (Prakash; Baskaran; Vadivel, 2020), e manutenção da qualidade e segurança de fatias de queijo inoculadas com *Listeria monocytogenes* (Artiga-Artigas, M.; Acevedo-Fani; Martín-Bellos, 2017).

Entre os alimentos que podem potencialmente se beneficiar dessa tecnologia está o queijo Minas Frescal, que é um dos produtos derivados de leite mais populares e produzidos no Brasil (Ribeiro Júnior *et al.*, 2020). O queijo Minas Frescal é um queijo de massa crua não padronizado, podendo assim apresentar variação em sua composição. Esse tipo de queijo apresenta conteúdo de umidade variando de 46 a 55%, proteínas de 12 a 18%, gordura de 20 a 29% e pH em torno de 6,0 (Rocha *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021). Devido ao pH alto e umidade elevada, esse queijo se torna suscetível ao desenvolvimento microbiano, tornando-o perecível mesmo sob refrigeração, devendo ser consumido dentro dos primeiros 15 dias após a fabricação (Falih *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2021). A contaminação microbiana nesses queijos pode ocorrer de inúmeras formas durante a produção, comprometendo a qualidade final do produto. Além da perda da qualidade, alguns microrganismos relacionados à contaminação do queijo Minas Frescal como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. podem representar risco à saúde pública (Campagnollo *et al.*, 2022). *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* são microrganismos de relevância na segurança de alimentos, especialmente em produtos lácteos como o queijo Minas Frescal. A *Listeria monocytogenes* é um patógeno de preocupação global, associado a surtos de listeriose, uma infecção grave que pode levar a complicações neurológicas e abortos em gestantes, enquanto, o *Staphylococcus aureus* é um importante agente de intoxicação alimentar, capaz de produzir enterotoxinas termoestáveis que permanecem ativas mesmo após processos térmicos convencionais (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2020). A presença dessas bactérias em produtos lácteos representa um risco significativo à saúde pública, reforçando a necessidade de avaliar estratégias antimicrobianas eficazes para sua inibição.

Assim, estratégias de conservação eficazes que possam inibir esses patógenos são essenciais para garantir a segurança e a qualidade do produto durante o seu armazenamento e consumo.

A aplicação de revestimentos é indicada para alimentos que são mais suscetíveis à contaminação principalmente com altos conteúdos de umidade e proteínas, que são fatores cruciais para o desenvolvimento de microrganismos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do revestimento ativo à base de alginato de sódio e nanoemulsão de óleo essencial de pimenta rosa na conservação de miniqueijos Minas Frescal, focando na atividade antimicrobiana do revestimento contra os microrganismos patógenos *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, buscou-se investigar a influência desse revestimento sobre as propriedades físico-químicas e de textura dos miniqueijos Minas Frescal, visando compreender o impacto do tratamento na qualidade e segurança do produto ao longo do armazenamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O óleo essencial de pimenta rosa (PPEO) foi adquirido da Ferquima (São Paulo, Brasil). A empresa forneceu a composição do óleo essencial: γ -terpineno (32%), α -felandreno (20%), δ -limoneno (15%), α -pineno (10%) e ρ -cimeno (4%). Os surfactantes Tween 20 e Tween 80, bem como o glicerol, foram adquiridos da Dinamica (Brasil). O alginato de sódio foi obtido da GastronomyLab® (Brasil). O óleo de girassol foi gentilmente doado pela Cargill Global (SP, Brasil). As nanoemulsões foram produzidas com água ultrapura de um sistema Milli-Q Plus. As bactérias empregadas na investigação do estudo da atividade antimicrobiana incluíram *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) da Universidade de Campinas. O leite integral tipo B foi adquirido do Laticínio Dois Irmãos, (Paracambi, RJ), sendo comercializado em embalagens plásticas de 1 litro, com dois dias de armazenamento (5 ± 2 °C). O cloreto de cálcio 40% (m/m) (Bela Vista Produtos Enzimáticos Indústria e Comércio Ltda, Alto Bela Vista, SC, Brasil) e coagulante líquido HA-LA 1:3000/75 IMCU, (Christian Hansen, Valinhos, SP) foram adquiridos no mercado local.

2.2 Preparação da nanoemulsão

As formulações das nanoemulsões óleo-em-água foram baseadas nos resultados do estudo do capítulo II, contendo óleo essencial de pimenta rosa (1,0% m/m), alginato de sódio (1,0% m/m), surfactantes não iônicos Tween 20 ou Tween 80 (1,0% m/m) e óleo de girassol (0,75% m/m). O óleo de girassol foi adicionado à formulação com objetivo de melhorar a estabilidade e o índice de retenção do óleo essencial de pimenta rosa na nanoemulsão. A identificação e composição das nanoemulsão são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 Identificação e composição das nanoemulsões

Amostra	PPEO (%m/m)	Alginato de sódio (%m/m)	T20 (%m/m)	T80 (%m/m)	Óleo de girassol (%m/m)
NE-0.75T20	1,0	1,0	1,0	-	0,75
NE-0.75T80	1,0	1,0		1,0	0,75

NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% (m/m) de óleo de girassol.

A fase aquosa foi preparada pela dissolução do alginato de sódio em água ultrapura a 70 °C sob agitação magnética até a completa dissolução, seguida de resfriamento em temperatura de refrigeração. O surfactante não-iônico foi adicionado à fase aquosa após a completa dissolução e resfriamento do alginato de sódio. A emulsão primária foi obtida combinando a fase aquosa e a fase oleosa, composta pelo óleo essencial de pimenta rosa e o óleo de girassol usando um Ultra Turrax® T18 digital (IKA, Staufen, Alemanha) por 5 min a 13.000 rpm a 20 °C. A nanoemulsão foi produzida submetendo a emulsão primária a posterior processo de homogeneização a alta pressão (modelo APL - IBH: Indústria Brasileira de Homogeneizadores – Artepeças Ltda.) a 100 MPa por 5 ciclos, com trocador de calor acoplado à saída do equipamento, mantendo a temperatura das nanoemulsões em torno de 35 °C. Subsequentemente, a nanoemulsão foi resfriada em um banho de gelo para manter a temperatura em torno de 25 °C. O pH das nanoemulsões foi medido após o processamento usando um pHmetro modelo pH21(Hanna Instruments, Brasil), e manteve o valor dentro do esperado de $6,8 \pm 0,2$. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

2.3 Distribuição do tamanho de gota

A distribuição do tamanho de gota das nanoemulsões foi determinada usando um Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltda, Worcestershire, UK) em um comprimento de onda de 633 nm e temperatura de 25 °C, com um detector de 173°. As amostras foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:99 com o intuito de evitar dispersão múltipla. A distribuição de tamanho foi medida baseada na teoria de Mie, usando um valor de índice de refração de 1,46 para a fase dispersa (mistura do óleo essencial de pimenta rosa e óleo de girassol) e 1,33 para a fase contínua (aquosa). O tamanho médio das gotas e o índice de polidispersidade foram avaliados com base na distribuição de intensidade do tamanho de gota. Os valores de D₁₀, D₅₀ e D₉₀ foram derivados da distribuição ponderada do volume, indicando o tamanho abaixo do qual 10%, 50% ou 90% de todas as partículas estão localizadas, respectivamente.

2.4 Filme ativo com nanoemulsão

Os filmes foram desenvolvidos exclusivamente para avaliar como adição da nanoemulsão afeta sua permeabilidade ao vapor de água.

2.4.1 Produção do filme

A solução filmogênica foi preparada primeiramente pela adição de glicerol (10g/L), como agente plastificante na solução de alginato de sódio (1,0% m/m) sob agitação magnética a 300 rpm por 15 min. Posteriormente, seguiu-se os procedimentos descritos para produção da emulsão primária e nanoemulsão descritos na seção 2.2. Em uma placa de Petri de poliestireno foram vertidos 15 g da solução filmogênica para serem secos em estufa de convecção forçada por 24 horas a 30 ± 1 °C. Após a secagem, os filmes foram destacados das placas e acondicionados em dessecadores com acetato de sódio (30% de umidade relativa) para posterior caracterização.

2.4.2 Espessura dos filmes

Para aferir a espessura dos filmes, foi utilizado um micrômetro digital com precisão de 0,001 mm. A espessura dos filmes foi determinada a partir de uma média de seis medidas aleatórias.

2.4.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada de acordo com o método descrito por Chakka; Sriraksha; Ravishankar (2021). Os filmes foram fixados nos copos de permeabilidade de água contendo sílica gel sendo, em seguida, levados ao dessecador contendo água (100% umidade relativa). Os copos foram pesados diariamente em balança semi-analítica por 5 dias. A PVA foi calculada pela equação 1:

$$PVA = \left(\frac{w}{t} \right) \cdot \left(\frac{x}{A \cdot \Delta P} \right) \quad (1)$$

Onde x é o valor médio da espessura do filme (mm), ΔP é a diferença da pressão parcial de vapor da atmosfera com a sílica gel e água pura (2,642 kPa a 22 °C), A é a área de permeação (9,1 cm²). O termo w/t foi calculado por regressão linear a partir dos pontos de ganho de peso (g) e o tempo (h), no período de taxa constante. Os testes foram realizados em duplicata.

2.5 Produção dos Miniqueijos tipo Minas Frescal

As etapas de fabricação dos miniqueijos tipo Minas Frescal são apresentadas na Figura 1. Os miniqueijos foram produzidos em laboratório com condições controladas (Hynes; Ogier;

Delacroix-Buchet, 2000), com intuito de minimizar a contaminação microbiológica e reduzir a variabilidade das amostras.

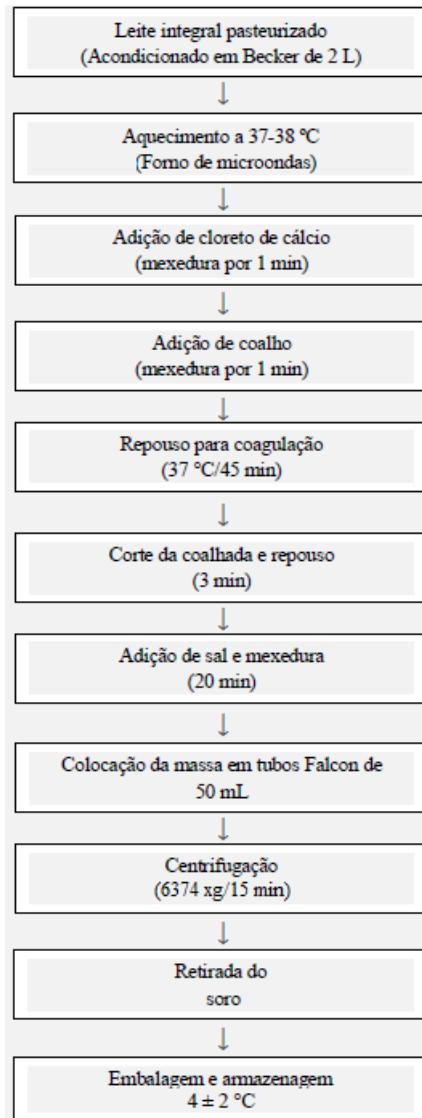


Figura 1 Fluxograma de produção do queijo tipo Minas Frescal (segundo Hynes; Ogier; Delacroix-Buchet, (2000))

Na produção dos miniqueijos utilizou-se leite integral pasteurizado tipo B. O leite foi transferido para um bêquer de 2 litros, previamente higienizado, e aquecido em microondas (Electrolux, modelo MI41S, Brasil) por 5 minutos até temperatura de 37 ± 2 °C.

Após aquecimento, para cada litro de leite foi adicionado 0,4 mL de cloreto de cálcio a 40% (m/m) (Bela Vista Produtos Enzimáticos Indústria e Comércio Ltda, Alto Bela Vista, SC, Brasil) em mistura lenta por 1 minuto, seguido da adição de 0,8 mL de coalho (coagulante líquido HA-LA (Christian Hansen, Valinhos, SP), com mistura lenta por 1 min, seguindo as instruções dos fabricantes. Após a mistura, o repouso para a coagulação foi realizado em estufa (Marconi, Incubadora B.O.D. M.A. 415) a 37 ± 2 °C por um período de 45 min.

Em seguida, a massa coalhada foi cortada com faca nos sentidos horizontal, longitudinal e transversal para obtenção de cubos com aproximadamente 1,0 cm de aresta. Após os cortes, a massa foi deixada em descanso por aproximadamente 3 min, seguido de adição de 1,2% (m/m) de cloreto de sódio e mistura por 20 min. A massa de queijo obtida foi transferida para os tubos Falcon com uso de peneira e colher. Em seguida, os tubos foram centrifugados em centrífuga

(Thermo Heraeus Multifuge 3 L-R, Thermo Heraeus Kendro, Alemanha) a 6374 xg por 15 min, possibilitando a extração de aproximadamente 20 mL de soro em cada mini queijo ao final da centrifugação. Os miniqueijos com cerca de 25g foram cortados em pedaços semelhantes com 2,5 cm de diâmetro, 1,0 cm de altura, e com aproximadamente 5g. Conforme o fluxograma na figura 3, para as análises microbiológicas, os miniqueijos foram primeiramente inoculados, depois revestidos, embalados individualmente em sacos de polietileno estéreis e armazenados sob refrigeração a 5 °C por 28 dias. Para caracterização física e físico-químicas, os miniqueijos foram revestidos, embalados individualmente em sacos de polietileno e armazenados a 4°C por 28 dias. Essas operações foram conduzidas em cabine de segurança do tipo fluxo laminar (VECO – VLF1-12, Campinas, SP) com intuito de prevenir possíveis contaminações dos miniqueijos.



