

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA: SUSCETIBILIDADE
MICROBIANA E POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTAR

GLEIDSON LUIZ PEREIRA QUINTELLA

ORIENTADOR(A):

Doutora Eva Sofia Gonçalves da
Cunha

COORIENTADOR(A):

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

2024

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA: SUSCETIBILIDADE
MICROBIANA E POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTAR

GLEIDSON LUIZ PEREIRA QUINTELLA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Maria João dos Ramos
Fraqueza

VOGAIS:

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo
Lemsadekk

Doutora Eva Sofia Gonçalves da
Cunha

ORIENTADOR(A):

Doutora Eva Sofia Gonçalves da
Cunha

COORIENTADOR(A):

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Gleidson Luiz Pereira Quintella

Título da Tese ou Dissertação: Atividade antimicrobiana do óleo essencial de laranja: Suscetibilidade microbiana e potencial aplicação na indústria alimentar

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2024

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento: Mestrado em Segurança Alimentar

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☒ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☐ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 09 de Dezembro de 2024

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Luiz Quintella

Agradecimentos

A busca por conhecimento está além de títulos. Conhecimento nos molda, nos transforma, abre novos caminhos e cria novas perspectivas.

A vida de um estudante-trabalhador é árdua. Falta tempo, falta energia, somos as vezes dominado pelo cansaço e pela vontade de desistir, e cada passo dado é uma vitória mais perto de uma conquista.

Minha gratidão fica para minha Orientadora Doutora Eva Cunha e Coorientadora Doutora Manuela Oliveira, que mesmo sabendo das minhas dificuldades em estar completamente presente, abraçou esta ideia. Agradeço também a Professora Doutora Susana Alves que se disponibilizou a realizar a análise do óleo essencial de laranja por GC-MS e o Humberto da Plena Natura que muito gentilmente forneceu o OE para este estudo.

Certamente no futuro vou me lembrar destes dois anos de Mestrado com nostalgia. E da paciência do esposo Klemen, nos meus dias de mau humor. Assim como dos incentivos que de alguma forma foram um combustível nos momentos mais importantes.

Resumo

Atividade antimicrobiana do óleo essencial de laranja: suscetibilidade microbiana e potencial aplicação na indústria alimentar

A indústria de processamento de citrinos gera grandes quantidades de resíduos, cujo reaproveitamento para a produção de subprodutos, como o óleo essencial (OE) de laranja, pode mitigar impactos ambientais. Este OE, extraído da casca da laranja, apresenta propriedades antimicrobianas, sendo uma alternativa sustentável e econômica comparativamente a outros óleos essenciais. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano do OE de laranja (*Citrus sinensis*) numa coleção de oito bactérias com importância em segurança alimentar, bem como explorar sua viabilidade para aplicação na indústria alimentar. A composição química do OE foi caracterizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), encontrando um percentual de 69% de D-Limoneno. Além disso, foi realizada a caracterização do perfil de virulência das estirpes bacterianas que incluíram bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* CECT 935 e *Listeria monocytogenes* isolada de suíno) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 443, CECT 722, 104 e CECT 7162). A atividade antimicrobiana do OE foi avaliada pelo método modificado de difusão em disco. Para as estirpes suscetíveis, foi aplicado o método de microdiluição em microplaca para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB), bem como para determinação da curva da multiplicação bacteriana durante 24 horas de exposição ao OE.

Os resultados demonstraram que o OE apresentou maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, com halos de inibição observados para *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Entre as bactérias Gram-negativas, apenas *S. enterica* subsp. *enterica* CECT 443 foi suscetível ao OE. As CMIs obtidas foram de 8 µL/mL (*S. aureus* ATCC 25923), 125 µL/mL (*L. monocytogenes* CECT 935 e isolado de suíno) e 63 µL/mL (*S. enterica* subsp. *enterica* CECT 443). As CMBs indicaram ação bactericida do OE, sendo de 125 µL/mL para todas as estirpes testadas. A curva de multiplicação bacteriana confirmou a capacidade do OE de inibir a multiplicação das estirpes suscetíveis ao longo do período avaliado.