Figura 2 Miniqueijos fatiados logo após o processo de fabricação.

Fonte: Própria

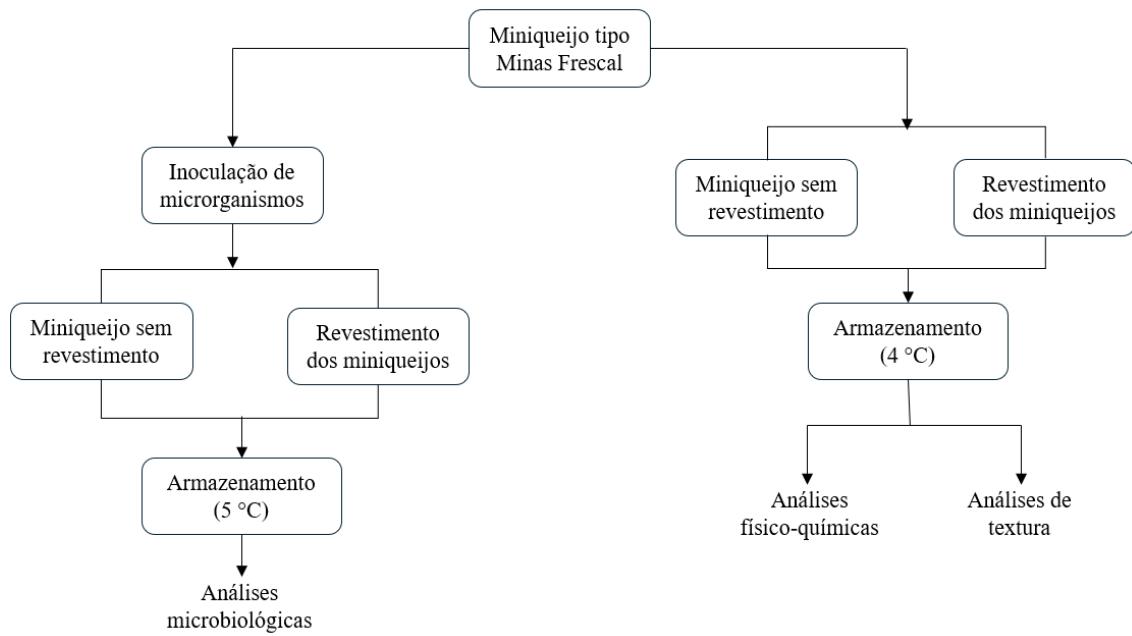


Figura 3 Fluxograma de revestimento e análises dos miniquejos

Fonte: Própria

2.6 Aplicação do revestimento ativo no queijo Minas Frescal

A aplicação do revestimento ativo nos miniqueijos ocorreu conforme o procedimento descrito por Artiga-Artigas, Acevedo-Fani e Martín-Belloso (2017) e Bedoya-Serna *et al.* (2018), com modificações.

Os pedaços de queijos previamente cortados (2,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura) foram imersos na solução de revestimento por 1 min e colocados para secar em temperatura ambiente por 5 min. A adição de cloreto de cálcio (CaCl_2), que age como agente reticulante, não foi necessária, uma vez que o queijo já apresenta cálcio em sua composição (Artiga-Artigas, María; Acevedo-Fani; Martín-Belloso, 2017). Os tratamentos seguiram o seguinte esquema:

Controle: minqueijo sem revestimento;

Alginato: minqueijo revestido com solução de alginato 1% (m/m)

NE-0.75T20: minqueijo revestido com a nanoemulsão NE-0.75T20;

NE-0.75T80: minqueijo revestido com a nanoemulsão NE-0.75T80.

Após o revestimento, as amostras foram embaladas em sacos de polietileno e armazenadas por 28 dias sob refrigeração durante 28 dias a 4 °C para caracterização físico-química e física, e a 5 °C para caracterização microbiológica.

2.7 Análises microbiológicas dos miniqueijos

Listeria monocytogenes e *Staphylococcus aureus* foram selecionados com base em resultados de testes anteriores, uma vez que a nanoemulsão não foi capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. nos testes *in vitro* (Capítulo II).

2.7.1 Preparação do inóculo

As cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foram previamente cultivadas em ágar TSA (triptona de soja). Os microrganismos foram inoculados em 10 mL de caldo TSA e incubados a 35 °C por 24 horas até atingir a concentração de 10^8 UFC/mL. Após o período de incubação, foi realizada a diluição seriada dos inóculos em água peptonada 0,1% até as concentrações de 10^6 e 10^4 UFC/mL para *Listeria monocytogenes*

e 10^5 e 10^3 UFC/mL para *Staphylococcus aureus*. As diferentes concentrações permitiram observar a eficiência dos tratamentos tanto em contaminações moderadas quanto em elevadas. A concentração inicial de 10^3 UFC/g para *Staphylococcus aureus* foi escolhida com base na legislação de queijo (Brasil, 2022). O uso de diferentes concentrações microbianas iniciais permitem avaliar o efeito do revestimento em níveis diferentes de contaminação.

2.7.2 Atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* nos queijos inoculados

As análises microbiológicas foram realizadas nos miniqueijos tipo Minas Frescal inoculados com *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Miniqueijos do tipo Minas Frescal foram mergulhados na suspensão de água peptonada contendo 10^6 e 10^4 UFC/mL para *Listeria monocytogenes* e 10^5 e 10^3 UFC/mL para *Staphylococcus aureus* por 20 minutos. Após removidos da suspensão, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 5 minutos para secar o inóculo. Logo após a secagem, foi seguido o seguinte esquema de tratamento:

Controle: miniqueijos inoculados, sem revestimento, embalados em sacos estéreis, selados em fluxo laminar e armazenados a 5 °C por 28 dias.

Alginato: miniqueijos inoculados imersos na solução de alginato 1% (m/m), por 1 minuto, seguida da retirada e secagem em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a secagem, os miniqueijos foram embalados em sacos estéreis, selados em fluxo laminar e armazenados a 5 °C por 28 dias.

PPEO: miniqueijos inoculados imersos na solução de óleo essencial de pimenta rosa (PPEO) 1% (m/m) por 1 minuto, seguida da retirada e secagem em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a secagem, os miniqueijos foram embalados em sacos estéreis, selados em fluxo laminar e armazenados a 5 °C por 28 dias.

NE-0.75T80: miniqueijos inoculados imersos na NE-0.75T80 por 1 minuto, seguida da retirada e secagem em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a secagem, os miniqueijos foram embalados em sacos estéreis, selados em fluxo laminar e armazenados a 5 °C por 28 dias. Essa nanoemulsão foi escolhida para o teste de atividade antimicrobiana nos miniqueijos por ter apresentado maior atividade antimicrobiana *in vitro* (Capítulo II).

A avaliação dos miniqueijos durante o armazenamento foi realizada nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Cada amostra foi homogeneizada em água peptonada 0,1%, inoculadas em placas de Petri contendo ágar Oxford, com suplemento para *Listeria monocytogenes* e incubadas a 37 °C por 24 horas. A detecção de *Staphylococcus aureus* foi realizada pelo TEMPO® (APHA, 2001) e método TEMPO STA 80002 (bioMérieux, França). O estudo foi conduzido em triplicata e os resultados expressos em log UFC/g.

2.8 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas dos miniqueijos tipo Minas Frescal foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa nº 30 de 26 de Junho de 2018 (Brasil, 2018), abrangendo umidade, pH e acidez titulável (expressa em teor de ácido láctico).

2.8.1 Umidade

Para a determinação da umidade, 2 g de amostra de miniqueijo tipo Minas Frescal foram pesados em pesa-filtro com adição de areia, previamente seco a 105 °C e devidamente tarado.

A secagem das amostras ocorreu a 103 °C por um período de 3 horas, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem. As amostras foram levadas novamente para a estufa e o procedimento de aquecimento e resfriamento repetido até a obtenção de peso constante. A equação (2) foi usada na determinação do teor de umidade das amostras.

$$\% \text{ umidade} = \frac{100 \times N}{P} \quad (2)$$

Onde, N é a massa de água evaporada (g) e P a massa da amostra inicial (g).

2.8.2 Sinérese

A sinérese foi quantificada pela quantidade de soro de leite liberada por cada amostra de queijo em sua própria embalagem. Os resultados obtidos em porcentagem foram calculados de acordo com a equação 3.

$$\% \text{ sinérese} = \left(\frac{PS}{PA} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde PS é a massa de soro (g) e PA é a massa inicial da amostra (g).

2.8.3 pH

A avaliação do pH foi realizada de acordo com a metodologia nº 981.12 estabelecida pela AOAC (2010). Foram homogeneizadas 10 g de amostra em 100 mL de água destilada aquecida a 45 °C, e as leituras sendo realizadas em potenciômetro digital modelo pH21(Hanna Instruments, Brasil) previamente calibrado. As análises foram realizadas em triplicata.

2.8.4 Acidez total

A acidez total foi determinada transferindo 10 g de amostra do miniqueijo tipo Minas Frescal para um béquer com 50 mL de água isenta de gás carbônico aquecida, seguido de agitação até a melhor dissolução possível da amostra. A solução foi transferida para um balão de 100 mL e o volume completado com água. Após resfriamento, uma alíquota de 50 mL da amostra foi transferida para um Erlenmeyer e 0,15 mL de solução alcóolica de fenolftaleína a 1,0% (m/v) foi adicionada, sendo titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L até a obtenção e manutenção da coloração rósea por 30 segundos. A acidez foi calculada utilizando a equação 4.

$$\% \text{ ácido lático} = \left(\frac{f \times V \times 0,09 \times N}{m} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1N;

V = volume de solução de hidróxido de sódio utilizado na titulação (em mL);

0,09 = fator de correção do ácido lático;

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio (0,1 N).

Os resultados foram expressos em g de ácido lático por 100g de amostra.

2.8.5 Cor

A cor dos miniqueijos revestidos e sem revestimento foram medidas com um colorímetro CR-400 (Konica Minolta, Japão). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente. Os valores CIE L^* , a^* e b^* foram determinados e o índice de brancura (WI) calculado com a equação 5.

$$WI = 100 - ((100 - L^*)^2 + (a^{*2} + b^{*2}))^{0.5} \quad (5)$$

em que L^* representa a luminosidade, a^* determina a posição entre o verde e o vermelho e b^* determina a posição entre o azul e o amarelo.

2.9 Perfil de Textura

O perfil de textura dos miniqueijos tipo Minas Frescal foi determinado utilizando um texturômetro TA.XTplus (Stable Micro Systems, Inglaterra) equipado com uma célula de carga de 5 kg e cilindro de 36 mm de diâmetro, operando com dois ciclos de compressão-descompressão, com 50% de compressão máxima. Os dados foram coletados no programa Texture Expert for Windows 1.20 (Stable Micro Systems, Inglaterra).

Foram analisados os parâmetros de dureza, coesividade, elasticidade, adesividade e mastigabilidade. Para cada amostra foram realizadas 10 repetições.

2.10 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a análises estatísticas usando o software R i386 (versão 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria) para verificar o comportamento das amostras por meio da análise de variância (ANOVA). Quando uma diferença estatística foi observada ($p < 0,05$), o teste de Tukey foi empregado para uma investigação mais aprofundada da diferença entre as médias correspondentes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Distribuição de tamanho de gotas das nanoemulsões

Nanoemulsões são caracterizadas por diâmetros de gota menores que 200 nm (McClements, 2012; Tadros *et al.*, 2004). De acordo com essa classificação, as duas formulações produzidas, NE-0.75T20 e NE-0.75T80, podem ser classificadas como nanoemulsões, pois apresentaram diâmetros médios de gota de 171,1 nm e 182,3 nm, sem diferença estatística entre elas (Tabela 2). A Figura 4 apresenta a distribuição do tamanho de gota das nanoemulsões. As curvas de distribuição de tamanho em intensidade e volume mostraram uma distribuição bimodal, que indica a uma distribuição de tamanho de gotas polidispersa. Neste caso, os valores de D10, D50 e D90 podem auxiliar na interpretação da polidispersidade do tamanho das gotas das nanoemulsões (Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Nos processos de alta pressão, como microfluidização e homogeneização a alta pressão, o estresse mecânico promove a formação de gotas menores que são envolvidas pelas moléculas de surfactante que reduzem a tensão interfacial (Tadros *et al.*, 2004). Essa diminuição no tamanho das gotas pode indicar uma maior estabilidade da nanoemulsão, influenciando de maneira significativa suas propriedades físico-químicas, reológicas e antimicrobianas (Acevedo-Fani *et al.*, 2015). O menor tamanho de gota permite uma melhora na atividade biológica dos óleos essenciais pelo aumento da área superficial (McClements; Rao, 2011), permitindo o uso de menores quantidades do óleo essencial que quando aplicado puro. Resultados anteriores demonstraram que a encapsulação do PPEO em nanoemulsões reduziu a quantidade de óleo essencial necessária para inibir *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* quando comparado ao PPEO puro (resultados do capítulo II).

Tabela 2 Tamanho médio de gota (Z-médio, D₁₀, D₅₀ e D₉₀) e índice de polidispersidade (PdI) das nanoemulsões (NE).

Amostra	Z-médio	Tamanho de gota (nm)			PdI
		D ₉₀	D ₅₀	D ₁₀	
NE-0.75T20	182,3 ± 3,7 ^b	186,0 ± 15,5 ^b	27,5 ± 1,34 ^b	20,8 ± 0,9 ^b	0,287 ± 0,009 ^b
NE-0.75T80	171,1 ± 11,0 ^b	196,6 ± 15,5 ^b	35,76 ± 3,51 ^b	18,5 ± 0,1 ^b	0,290 ± 0,177 ^b

As diferenças significativas em cada coluna são indicadas por letras diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% (m/m) de óleo de girassol. Os dados são expressos como valores médios ± desvio padrão.

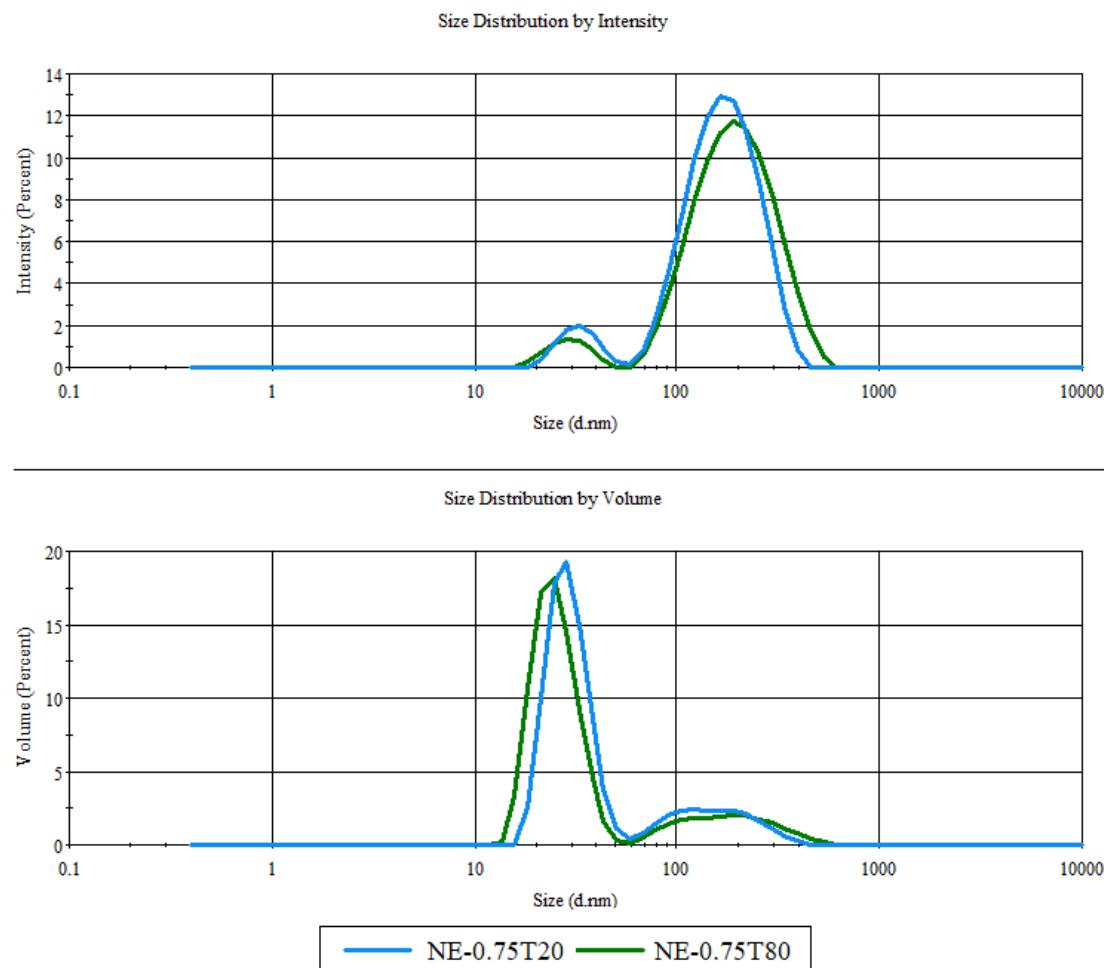


Figura 4 Distribuição de tamanho de gota (nm) das nanoemulsões de alginato de sódio-PPEO expressa em intensidade e volume. NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% (m/m) de óleo de girassol.

Os índices de polidispersidade estão apresentados na Tabela 2. Os valores de PdI das nanoemulsões foram 0,290 e 0,287, para NE-0.75T20 e NE-0.75T80, respectivamente. O PdI é um parâmetro que reflete a uniformidade na distribuição do tamanho de gotas da nanoemulsão, e valores menores que 0,3 podem indicar uma distribuição homogênea, essencial para a estabilidade cinética do sistema (McClements, 2012). Essa estabilidade é essencial para aplicações na conservação de alimentos, pois minimiza fenômenos como floculação, coalescência e separação de fases, garantindo a funcionalidade das nanoemulsões ao longo do tempo, o que é uma característica importante para revestimentos ativos.

3.2 Permeabilidade ao vapor de água

A espessura é um parâmetro crítico que afeta diretamente as propriedades de barreira dos filmes, como sua capacidade de controlar a transferência de gases, vapores e microrganismos (Nisar *et al.*, 2018)). Conforme mostrado na Tabela 3, o filme formado exclusivamente com solução de alginato apresentou uma espessura de 97,4 μm . No entanto, a incorporação das nanoemulsões nas soluções filmogênicas resultou em uma redução significativa na espessura dos filmes. Esses resultados podem estar diretamente relacionados ao tamanho das gotículas obtidas nas nanoemulsões. Acevedo-Fani *et al.* (2015) observaram uma redução na espessura dos filmes após a adição de nanoemulsões com óleo essencial de capim-limão ou sálvia, e a correlação entre o tamanho das gotículas e a espessura apresentou um coeficiente de 0,69. A diminuição da espessura pode ser atribuída à possível redução da fase oleosa durante o processo de formação do filme, o que impacta diretamente na concentração total de sólidos na matriz filmogênica, resultando em uma estrutura mais compacta e fina (Sánchez-González *et al.*, 2011).

Tabela 3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e espessura dos filmes de alginato de sódio e filmes de alginato com nanoemulsões com PPEO

Amostra	Espessura (μm)	PVA ($\text{g} \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \text{h} \text{kPa}$)
Alginato	$97,4 \pm 6,3^{\text{a}}$	$2,544 \pm 0,0155^{\text{a}}$
NE-0.75T20	$66,6 \pm 5,3^{\text{b}}$	$1,230 \pm 0,002^{\text{b}}$
NE-0.75T80	$60,8 \pm 9,3^{\text{b}}$	$0,999 \pm 0,034^{\text{b}}$

Letras diferentes em cada coluna indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Alginato: alginato de sódio 1% (m/m); NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% de óleo de girassol. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão.

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) está diretamente associada às propriedades de barreira dos filmes para sua aplicação em embalagens de alimentos (Nisar *et al.*, 2018). Essas propriedades determinam a capacidade do filme de controlar o transporte de água entre o produto e o ambiente, o que é essencial para prevenir ou reduzir a desidratação dos alimentos. Valores mais baixos de PVA são desejáveis, pois indicam uma maior eficiência na retenção de umidade e na produção do alimento embalado (Acevedo-Fani *et al.*, 2015).

Os resultados da PVA dos filmes estão apresentados na Tabela 3. Após a adição das nanoemulsões à matriz do filme, os valores de PVA reduziram significativamente. As amostras com nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 apresentaram reduções de 51,5 % e 60,7%, respectivamente, em relação aos filmes contendo apenas alginato. Esses valores são consideravelmente mais altos quando comparados aos obtidos por Acevedo-Fani *et al.* (2015), que relataram uma redução de 19,49% na PVA de filmes de alginato após a incorporação de nanoemulsão com óleo essencial de sálvia.

A significativa melhoria nas propriedades de barreira dos filmes pode ser atribuída à natureza hidrofóbica dos óleos essenciais e à presença de surfactantes nas nanoemulsões, como Tween 20 e o Tween 80 (Almasi; Azizi; Amjadi, 2020). Esses componentes hidrofóbicos interagem com a matriz polimérica, aumentando a resistência à passagem de moléculas de água (Boyacı *et al.*, 2019). Além disso, o reduzido tamanho das gotas das nanoemulsões resulta em uma melhor distribuição de óleo na matriz do filme diminuindo, consequentemente, a difusividade, que é a capacidade do vapor de água atravessar o filme, e a tortuosidade, definida como o grau de complexidade dos caminhos que as moléculas de água precisam percorrer para atravessar o filme (Sanchez; Pinzon; Villa, 2022). Uma rede mais tortuosa reduz a taxa de difusão do vapor de água e contribuem para a redução da permeabilidade. Dessa forma, maiores índices de tortuosidade estão associados a maiores teores de fase oleosa e/ou menores tamanhos

de gota (Pérez-Gago; Krochta, 2001). Cai *et al.* (2025) observaram que a adição de nanoemulsão com óleo essencial de laranja aumentou a hidrofobicidade dos filmes, confirmada pelo ângulo de contato com a água, que aumentou de 59,9°, no filme de pectina sem nanoemulsão, para 113,8°, no filme de pectina com incorporação de nanoemulsão. Ângulos superiores a 90° indicam superfícies hidrofóbicas, com maior resistência a passagem de água e menor PVA.

A redução da espessura do filme desempenha um papel relevante na diminuição da PVA e difusividade. A menor espessura dos filmes contendo nanoemulsões (Tabela 3) indica uma matriz mais compacta e densa, na qual a interação entre o óleo essencial de pimenta rosa e o alginato de sódio resulta em menor mobilidade das moléculas de água. Essa composição mais densa e bem estruturada contribui diretamente para a eficiência das propriedades de barreira (Long *et al.*, 2023; Lu *et al.*, 2023). Portanto, os dados confirmam que a incorporação das nanoemulsões à base de óleo essencial de pimenta rosa melhora significativamente as propriedades de barreira dos filmes de alginato de sódio. Esses resultados destacam o potencial desses filmes na aplicação de embalagens de alimentos, onde é fundamental controlar a perda de umidade e preservar a qualidade do produto embalado.

3.3 Análises microbiológicas dos miniqueijos

Os dados das análises de atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa puro 1% (m/m) (PPEO) e nanoemulsão NE-0.75T80 em miniqueijos inoculados com *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, podem ser observados nas figuras 5 e 6.

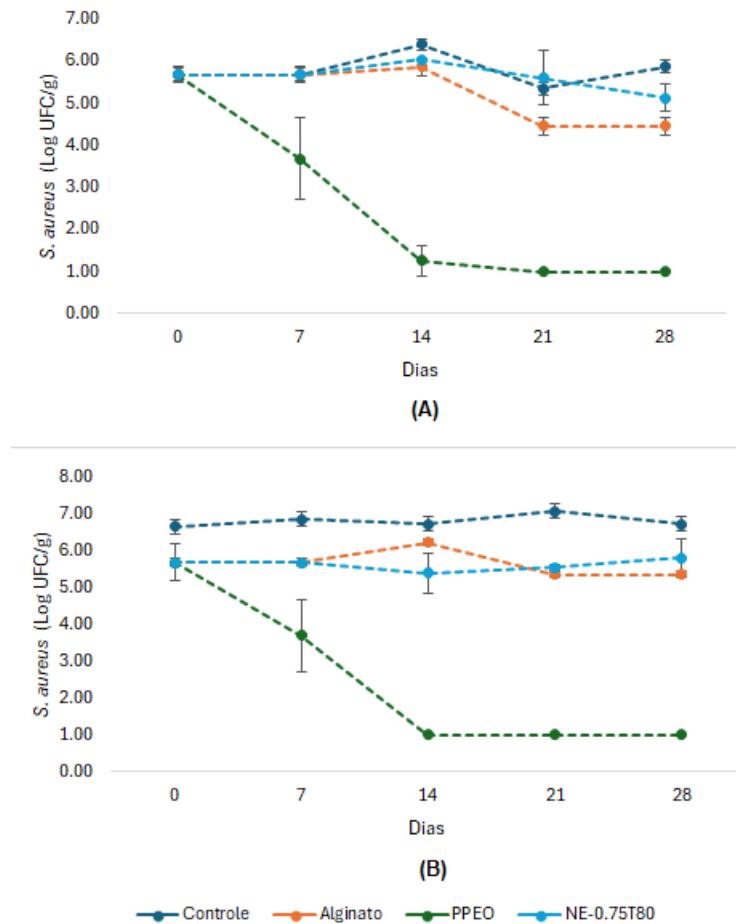


Figura 5 Efeito do óleo essencial de pimenta rosa e revestimentos de alginato de sódio e nanoemulsão contra *Staphylococcus aureus* inoculado em miniqueijos Minas Frescal, nas concentrações iniciais de (A) 10^3 UFC/g (B) 10^5 UFC/g. Controle: sem revestimento; Alginato: alginato de sódio 1% (m/m); PPEO: óleo essencial de pimenta rosa 1% (m/m); NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; 0,75: 0,75% de óleo de girassol. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão.