Os resultados reforçam o potencial do OE de laranja como um conservante natural eficaz, especialmente contra bactérias Gram-positivas, sugerindo a sua aplicação na indústria alimentar para aumentar a segurança microbiológica dos produtos. Contudo, estudos adicionais são necessários para validar sua eficácia em condições reais de processamento e armazenamento alimentar.

Palavras-chave: Óleo essencial de laranja, limoneno, atividade antimicrobiana, Gram-positivas, Gram-negativa

Abstract

Antimicrobial activity of orange essential oil: microbial susceptibility and potential application in the food industry

The citrus processing industry generates large amounts of waste, which can be repurposed to produce high-value by-products such as orange essential oil (EO), thereby mitigating environmental impacts. This EO, extracted from orange peel, exhibits antimicrobial properties and serves as a sustainable and cost-effective alternative compared to other essential oils. This study aimed to evaluate the antimicrobial potential of orange EO (*Citrus sinensis*) against a collection of eight strains relevant in food safety, as well as to explore its feasibility for application in the food industry. The chemical composition of the EO was characterized using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), revealing a 69% content of D-Limonene. Additionally, the virulence profiles of the bacterial strains were characterized, including Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* CECT 935, and *Listeria monocytogenes* isolated from swine) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 443, CECT 722, 104, and CECT 7162). The antimicrobial activity of the EO was assessed using a modified disk diffusion method. For susceptible strains, microdilution assays were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), along with the evaluation of bacterial growth curves during 24 hours of EO exposure.

The results demonstrated that EO exhibited greater antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, with inhibition zones observed for *S. aureus* and *L. monocytogenes*. Among Gram-negative bacteria, only *S. enterica* subsp. *enterica* CECT 443 was susceptible to EO. The MICs obtained were 8 $\mu\text{L/mL}$ (*S. aureus* ATCC 25923), 125 $\mu\text{L/mL}$ (*L. monocytogenes* CECT 935 and a swine isolate), and 63 $\mu\text{L/mL}$ (*S. enterica* subsp. *enterica* CECT 443). The MBCs indicated bactericidal activity of the EO, with a concentration of 125 $\mu\text{L/mL}$ for all tested strains. The bacterial growth curve confirmed the EO's ability to inhibit the growth of susceptible strains over the evaluated period.

The results reinforce the potential of orange EO as an effective natural preservative, particularly against Gram-positive bacteria, suggesting its application in the food industry to enhance the microbiological safety of products. However, additional studies are needed to validate its effectiveness under real food processing and storage conditions.

Keywords: Orange essential oil, limonene, antimicrobial activity, Gram-positive, Gram-negative.

Índice geral

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas	ix
Índice de Gráficos	x
Lista de Abreviações	xi
1. Revisão Bibliográfica.....	1
1.1. A Laranja - <i>Citrus sinensis</i>	1
1.1.1. Produção de Citrinos – a produção de laranja, produtos derivados e resíduos.....	2
1.1.2. Composição bioquímica de citrinos.....	3
1.2 Os óleos essenciais	5
1.2.1 Óleo essencial (OE) de laranja	6
1.2.2 Mecanismo de ação do óleo essencial de laranja.....	7
1.3 Microrganismos e o seu impacto na segurança alimentar	8
1.3.1 <i>Salmonella</i>	9
1.3.2 <i>Escherichia coli</i>	11
1.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.4 Conservantes Alimentares e o Uso de Óleos Essenciais na Segurança dos alimentos	16
2. Objetivos do estudo.....	17
3. Materiais e métodos	18
3.1 Cromatografia Gasosa com Espectrometria de massa.....	18
3.2 Coleção bacteriana	18
3.3 Caracterização do perfil de virulência da coleção bacteriana em estudo	19
3.3.1. Avaliação da produção de Dnase	19
3.3.2. Avaliação da Produção de Protease	20
3.3.3. Avaliação da Produção de Lecitinase	20
3.3.4. Avaliação da produção de Gelatinase.....	20
3.3.5. Avaliação da produção de Hemolisinas	21
3.3.6. Avaliação da produção de Biofilme	21
3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do Óleo Essencial de Laranja	21
3.5 Determinação da curva de inibição/multiplicação bacteriana e da Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial de laranja relativamente à coleção bacteriana em estudo.....	23
3.6 Determinação da Concentração Mínima Bactericida do óleo essencial de laranja relativamente à coleção bacteriana em estudo	25
4. Resultados e Discussão	26