Independente da concentração inicial de *Staphylococcus aureus* (Figura 5), os miniqueijos controle e com revestimento sem antimicrobiano mantiveram níveis de contagens bacterianas relativamente altos, indicando que a presença do óleo essencial de pimenta rosa foi essencial para inibir a multiplicação microbiana. Já a adição do óleo essencial de pimenta rosa (PPEO) na concentração de 1,0% (m/m) demonstrou alta eficácia antimicrobiana, apresentando redução significativa a partir do 7º dia de armazenamento e chegando a níveis de 1 log UFC/g a partir do 14º dia, se mantendo assim até o final dos 28 dias de armazenamento. Os resultados vão de encontro a estudos que demonstram o potencial de óleos essenciais como agentes microbianos para alimentos, principalmente contra microrganismos patogênicos (Artigas-Artigas, María; Acevedo-Fani; Martín-Belloso, 2017; Dannenberg *et al.*, 2019; Uliana *et al.*, 2016). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa está diretamente relacionada aos seus hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos e seus derivados oxigenados (Bajpai; Sharma; Baek, 2013). O terpineno, componente majoritário do PPEO, é descrito na literatura como um componente importante para atividade antimicrobiana do óleo essencial (Borotová *et al.*, 2022; Diao *et al.*, 2014). No entanto, os miniqueijos revestidos com a nanoemulsão NE-0.75T80 não apresentaram redução significativa das contagens de

Staphylococcus aureus ao longo dos 28 dias. A concentração inicial de 6 log UFC/g permaneceu praticamente constante ao longo do armazenamento, semelhante ao grupo controle. Artiga-Artigas, Acevedo-Fani e Martín-Belloso (2017) observaram que o revestimento à base de nanoemulsão contendo 1,5% (m/m) de óleo essencial de orégano não foi capaz de inibir a multiplicação de *Staphylococcus aureus* inoculados na superfície de queijos com baixo teor de gordura.

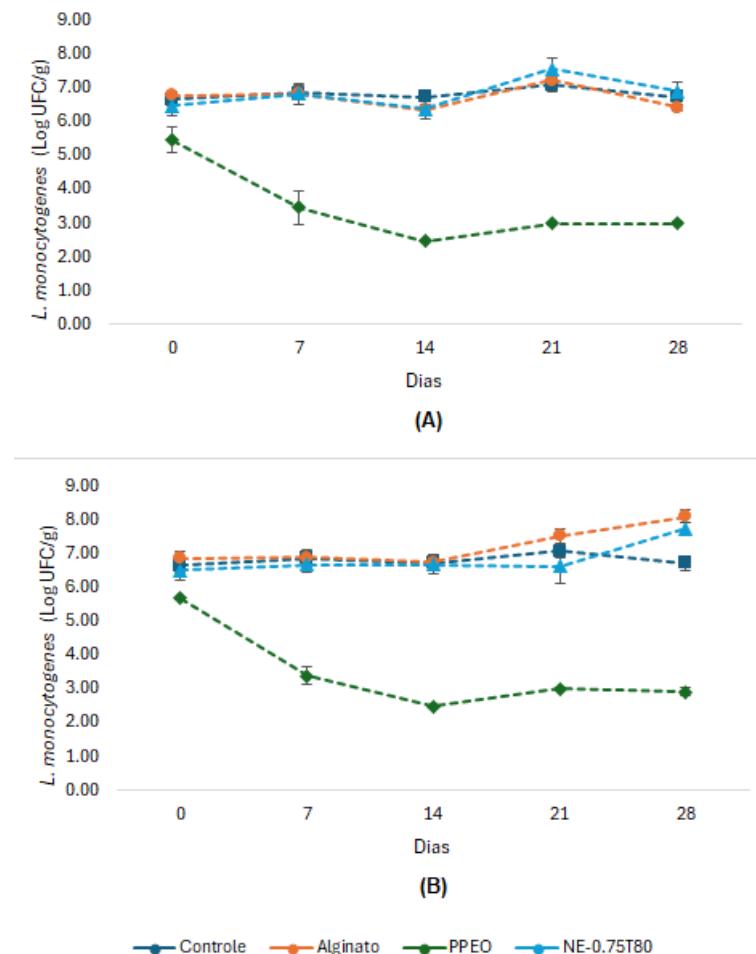


Figura 6 Efeito do óleo essencial de pimenta rosa e revestimentos de alginato de sódio e nanoemulsão contra *Listeria monocytogenes* inoculado em miniqueijos Minas Frescal, nas concentrações iniciais de (A) 10^4 UFC/g (B) 10^6 UFC/g. Controle: sem revestimento; Alginato: alginato de sódio 1% (m/m); PPEO: óleo essencial de pimenta rosa 1% (m/m); NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; 0,75: 0,75% de óleo de girassol. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão.

A efetividade antimicrobiana do PPEO e da nanoemulsão NE-0.75T80 também foi avaliada na inibição de *Listeria monocytogenes* inoculada nos miniqueijos (Figura 6). Os resultados de inibição do óleo e do revestimento à base de nanoemulsão foram semelhantes aos encontrados para o *Staphylococcus aureus*. No tratamento controle e com revestimento sem antimicrobiano, as contagens de *Listeria monocytogenes* se mantiveram estáveis em torno de 6 log UFC/g com pequenas variações, sugerindo que a ausência de um agente antimicrobiano favorece o desenvolvimento do microrganismo. Por outro lado, o PPEO demonstrou uma redução significativa na multiplicação de *Listeria monocytogenes*, atingindo redução de 3 log UFC/g, sendo eficaz na redução da carga microbiana em ambas as concentrações iniciais de inóculo (10^3 e 10^5 UFC/g). Dannenberg *et al.* (2016) avaliaram os efeitos antimicrobianos do óleo essencial de pimenta rosa puro contra *Listeria monocytogenes* inoculada em queijo tipo

Minas Frescal. Os queijos inoculados apresentaram contagem inicial de 5,8 log UFC/g e de 4,3 log UFC/g ao fim de 30 dias, indicando o efeito biopreservador do PPEO *in situ*. A nanoemulsão NE-0.75T80, por sua vez, apresentou comportamento semelhante ao controle, sem redução na contagem de *Listeria monocytogenes* ao longo do armazenamento.

Em estudo anterior (capítulo II), a nanoemulsão apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, entretanto, quando aplicada como revestimento em miniqueijos, os resultados *in situ* não evidenciaram tal comportamento. A baixa eficácia antimicrobiana apresentada pela nanoemulsão pode estar relacionada a quantidade de óleo essencial utilizada na formulação, diluição do composto ativo, ou falha na liberação e penetração do óleo essencial de pimenta rosa.

Além disso, a ausência de atividade antimicrobiana da nanoemulsão também pode ocorrer devido à sinérese observada nos miniqueijos do tipo Minas Frescal. A sinérese é responsável pelo desprendimento de soro, que altera a matriz do queijo, e esse dessoramento pode resultar na diluição do composto ativo, reduzindo sua concentração na superfície do queijo ou provocando deslocamento do revestimento, o que reduz a quantidade de nanoemulsão em contato direto com o queijo (McSweeney, 2007). Como observado por Kuorwel *et al.* (2011), a atividade antimicrobiana de revestimentos dependente diretamente da concentração dos componentes ativos presentes no óleo essencial.

A diferença na efetividade antimicrobiana entre o PPEO e a NE-0.75T80 pode estar associada às propriedades de viscosidade e difusividade desses dois sistemas. O PPEO foi dissolvido em etanol 95%, resultando em uma viscosidade mais baixa em comparação à nanoemulsão. Durante a imersão dos miniqueijos, a combinação da baixa viscosidade com a alta difusividade do etanol provavelmente facilitou a penetração do PPEO na matriz do queijo. Em contraste, a NE-0.75T80 forma uma película superficial, atuando predominantemente na superfície do queijo. Assim, o PPEO consegue inibir a multiplicação dos microrganismos no interior da matriz, enquanto a ação antimicrobiana da NE-0.75T80 pode ter se limitado à superfície, devido à sua difusão restrita pela maior viscosidade.

Por fim, a liberação controlada do óleo essencial de pimenta rosa também pode ter sido comprometida pelo processo de reticulação de formação do revestimento, que ocorre quando íons de cálcio interagem com as cadeias do alginato formando uma rede tridimensional durante a gelificação (Parreidt; Müller; Schmid, 2018). Desta forma, o cálcio presente no queijo e no soro pode aumentar a força da reticulação, aprisionando mais fortemente o óleo essencial e comprometendo a eficiência de liberação do óleo essencial de pimenta rosa, tornando-o incapaz de exercer sua ação inibitória sobre a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* inoculados nos miniqueijos.

3.4 Análises Físico-químicas dos miniqueijos

3.4.1 Umidade

A Figura 7 apresenta os dados de umidade dos miniqueijos tipo Minas Frescal ao longo do armazenamento de 28 dias sob refrigeração a 4 ± 2 °C.

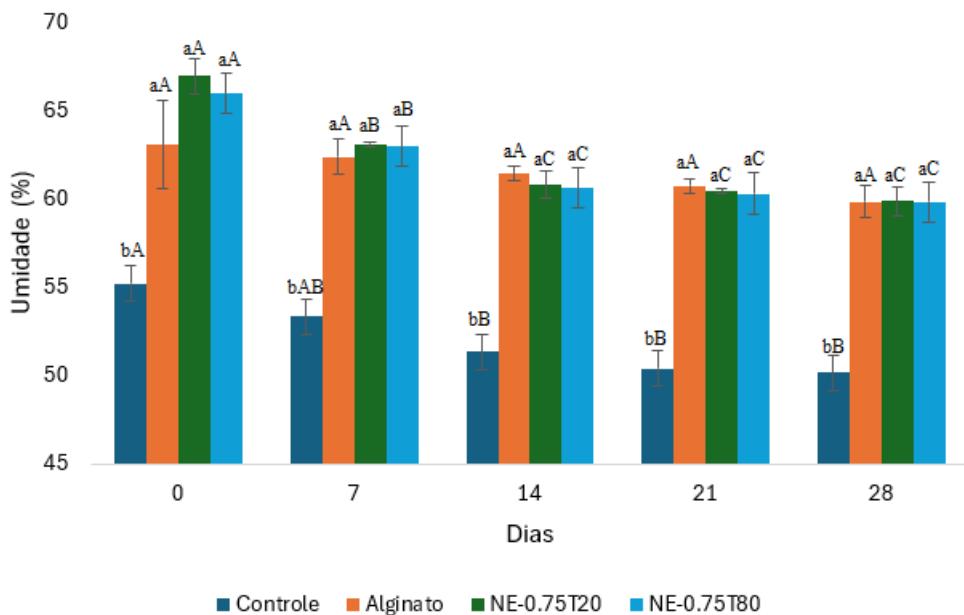


Figura 7 Evolução da umidade (%) em miniqueijos Minas Frescal com e sem revestimento ao longo de 28 dias de armazenamento (4 ± 2 °C). Controle: sem revestimento; Alginato: alginato de sódio 1% (m/m); PPEO: óleo essencial de pimenta rosa 1% (m/m); NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% de óleo de girassol. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão.

a,b,c, A, B, C Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos, letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento ao longo do armazenamento.

Os tratamentos influenciaram significativamente o conteúdo de umidade dos miniqueijos Minas Frescal durante os 28 dias de armazenamento. No primeiro dia, os percentuais de umidade variaram de 55,21% a 66,98%. Níveis de umidade acima de 55% estão dentro do preconizado pela legislação brasileira, indicando um produto com umidade muito elevada (Brasil, 2004). Magenis *et al.* (2014) avaliaram a umidade de 21 amostras de queijos Minas Frescal que variaram de 50,1% a 64,5%, entretanto a maioria das amostras apresentou percentuais de umidade superiores a 55%.

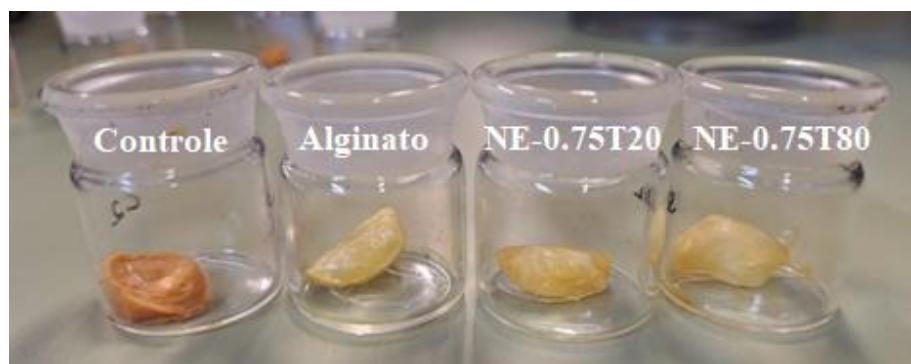


Figura 8 Miniqueijos após processo de secagem em estufa a 105 °C por 24 horas

Fonte: Própria

Ao longo do armazenamento, os teores de umidade diminuíram. Após 28 dias de armazenamento, os valores de umidade dos miniqueijos sem revestimentos variaram de 55,22% para 50,17%. Os miniqueijos revestidos com ambos os revestimentos apresentaram índices iniciais de umidade significativamente maiores quando comparados aos miniqueijos sem

revestimento. Esse aumento inicial de umidade pode ser atribuído ao fato de o revestimento ser rico em água, conferindo uma hidratação adicional à superfície dos queijos logo após a aplicação. Essa adição de umidade contribui para que os queijos revestidos mantenham percentuais de umidade superiores aos não revestidos, até o fim do armazenamento. Os miniqueijos revestidos com alginato de sódio apresentaram umidade inicial de 63,08%, reduzindo para 59,88% ao final do armazenamento. Já os miniqueijos revestidos com as nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 apresentaram redução de umidade de 66,90% e 66,00%, atingindo 59,90% e 59,80% de umidade ao final de 28 dias de armazenamento, respectivamente. A redução da umidade nos queijos é resultado da migração da água para a superfície da matriz, devido ao gradiente de umidade, com subsequente evaporação durante o período de armazenamento sob refrigeração (Buffa *et al.*, 2001). Entretanto, o maior teor de umidade observado nas amostras revestidas podem ser atribuídas às propriedades de barreira do alginato de sódio, que minimiza a perda de água por evaporação, contribuindo para a manutenção da qualidade ao longo do armazenamento (Medeiros *et al.*, 2014). Além disso, a incorporação do óleo essencial de pimenta rosa ao revestimento poderia ter contribuído para uma formação de barreira ainda mais eficaz, reduzindo a permeabilidade ao vapor de água e auxiliando na manutenção de qualidade do queijo (Pieretti *et al.*, 2019). No entanto, a barreira do polissacarídeo foi mais relevante, tendo em vista que não houve diferença significativa no teor de umidade ao longo do armazenamento para os diferentes queijos revestidos.

3.4.2 Sinérese

Os dados referentes à sinérese dos miniqueijos com e sem revestimento estão apresentados na Figura 9.

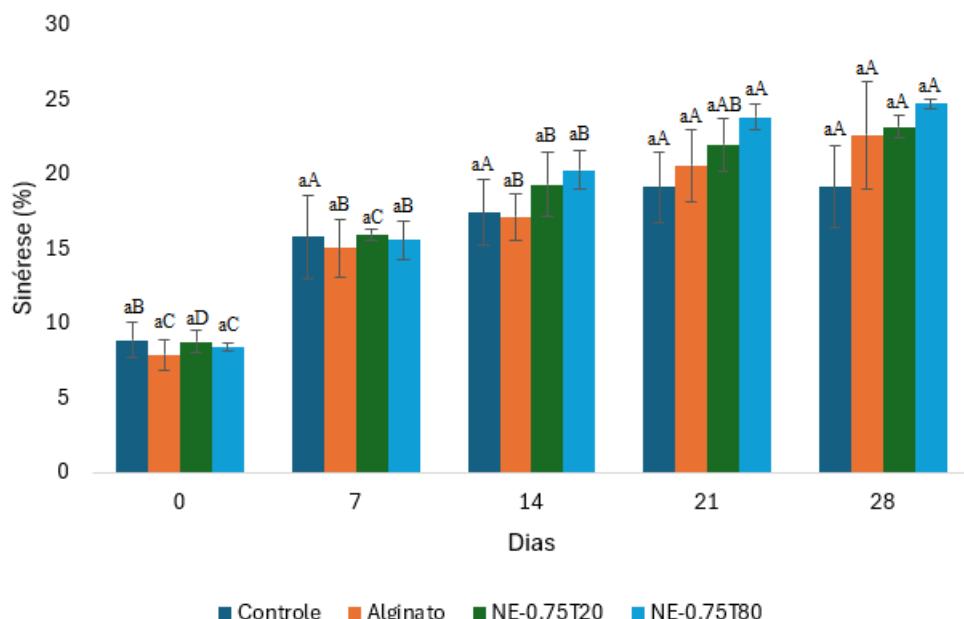


Figura 9 Sinérese (%) em miniqueijos Minas Frescal com e sem revestimento ao longo de 28 dias de armazenamento ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Controle: sem revestimento; Alginato: alginato de sódio 1% (m/m); NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% de óleo de girassol. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão.

a,b,c, A, B, C Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos, letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento ao longo do armazenamento.

A análise dos resultados de sinérese, também conhecida como desprendimento de soro da massa, ao longo do armazenamento de 28 dias, indicou que os revestimentos não

influenciaram significativamente a taxa de separação do soro quando comparados ao controle, em todos os tempos de armazenamento. A sinérese nos miniqueijos sem revestimento variou de 8,87% na primeira semana para 19,16% ao fim do armazenamento. Esse aumento de sinérese é um comportamento esperado, uma vez que a ausência de barreira física facilita a perda de umidade por evaporação, o que, por sua vez, promove maior exsudação de soro. Além disso, a elevação da acidez e a consequente diminuição de pH podem facilitar o processo de sinérese. A acidificação promove a exsudação do soro devido à redução da carga negativa da caseína, aproximando o sistema do ponto isoelétrico, que favorece a interação proteína-proteína (McSweeney, 2007; Walstra *et al.*, 2005) em detrimento da interação proteína-água.

Embora os revestimentos pudessem reduzir os níveis de sinérese devido às suas propriedades de formação de barreira, os resultados demonstraram um aumento na liberação de soro nos miniqueijos revestidos, contrariando essa expectativa. Nos miniqueijos revestidos com alginato de sódio, foi observada uma eficácia moderada na redução da sinérese em comparação ao controle, com um valor de 22,64% ao final do armazenamento. Embora o alginato de sódio seja amplamente conhecido por suas propriedades filmogênicas, que ajudam a reter a umidade dentro dos queijos e a retardar a exsudação do soro, esse efeito foi menos pronunciado nos miniqueijos avaliados. Por outro lado, os miniqueijos revestidos pelas nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 apresentaram valores de sinérese variando entre 23 e 24%. Esses resultados sugerem que a interação de óleo essencial de pimenta rosa com a matriz proteica do queijo pode ter causado alterações estruturais que favoreceram a liberação de soro (Moro *et al.*, 2015).

3.4.3 pH

Os valores de pH dos miniqueijos Minas Frescal ao longo do armazenamento se encontram na Figura 10.

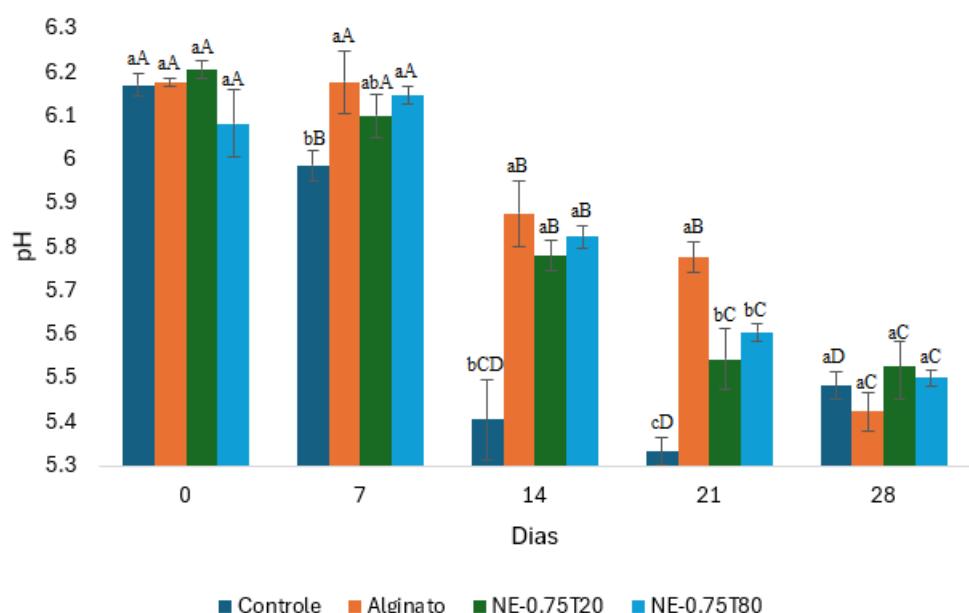


Figura 10 Perfil de pH dos miniqueijos Minas Frescal com e sem revestimentos armazenados sob refrigeração de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 28 dias. Controle: sem revestimento; Alginato: alginato de sódio 1% (m/m); NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% de óleo de girassol. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão.

a,b,c, A, B, C Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos, letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento ao longo do armazenamento.

Ao longo de 28 dias de armazenamento, foram observadas variações significativas nos valores de pH dos miniqueijos revestidos em comparação aos miniqueijos controle. Inicialmente, os valores de pH dos miniqueijos se mantiveram próximos, variando de 6,08 a 6,20, indicando que os revestimentos não alteram de forma significativa o pH inicial dos miniqueijos. Isso pode ser explicado pelo fato de o revestimento ser aplicado superficialmente, sem interferir diretamente na composição interna dos miniqueijos. Silva *et al.* (2022) observaram que o revestimento à base de alginato de sódio não alterou o pH de queijos frescos. Resultados semelhantes foram relatados por Pieretti *et al.* (2019), que também não observaram alterações significativas no pH inicial de queijos Minas Frescal revestidos com alginato de sódio ou alginato de sódio combinados aos óleos essenciais de orégano e alecrim, apresentando valores em torno de 6,0 tanto para as amostras controle quanto para as revestidas.

No decorrer do armazenamento, a amostra controle apresentou uma queda mais acentuada nos valores de pH, atingindo 5,33 ao final dos 28 dias, o que sugere um processo acelerado de acidificação. Em contrapartida, os miniqueijos revestidos apresentaram menor taxa de queda no pH, especialmente nas primeiras duas semanas de armazenamento. As amostras revestidas NE-0.75T20 e NE-0.75T80 mantiveram os maiores valores de pH ao longo dos primeiros 14 dias de armazenamento. A tendência de queda no pH foi mantida até o 21º dia em todas as amostras, com a amostra controle exibindo o menor valor de pH. Em contrapartida, as amostras revestidas apresentaram valores mais elevados, destacando a eficácia dos revestimentos na preservação das características dos miniqueijos durante o armazenamento. Ao final do período de armazenamento, embora o pH dos miniqueijos controle tenha sido inferior ao das amostras revestidas com alginato e nanoemulsão, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

Esses resultados sugerem que os revestimentos - alginato, NE-0.75T20 e NE-0.75T80 - atuam não apenas como barreiras físicas, mas também limitam a absorção de oxigênio, o que reduz o crescimento dos microrganismos responsáveis pela fermentação da lactose, retardando assim o processo de acidificação. A redução de pH é uma característica conhecida em produtos lácteos e está diretamente relacionada à produção de ácido lático (Sangaletti *et al.*, 2009). Fernandes *et al.* (2017) observaram comportamento semelhante, com queda de pH variando de 6,30 a 4,90 em amostras de queijo controle e revestidas com óleo essencial de alecrim microencapsulado, ao longo de 15 dias de armazenamento. Pérez-Soto *et al.* (Pérez-Soto *et al.*, 2021) observaram redução de pH nas amostras de queijo fresco revestidas com microemulsões e nanoemulsões contendo óleo essencial de laranja. A redução mais acentuada foi verificada na amostra controle, o que sugere que os revestimentos desempenharam um papel importante no retardado da acidificação.

Os resultados reforçam a eficácia dos revestimentos na preservação de produtos lácteos, ao retardar a acidificação dos miniqueijos e prolongar sua vida útil. Também sugere-se que os revestimentos com as nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 podem ser promissores em armazenamentos a longo prazo, mantendo as características desejáveis aos queijos Minas Frescal.

3.4.4 Acidez total

A Figura 11 apresenta os perfis de acidez dos miniqueijos durante o armazenamento refrigerado a 4 ± 2 °C por 28 dias.

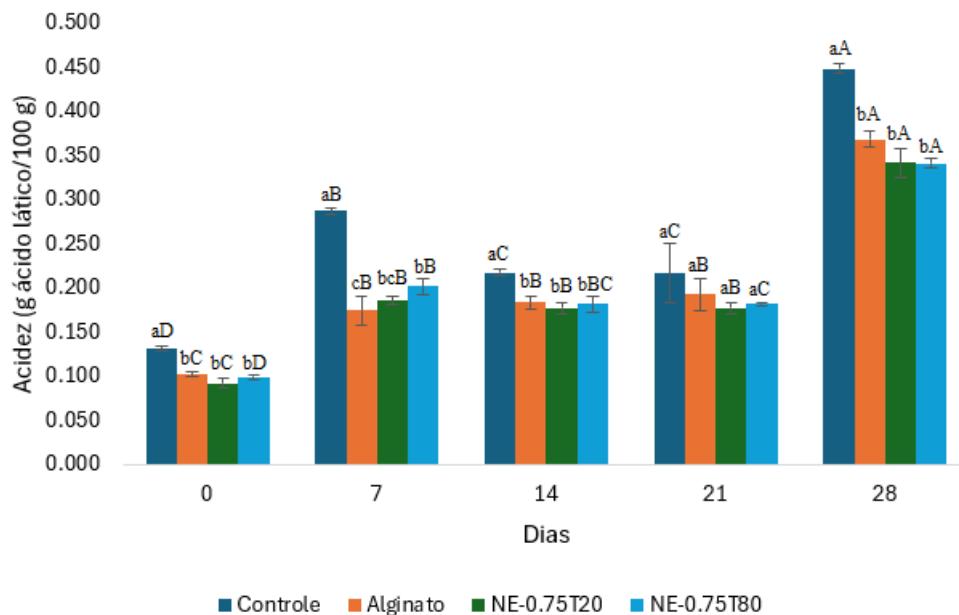


Figura 11 Acidez titulável dos miniqueijos Minas Frescal sem revestimento e revestidos com alginato de sódio e nanoemulsão com PPEO ao longo de 28 dias de armazenamento ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Controle: sem revestimento; Alginato: alginato de sódio 1% (m/m); NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% de óleo de girassol. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão.

a,b,c, A, B, C Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos, letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento ao longo do armazenamento.

Os miniqueijos controle (sem revestimento) apresentaram o maior aumento nos valores de acidez ao longo do armazenamento, variando de 0,131 g ácido lático/100g no início para 0,448 g ácido lático/100g no 28º dia. Esse aumento significativo sugere um maior crescimento microbiano ao longo do armazenamento, promovendo a acidificação do queijo, que é um comportamento esperado para amostras sem qualquer barreira protetora. Estudos anteriores corroboram com esses resultados, indicando que a ausência do revestimento facilita o desenvolvimento microbiano, que leva ao aumento de acidez (Buriti; da Rocha; Saad, 2005; Fernandes *et al.*, 2017; Sangaletti *et al.*, 2009).

Por outro lado, os miniqueijos revestidos com alginato de sódio apresentaram um aumento controlado na acidez, variando de 0,101 a 0,369 g ácido lático/100g ao longo de 28 dias de armazenamento. Essa menor taxa de acidificação pode ser atribuída às propriedades filmogênicas e de barreira do alginato de sódio, que limitam a troca de gases e, consequentemente, a atividade antimicrobiana. Como mencionado anteriormente, o alginato de sódio é um biopolímero que forma uma barreira que restringe a entrada de oxigênio, reduzindo a fermentação microbiana e, portanto, retardando o aumento da acidez (Parreidt; Müller; Schmid, 2018; Silva *et al.*, 2022).

As nanoemulsões NE-0,75T20 e NE-0,75T80 demonstraram uma estabilização nos níveis de acidez semelhante a observada no revestimento alginato. Os valores de acidez variaram, ao longo do armazenamento, de 0,092 a 0,341 g ácido lático/100g para NE-0,75T20 e 0,099 a 0,342 g ácido lático/100g para NE-0,75T80, sendo os níveis finais de acidez menores em comparação ao revestimento de alginato puro (0,369 g ácido lático/100g). A combinação do alginato de sódio e óleo essencial de pimenta rosa na nanoemulsão pode fornecer as propriedades de barreira física e bioquímica. Ao final dos 28 dias de armazenamento, as amostras revestidas, tanto com alginato quanto com nanoemulsões, apresentaram níveis de acidez inferiores aos das amostras sem revestimento. Esses resultados são consistentes com os

achados de El-Sayed e El-Sayed (2021) que demonstraram que a adição de nanoemulsões contendo óleo essencial de cominho foi eficaz em retardar a acidificação do queijo branco fresco durante o armazenamento, quando comparado às amostras sem revestimento. Assim, os revestimentos, especialmente as nanoemulsões com óleo essencial, se mostram como uma alternativa promissora para prolongar a vida útil e preservar a qualidade do queijo Minas Frescal.

3.4.5 Cor e Índice de brancura (WI)

Os resultados do índice de brancura dos miniqueijos, tanto para a amostra controle (não revestida), quanto para as amostras com os revestimentos alginato, NE-T20 e NE-T80, revelaram não haver diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 12). Ao longo do armazenamento, observou-se redução progressiva dos valores de índice de brancura apenas para a amostra sem revestimento (controle). A diminuição da brancura da amostra sem revestimento pode estar associada ao envelhecimento natural e à perda de umidade, que são fatores conhecidos por alterar a percepção visual da cor dos queijos. Os resultados indicam que os revestimentos tiveram um impacto significativo na manutenção da brancura dos miniqueijos Minas Frescal ao longo do período de armazenamento. As amostras revestidas com as nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 apresentaram a menor variação de cor entre o início e o final do armazenamento, evidenciando que esses revestimentos foram mais eficazes na preservação da brancura. Essa eficácia pode estar relacionada às propriedades antioxidantes do óleo essencial de pimenta-rosa, que possivelmente evitaram alterações visuais significativas nos queijos. Esse comportamento se alinha com estudos que destacam o papel das nanoemulsões de óleos essenciais em preservar as características dos alimentos durante o armazenamento (Artiga-Artigas, María; Acevedo-Fani; Martín-Belloso, 2017; Kazemeini; Azizian; Adib, 2021; Keykhsravy *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2020). No estudo de Yemiş, Sezer e Sıçramaz (2022), os queijos Kasar sem revestimento não apresentaram mudanças significativas nos índices de brancura ao longo do armazenamento, enquanto os revestidos com nanoemulsão contendo 10% (m/m) óleo essencial de mirtilo apresentaram aumento gradual desses valores. Comportamento semelhante foi observado por Artiga-Artigas; Acevedo-Fani; Martín-Belloso (2017), que relataram um aumento nos índices de brancura durante o armazenamento em queijos com baixo teor de gordura revestidos com nanoemulsões de alginato contendo 1,5% (m/m) de óleo essencial de orégano.

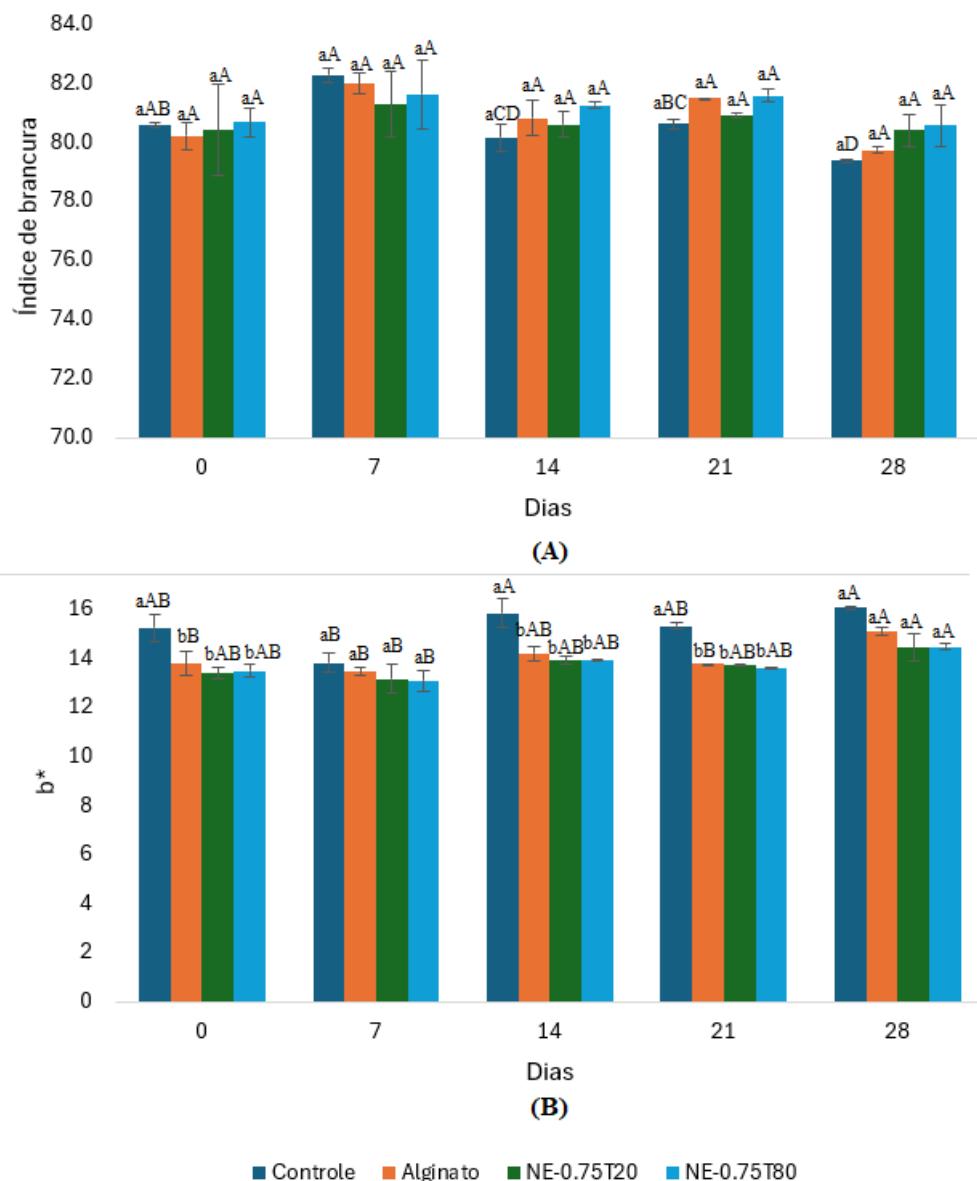


Figura 12 (A) Alterações de cor em termos dos valores de índice de brancura e (B) mudanças no parâmetro b^* dos miniqueijos Minas Frescal controle e revestidos durante o armazenamento a 4 ± 2 °C. Controle: sem revestimento; Alginato: alginato de sódio 1% (m/m); NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% de óleo de girassol. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão.

a,b,c, A, B, C Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos, letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento ao longo do armazenamento.

Ao longo do armazenamento pode ocorrer amarelamento do queijo Minas Frescal, causado pela oxidação dos lipídeos, especialmente quando o queijo é exposto a luz e oxigênio. Além disso, alterações na composição proteica e lipídica durante o armazenamento também pode favorecer essa alteração, assim como variações de pH, teor de umidade e condições de embalagem. O parâmetro b^* está relacionado ao eixo azul-amarelo, onde valores mais altos indicam um tom amarelado. A Figura 12 aponta os valores de parâmetro b^* dos miniqueijos revestidos e sem revestimento. A amostra controle apresentou aumento significativo nos

valores de b^* , especialmente após o 14º dia de armazenamento. No entanto, as amostras revestidas com alginato de sódio e as nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 apresentaram menor variação dos valores de b^* em comparação ao controle. Essa estabilidade pode ser atribuída à capacidade dos revestimentos de atuar como uma barreira contra a oxidação (Miller; Kroccta, 1997; Pieretti *et al.*, 2019). A menor variação observada nas amostras revestidas com as nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 sugere que as propriedades antioxidantes do óleo essencial de pimenta rosa evitaram a oxidação dos lipídeos do queijo. Artiga-Artigas, Acevedo-Fani e Martín-Belloso (2017) reportaram que queijos com baixo teor de gordura revestidos com nanoemulsão contendo 2,0% (m/m) óleo essencial de orégano e fibra de tangerina não apresentaram alterações em sua coloração ao longo do armazenamento.



Figura 13 Coloração dos miniqueijos no início (T0) e fim (T28) do armazenamento de 28 dias a 4 °C.

Fonte: Própria

Esses resultados vão de encontro com estudos que sugerem que as nanoemulsões à base de óleos essenciais agem como protetores em alimentos, preservando as características sensoriais, como a cor, ao longo do tempo de armazenamento (Stintzing; Carle, 2004).

3.5 Perfil de textura

A Figura 14 apresenta o perfil de textura dos miniqueijos com e sem revestimentos.

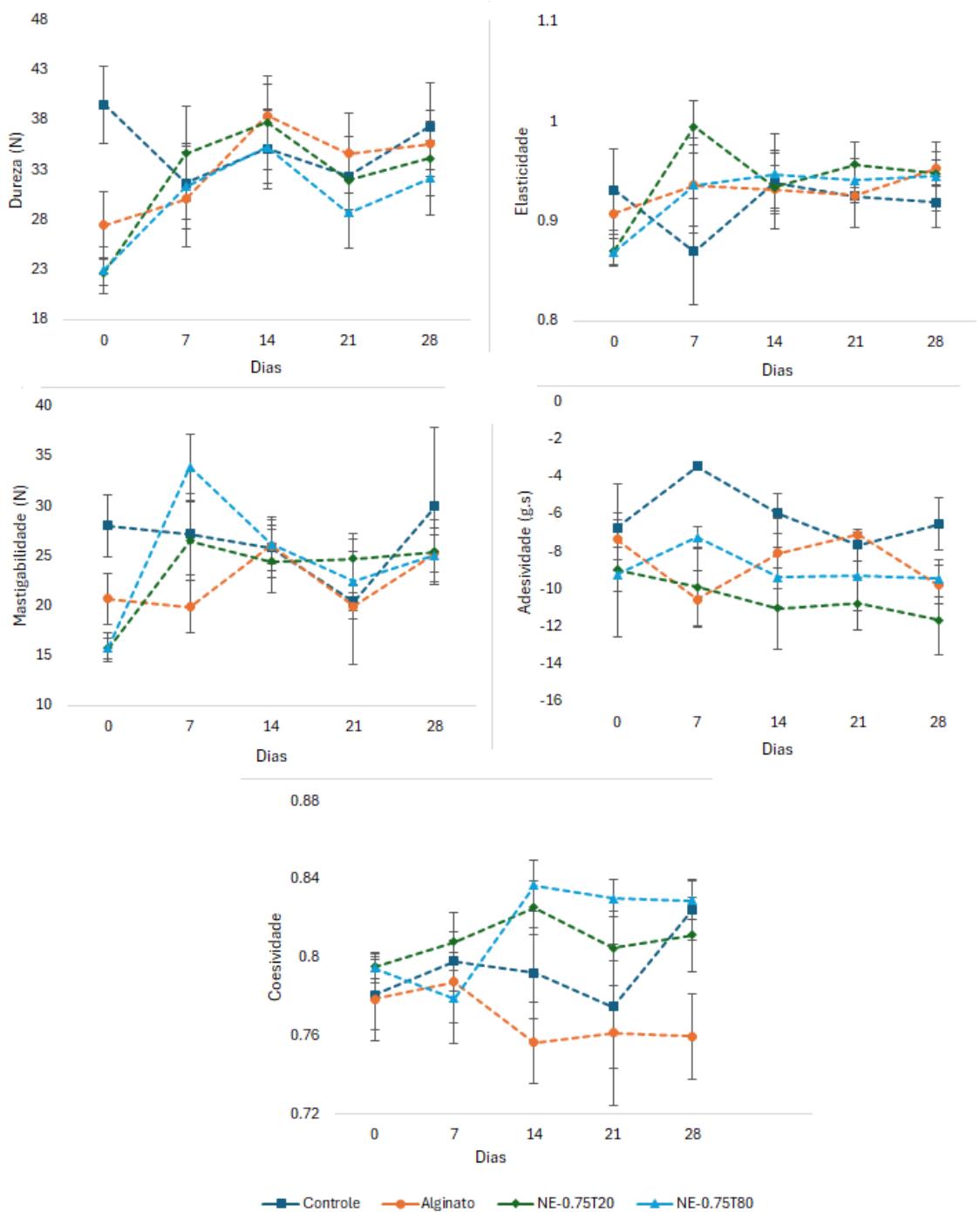


Figura 14 Perfil de textura dos miniqueijos Minas Frescal controle e revestidos ao longo do armazenamento a 4 ± 2 °C. Controle: sem revestimento; Alginato: alginato de sódio 1% (m/m); NE: nanoemulsão; T80: Tween 80; T20: Tween 20; 0,75: 0,75% de óleo de girassol. Os dados apresentados são as médias ± desvio padrão.

A dureza está relacionada com a força necessária para deformar um alimento até uma determinada deformação avaliando, portanto, a resistência inicial que um alimento oferece quando submetido a forças de compressão. A amostra controle apresentou a maior dureza inicial, enquanto as amostras revestidas com as nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 exibiram os menores valores. No entanto, ao longo dos 28 dias de armazenamento, não foi observada diferença significativa na dureza entre as amostras. Esses resultados indicam que os revestimentos NE-0.75T20 e NE-0.75T80 não tiveram impacto negativo na dureza dos

miniqueijos, preservando essa característica de maneira semelhante à das amostras sem revestimento. Contudo, todas as amostras demonstraram um aumento progressivo na dureza ao longo do período de armazenamento. O aumento da dureza do queijo ao longo do armazenamento está diretamente ligado à perda de umidade e à proteólise, que envolve a quebra das proteínas do leite, tornando-o mais firme e menos macio, dependendo do grau de degradação das proteínas (Bourne, 2002). Pérez-Soto *et al.* (2021) observaram redução na dureza dos queijos quando a nanoemulsão com óleo essencial de laranja foi adicionada durante o preparo do queijo fresco. De acordo com Colín-Cruz *et al.* (2012), durante o preparo da coalhada há formação de cavidades entre as fibras de proteínas (canais gordura-soro) onde a gordura e a fase aquosa ficam retidas, e as nanoemulsões se depositam nessas cavidades impedindo a interação homogênea dos componentes, tornando os queijos menos duros.

A mastigabilidade avalia a resistência de um alimento à mastigação, refletindo a força e o tempo necessários para mastigar um alimento até que ele possa ser deglutiido. Os resultados mostram uma flutuação nos valores ao longo dos 28 dias de armazenamento. No tempo 0, a amostra controle apresentou maiores valores de mastigabilidade, enquanto as amostras revestidas NE-0.75T20 e NE-0.75T80 exibiram menores valores, indicando a necessidade de um menor esforço para ser quebrado e mastigado. A partir do 14º dia de armazenamento, não há diferença significativa nesse parâmetro entre as amostras. Os resultados sugerem que a adição do revestimento não influenciou na mastigabilidade dos miniqueijos ao longo do armazenamento. Pérez-Soto *et al.* (Pérez-Soto *et al.*, 2021) não observaram diferenças no parâmetro de mastigabilidade de queijos frescos com adição de microcápsulas ou nanoemulsão contendo óleo essencial de laranja. Há uma correlação direta entre dureza e mastigabilidade das amostras, indicando que o aumento na dureza resulta em maiores exigências de força e trabalho para a mastigação. A perda de umidade dos miniqueijos também é um fator que contribui diretamente no aumento da força necessária para a mastigação, uma vez que a perda de água torna a matriz do queijo mais densa e compacta. De acordo com Sandoval-Copado *et al.* (2016), a mastigabilidade está diretamente ligada ao conteúdo de umidade, ou seja, amostras com maior umidade apresentam menor resistência à mastigação. Ou seja, a perda da umidade implica no aumento da força necessária para a mastigabilidade.

A elasticidade refere-se à capacidade de um alimento de retornar à sua forma original após sofrer deformação. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre as amostras revestidas e a amostra controle ao longo do armazenamento, sugerindo que os revestimentos não impactaram a elasticidade dos miniqueijos. Artiga-Artigas, Acevedo-Fani e Martín-Belloso (2017) não observaram diferença significativa na elasticidade de queijos com baixo teor de gordura revestidos com nanoemulsão contendo 2,0% (m/m) de óleo essencial de orégano e fibra de tangerina ao longo do armazenamento. A estabilização da elasticidade a partir do 14º dia de armazenamento está diretamente relacionada ao aumento na dureza dos miniqueijos, pois queijos mais duros tendem a perder a capacidade de retornar à forma original. Além disso, a redução da elasticidade coincide com aumentos na mastigabilidade. Quando a elasticidade diminui, a dureza tende a aumentar e a mastigação se torna mais trabalhosa (van der Bilt; Abbink, 2017).

A coesividade de um alimento é a capacidade do produto de manter sua integridade após a compressão, sendo um indicativo da estrutura interna dos miniqueijos. Os resultados demonstram que a coesividade aumentou ao longo do armazenamento, exceto nos miniqueijos revestidos com alginato de sódio. Os miniqueijos revestidos com as nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 apresentaram coesividade superior ao controle, sugerindo estrutura interna mais coesa ao longo do tempo, possivelmente devido à barreira física que retarda a migração de

umidade e gordura e a interação dos componentes do óleo essencial com a matriz do queijo. Revestimentos com alto teor de água contribuem para o aumento da coesividade do queijo ao preservar ou adicionar umidade à matriz proteica. Isso impede o ressecamento e garante uma estrutura mais uniforme e resistente ao rompimento durante a mastigação (Wang *et al.*, 2019). Em contraste, a redução da coesividade nas amostras controle e revestida com alginato de sódio podem estar relacionadas processos como proteólise, lipólise e mudanças no pH, que comprometem a integridade dos queijos (Olivo *et al.*, 2020). Pérez-Soto *et al.* (2021) não observaram diferença nos valores de coesividade de queijos frescos com adição de microcápsulas ou nanoemulsão contendo óleo essencial de laranja. A coesividade é resultado da retenção de água na matriz do alimento, neste caso proporcionada pelo revestimento à base de nanoemulsão, que torna a degradação do queijo menos provável (Szczesniak, 2002). Queijos mais coesos tendem a ser mais elásticos, mantendo uma estrutura que resiste ao rompimento. A redução desse parâmetro pode estar diretamente relacionada à desidratação ou a alterações na matriz proteica dos queijos (Kapoor; Metzger, 2008).

A adesividade é caracterizada pela força necessária para remover um alimento de uma superfície, como dentes ou palato, ou quão pegajoso é esse alimento (Szczesniak, 2002). As amostras revestidas apresentaram diferenças significativas de adesividade ao longo do armazenamento em relação à amostra controle, que apresentou valores superiores desse atributo. Entretanto, apesar de não apresentarem diferenças significativas entre o alginato e nanoemulsões ao longo do armazenamento, as amostras revestidas com as nanoemulsões NE-0.75T20 e NE-0.75T80 apresentaram menores valores de adesividade, sugerindo que as nanoemulsões contribuíram para redução da adesividade devido a interação do óleo essencial com a matriz do miniqueijo, conferindo uma textura menos pegajosa, que pode ser interessante para aceitação dos consumidores que preferem uma textura mais seca (Artiga-Artigas, Acevedo-Fani; Martín-Belloso, 2017). A redução da adesividade pode estar relacionada ao processo de sinérese dos miniqueijos, uma vez que a diminuição da água disponível faz com que o produto fique mais firme e altere sua capacidade de aderir a outras superfícies (Fox *et al.*, 2017).

4 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o revestimento ativo à base de alginato de sódio e nanoemulsão de PPEO foi eficaz na preservação das características físico-químicas do queijo Minas Frescal, como manutenção da umidade, além da preservação da coloração e textura ao longo do armazenamento de 28 dias. No entanto, limitações no controle do crescimento dos microrganismos patogênicos *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* *in situ* foram observados. Apesar da eficácia antimicrobiana apresentada pelo PPEO não encapsulado, a encapsulação do PPEO em uma nanoemulsão se mostrou ineficaz em condições de aplicação e armazenamento, possivelmente devido ao alto grau de sinérese, diluição do revestimento e à interação dos compostos ativos do PPEO da nanoemulsão com os componentes do queijo Minas Frescal. Esses resultados indicam que apesar dos resultados promissores em relação à manutenção das propriedades físico-químicas dos queijos, considerando os possíveis impactos na qualidade sensorial, ainda há necessidade de estudos adicionais que otimizem a formulação da nanoemulsão, para potencializar a eficiência antimicrobiana dos revestimentos à base de nanoemulsão de PPEO *in situ*, promovendo a segurança alimentar e a qualidade dos queijos Minas Frescal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. SHAABAN, Hamdy. Essential Oil as Antimicrobial Agents: Efficacy, Stability, and Safety Issues for Food Application. In: ESSENTIAL OILS - BIOACTIVE COMPOUNDS, NEW PERSPECTIVES AND APPLICATIONS. [S. l.]: IntechOpen, 2020. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/essential-oils-bioactive-compounds-new-perspectives-and-applications/essential-oil-as-antimicrobial-agents-efficacy-stability-and-safety-issues-for-food-application>.
- ACEVEDO-FANI, Alejandra *et al.* Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 47, p. 168–177, 2015.
- ALMASI, Hadi; AZIZI, Saeedeh; AMJADI, Sajed. Development and characterization of pectin films activated by nanoemulsion and Pickering emulsion stabilized marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 99, p. 105338, 2020.
- ANDRADE, Kátia S; PONCELET, Denis; FERREIRA, Sandra R S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 204, p. 38–45, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877417300651>.
- AQEEL, Umra *et al.* Regulation of essential oil in aromatic plants under changing environment. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, [s. l.], v. 32, p. 100441, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214786122000730>.
- ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 70, p. 191–200, 2017.
- ARTIGA-ARTIGAS, María; ACEVEDO-FANI, Alejandra; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. **Food Control**, [s. l.], v. 76, p. 1–12, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517300014>.
- ASADINEZHAD, Shabnam *et al.* Effect of different parameters on orange oil nanoemulsion particle size: combination of low energy and high energy methods. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 2501–2509, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00170-z>. Acesso em: 24 mar. 2021.
- BAJPAI, Vivek K.; SHARMA, Ajay; BAEK, Kwang-Hyun. Antibacterial mode of action of Cudrania tricuspidata fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. **Food Control**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 582–590, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513000558>.
- BEDOYA-SERNA, Carolina M *et al.* Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: in vitro study and application in Minas Padrão cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 929–935, 2018. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838218301242>.

BOROTOVÁ, Petra *et al.* Chemical and Biological Characterization of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. **Plants**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 558, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/4/558>.

BOURNE, Malcolm C. Principles of Objective Texture Measurement. **Food Texture and Viscosity**, [s. l.], p. 107–188, 2002.

BOYACI, Derya *et al.* Development of flexible antimicrobial zein coatings with essential oils for the inhibition of critical pathogens on the surface of whole fruits: Test of coatings on inoculated melons. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 20, p. 100316, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214289418304009>.

BRASIL. Ministério do Saúde. Instrução Normativa N° 161, de 01 de julho de 2022. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 jul. 2022, Seção I, Edição 126, p. 235 - 246.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 30, de 26 de junho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, disponível no sítio eletrônico do MAPA, para realização de ensaios em amostras de produtos de origem animal, oriundas dos programas e controles oficiais do MAPA, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 jul. 2018, Seção I, Edição 134, p. 9.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 04, de 01 de março de 2004. Inclui o termo “Muito” na expressão “Alto Umidade” nos itens 2.2 (Classificação), 4.2.3 (Requisitos Físico-Químicos) e 5.1 (Aditivos), no regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas frescal, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=05/03/2004&jornal=1&página=5&totalArquivos=120>>.

BUFFA, Martín N *et al.* Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 11, n. 11–12, p. 927–934, 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601001418>.

BURITI, Flávia C.A.; DA ROCHA, Juliana S.; SAAD, Susana M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1279–1288, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694605000208>.

CAI, Rongrong *et al.* Fabrication of guar gum/chitosan edible films reinforced with orange essential oil nanoemulsion for cheese preservation. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 285, p. 138285, 2025. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813024090962>.

CAMPAGNOLLO, Fernanda B. *et al.* Growth potential of three strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in Frescal and semi-hard artisanal Minas microcheeses: Impact of the addition of lactic acid bacteria with antimicrobial activity.

LWT, [s. l.], v. 158, p. 113169, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643822001049>.

CHAKKA, Ashok Kumar; SRIRAKSHA, M.S.; RAVISHANKAR, C.N. Sustainability of emerging green non-thermal technologies in the food industry with food safety perspective: A review. LWT, [s. l.], v. 151, p. 112140, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643821012937>.

DANNENBERG, Guilherme *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s. l.], v. 36, p. 120–127, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146685641630114X>.

DANNENBERG, Guilherme da Silva *et al.* Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, [s. l.], v. 95, p. 115–120, 2019. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713518303712>.

DANNENBERG, Guilherme da Silva *et al.* Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 81, p. 314–318, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817302219>.

DE S. MEDEIROS, Bartolomeu G. *et al.* Physical Characterisation of an Alginate/Lysozyme Nano-Laminate Coating and Its Evaluation on ‘Coalho’ Cheese Shelf Life. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1088–1098, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-013-1097-5>.

DIAO, Wen-Rui *et al.* Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 109–116, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513003393>.

DONG, Huiying *et al.* Activity and safety evaluation of natural preservatives. **Food Research International**, [s. l.], v. 190, p. 114548, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996924006185>.

EL-SAYED, Hoda S.; EL-SAYED, Samah M. A modern trend to preserve white soft cheese using nano-emulsified solutions containing cumin essential oil. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, [s. l.], v. 16, p. 100499, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221515322100074X>.

FALIH, Mohammed A. *et al.* Enhancing safety and quality in the global cheese industry: A review of innovative preservation techniques. **Helijon**, [s. l.], v. 10, n. 23, 2024. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S2405844024164900/fulltext>. Acesso em: 20 jan. 2025.

FALLEH, Hanen *et al.* Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 330, p. 127268, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620311304>.

FERNANDES, Regiane Victória de Barros *et al.* Microencapsulated Rosemary (Rosmarinus officinalis) Essential Oil as a Biopreservative in Minas Frescal Cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. e12759, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.12759>.

FONTES, Milena Ramos Vaz *et al.* Antimicrobial properties of PLA membranes loaded with pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi) essential oil applied in simulated cream cheese packaging. **Food Biophysics**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 107–119, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11483-022-09750-x>. Acesso em: 31 mar. 2023.

FOX, Patrick F. *et al.* **Fundamentals of Cheese Science**. Boston, MA: Springer US, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7681-9>.

GUPTA, Vatsla; BISWAS, Deblina; ROY, Swarup. A Comprehensive Review of Biodegradable Polymer-Based Films and Coatings and Their Food Packaging Applications. **Materials**, [s. l.], v. 15, n. 17, p. 5899, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/17/5899>.

IBARRA-SÁNCHEZ, Luis A. *et al.* Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 2041–2052, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030220300096>.

KAPOOR, Rohit; METZGER, Lloyd E. Process Cheese: Scientific and Technological Aspects—A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 194–214, 2008. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2008.00040.x>.

KAZEMEINI, Hamidreza; AZIZIAN, Asghar; ADIB, Hasti. Inhibition of Listeria monocytogenes growth in turkey fillets by alginate edible coating with Trachyspermum ammi essential oil nano-emulsion. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 344, p. 109104, 2021.

KEYKHOSRAVY, Kobra *et al.* Chitosan-loaded nanoemulsion containing Zataria Multiflora Boiss and Bunium persicum Boiss essential oils as edible coatings: Its impact on microbial quality of turkey meat and fate of inoculated pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 150, p. 904–913, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019402572>.

KUORWEL, Kuorwel K. *et al.* Antimicrobial Activity of Natural Agents Coated on Starch-Based Films against Staphylococcus aureus. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 76, n. 8, p. M531–M537, 2011. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2011.02344.x>. Acesso em: 29 abr. 2021.

LIMA, Mariah Almeida *et al.* Physicochemical Characterization, Rheological Properties, and Antimicrobial Activity of Sodium Alginate-Pink Pepper Essential Oil (PPEO) Nanoemulsions. **Foods**, [s. l.], v. 13, n. 19, p. 3090, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/19/3090>.

LOCALI-PEREIRA, Adilson Roberto; LOPES, Nathalie Almeida; NICOLETTI, Vânia Regina. Pink Pepper (Schinus terebinthifolius Raddi) from Extracts to application: Truths about a Fake Pepper. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2062767>, [s. l.], 2022.

Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2022.2062767>. Acesso em: 31 mar. 2023.

LONG, Jiyang *et al.* The reduce of water vapor permeability of polysaccharide-based films in food packaging: A comprehensive review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 321, p. 121267, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861723007324>.

LU, Kuan-Wei *et al.* Design of organic/inorganic multilayer water vapor barrier thin films deposited via plasma polymerization for encapsulation. **Thin Solid Films**, [s. l.], v. 767, p. 139672, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040609023000032>.

MAGENIS, Renata Bongiolo *et al.* Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. **Food Control**, [s. l.], v. 45, p. 22–28, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514001959>.

MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C2SM06903B>.

MCCLEMENTS, David Julian; RAO, Jiajia. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011. Disponível em: <https://www-tandfonline.ez30.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1080/10408398.2011.559558>. Acesso em: 2 mar. 2021.

MCSWEENEY, P.L.H. Syneresis. In: MCSWEENEY, P.L.H. (org.). **Cheese problems solved**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 72–75.

MILLER, K.S.; KROCHTA, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 228–237, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224497010510>.

MORO, Armando *et al.* Dairy matrix effect on the transference of rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oil compounds during cheese making. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 95, n. 7, p. 1507–1513, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6853>.

NISAR, Tanzeela *et al.* Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 106, p. 670–680, 2018.

OLIVEIRA, Kátia C. *et al.* Essential Oil from the Leaves, Fruits and Twigs of *Schinus terebinthifolius*: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Potential. **Molecules**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 469, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/2/469>.

PARREIDT, Tugce; MÜLLER, Kajetan; SCHMID, Markus. Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. **Foods**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 170, 2018.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/7/10/170>. Acesso em: 1 mar. 2021.

PAVONI, Lucia *et al.* An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 135, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/1/135>. Acesso em: 9 abr. 2021.

PAVONI, Lucia *et al.* Green nanoemulsion interventions for biopesticide formulations. In: NANO-BIOPESTICIDES TODAY AND FUTURE PERSPECTIVES. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 133–160. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012815829600005X>.

PAVONI, Lucia *et al.* Properties and stability of nanoemulsions: How relevant is the type of surfactant?. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 58, p. 101772, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224720302768>.

PÉREZ-GAGO, Maria B.; KROCHTA, John M. Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 996–1002, 2001.

PÉREZ-SOTO, Elizabeth *et al.* The Addition of Microencapsulated or Nanoemulsified Bioactive Compounds Influences the Antioxidant and Antimicrobial Activities of a Fresh Cheese. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 2170, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/8/2170>.

PIERETTI, Gabriella Giani *et al.* Effect of an edible alginate coating with essential oil to improve the quality of a Fresh cheese. **Acta Scientiarum. Technology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 36402, 2019. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/36402>.

PIROZZI, Annachiara *et al.* Edible Coatings Containing Oregano Essential Oil Nanoemulsion for Improving Postharvest Quality and Shelf Life of Tomatoes. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1605, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/11/1605>.

POLAT YEMİŞ, Gökçe; SEZER, Elif; SIÇRAMAZ, Hatice. Inhibitory Effect of Sodium Alginate Nanoemulsion Coating Containing Myrtle Essential Oil (*Myrtus communis* L.) on *Listeria monocytogenes* in Kasar Cheese. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 21, p. 7298, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/21/7298>.

PRAKASH, Anand; BASKARAN, Revathy; VADIVEL, Vellingeri. Citral nanoemulsion incorporated edible coating to extend the shelf life of fresh cut pineapples. **LWT**, [s. l.], v. 118, p. 108851, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819311934>.

RADI, Mohsen *et al.* The use of orange peel essential oil microemulsion and nanoemulsion in pectin-based coating to extend the shelf life of fresh-cut orange. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. e13441, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.13441>. Acesso em: 14 abr. 2021.

RAMOS, Marina *et al.* Emulsions Incorporated in Polysaccharide-Based Active Coatings for Fresh and Minimally Processed Vegetables. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 665, 2021.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/3/665>.

RATHER, Muzamil A. *et al.* Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. **Journal of Basic Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 380–395, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.202000678>.

REIS, Douglas Rodrigues; AMBROSI, Alan; LUCCIO, Marco Di. Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. **Future Foods**, [s. l.], v. 5, p. 100126, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666833522000144>.

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos *et al.* Perfil do consumidor brasileiro e hábitos de consumo de leite e derivados. **Archives of Veterinary Science**, [s. l.], v. 25, n. 2, 2020. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/72429>.

ROCHA, Ramon S. *et al.* Possibilities for using ohmic heating in Minas Frescal cheese production. **Food Research International**, [s. l.], v. 131, p. 109027, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920300521>.

SALVIA-TRUJILLO, Laura *et al.* Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 43, p. 547–556, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X14002550>.

SANCHEZ, Leidy T.; PINZON, Magda I.; VILLA, Cristian C. Development of active edible films made from banana starch and curcumin-loaded nanoemulsions. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 371, p. 131121, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814621021270>.

SANDOVAL-COPADO, J. *et al.* Sensory profile development of Oaxaca cheese and relationship with physicochemical parameters. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 99, n. 9, p. 7075–7084, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216304167>.

SANGALETTI, Naiane *et al.* Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 262–269, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612009000200004&lng=pt&nrm=iso&tlang=pt.

SHARMA, Simran *et al.* Efficacy of free and encapsulated natural antioxidants in oxidative stability of edible oil: Special emphasis on nanoemulsion-based encapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 91, p. 305–318, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224418305867>.

SILVA, Sofia P.M. *et al.* Application of an alginate-based edible coating with bacteriocin-producing Lactococcus strains in fresh cheese preservation. **LWT**, [s. l.], v. 153, p. 112486, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364382101639X>.

SILVA, Simone Faria *et al.* Impact of different modified atmosphere packaging on quality parameters and probiotic survival during storage of Minas Frescal cheese. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 43, p. 101338, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429221004636>.

- STINTZING, Florian C; CARLE, Reinhold. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 19–38, 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224403001638>.
- SZCZESNIAK, Alina Surmacka. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 215–225, 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0950329301000398>.
- TADROS, Tharwat *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 108–109, p. 303–318, 2004.
- ULIANA, Michele Pereira *et al.* Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 83, p. 235–240, 2016.
- VAN DER BILT, A.; ABBINK, J.H. The influence of food consistency on chewing rate and muscular work. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 83, p. 105–110, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996917302327>.
- WALSTRA, P. *et al.* **Dairy Science and Technology**. [S. l.]: CRC Press, 2005. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420028010>.
- WANG, Qiannan *et al.* Novel Edible Coating with Antioxidant and Antimicrobial Activities Based on Whey Protein Isolate Nanofibrils and Carvacrol and Its Application on Fresh-Cut Cheese. **Coatings**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 583, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6412/9/9/583>.
- WEISANY, Weria *et al.* Targeted delivery and controlled released of essential oils using nanoencapsulation: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 303, p. 102655, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868622000574>.
- XIONG, Yun *et al.* Effect of oregano essential oil and resveratrol nanoemulsion loaded pectin edible coating on the preservation of pork loin in modified atmosphere packaging. **Food Control**, [s. l.], v. 114, p. 107226, 2020.

CONCLUSÕES GERAIS

As nanoemulsões à base de alginato de sódio e óleo essencial de pimenta rosa foram desenvolvidas com êxito utilizando a microfluidização como método de fabricação. As nanoemulsões desenvolvidas apresentaram características físico-químicas adequadas, como tamanho de gota nanométrico, estabilidade cinética ao longo do armazenamento, e comportamento reológico favorável. As propriedades observadas permitiram atestar a eficácia do processo de microfluidização como método de produção de nanoemulsões como sistemas de encapsulação e entrega de compostos bioativos. Além disso, os testes *in vitro* comprovaram que as nanoemulsões com óleo essencial de pimenta rosa possuem alta atividade antimicrobiana contra os microrganismos patogênicos *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, e que a nanoencapsulação do óleo essencial de pimenta rosa em nanoemulsões permite uma redução na quantidade necessária para se obter o efeito antimicrobiano desejado. Os resultados microbiológicos destacaram a viabilidade do uso do óleo essencial de pimenta rosa como substituto aos conservantes sintéticos, atendendo a demanda por alimentos mais naturais e seguros.

A aplicação da nanoemulsão à base de alginato de sódio e óleo essencial de pimenta rosa como revestimento ativo em queijo Minas Frescal resultou na preservação das propriedades físico-químicas dos queijos, incluindo textura, cor e umidade, ao longo do período de armazenamento refrigerado (28 dias a 4 °C). No entanto, a eficácia antimicrobiana *in situ* foi limitada, devido a possíveis interações entre os compostos ativos do óleo essencial de pimenta rosa da nanoemulsão com os constituintes da matriz do queijo, bem como a sinérese, que pode causar a diluição desses componentes, afetando suas propriedades antimicrobianas. Apesar das limitações observadas, os resultados demonstraram a viabilidade de utilização do revestimento na manutenção da qualidade do queijo, sugerindo a necessidade de ajustes na formulação para potencializar sua ação antimicrobiana em condições de aplicações em matrizes alimentares.

Diante dos resultados obtidos, concluímos que a aplicação da nanoemulsão à base de alginato de sódio e óleo essencial de pimenta rosa como revestimento é potencialmente viável, entretanto, recomenda-se estudos com aplicação em outras matrizes alimentares, como carnes processadas, queijos com menor umidade e frutas, explorando suas propriedades de conservação em outros sistemas alimentares. Além disso, ajustes no modo de aplicação do revestimento podem contribuir para transpor as limitações observadas com intuito de maximizar os benefícios fornecidos por essa tecnologia na ampliação da segurança e vida útil de alimentos.