4.1 Composição do óleo essencial de laranja determinada por Cromatografia Gasosa e espectrometria de massa	26
4.2 Perfil de virulência das bactérias do estudo.....	29
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do Óleo Essencial de Laranja: Método de difusão em disco	35
4.4 Concentrações Mínimas Inibitórias do óleo essencial de laranja relativamente às bactérias em estudo	37
4.5 Concentrações Mínimas Bactericidas do óleo essencial de laranja relativamente às bactérias de estudo	41
5. Conclusão e perspectivas futuras	43
6. Referências Bibliográficas.....	45
Anexos	55

Lista de Figuras

Figura 1: Representação de um corte transversal de uma laranja	2
Figura 2: Estrutura molecular do D-limoneno.....	5
Figura 3: Observação microscópica de <i>Salmonella</i> após coloração de Gram	10
Figura 4: Observação de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 por microscopia eletrónica de varrimento	11
Figura 5: Observação microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> após coloração de Gram. ...	13
Figura 6: Observação de <i>Listeria monocytogenes</i> por microscopia eletrónica de transmissão	15
Figura 7: Representação em cores dos poços da microplaca contendo a descrição para a análise	25
Figura 8: Cromatograma representativo da composição do óleo essencial de laranja determinada por Cromatografia Gasosa.	27
Figura 9: Análise para deteção da capacidade de produção de gelatinase em tubo. A – Controlo negativo; B – Resultado Positivo por <i>S. aureus</i> ATCC 25923; C – controlo positivo.	31
Figura 10: Ensaio para determinar a capacidade de produzir Dnase pelas bactérias em estudo. A – controlo positivo; B – controlo negativo; C – Resultado positivo de <i>S. aureus</i> ATCC 25922; D – Resultado positivo de <i>S. enterica subsp. enterica</i> CECT 722	32
Figura 11: Representação dos tipos de hemólise observadas neste estudo pela colecção bacteriana em estudo. A – controlo negativo; B – controlo positivo; C – <i>S. aureus</i> ATCC 25923; D – <i>E. coli</i> ATCC 25922; E – <i>L. monocytogenes</i> CECT 935 ;F- <i>L. monocytogenes</i> de Suíno	33
Figura 12: Resultados da deteção de produção de biofilme pela colecção bacteriana em estudo. A – <i>S. aureus</i> ATCC 25923; B- controlo positivo; C – controlo negativo; D – restantes isolados em estudo.	33
Figura 13: Resultados da deteção de produção de Protease pela colecção bacteriana em estudo. A – controlo positivo; B – controlo negativo.	34
Figura 14: Resultados da deteção de produção de Lecitinase pela colecção bacteriana em estudo. A – controlo positivo; B – controlo negativo.	34
Figura 15: Testes preliminares de inibição bacteriana pelo OE de laranja.	36
Figura 16: Teste para determinação da concentração Mínima Bactericida (CMB).	42

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista das bactérias utilizadas neste estudo para avaliação do potencial antimicrobiano do óleo essencial de laranja	19
Tabela 2: Esquema das diluições e análises realizadas nos ensaios em microplacas de 96 poços.....	24
Tabela 3: Descrição dos constituintes, em percentagem, identificados no óleo essencial de laranja pelo método de Cromatografia Gasosa.....	28
Tabela 4: Fatores de virulência produzidos pelas bactérias em estudo, detectados através de métodos fenotípicos	29
Tabela 5: Diâmetro dos halos de inibição (mm) promovidos pelo óleo essencial de laranja relativamente à coleção bacteriana em estudo.....	35
Tabela 6: Resultados da Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial de laranja relativamente às bactérias de estudo.....	37
Tabela 7: Resultados das Concentrações Mínimas Bactericidas do óleo essencial de laranja relativamente às bactérias de estudo.....	41

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Curva de crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 durante um período de 24 horas de incubação, incluindo o controlo positivo (apenas suspensão bacteriana) e na presença das diferentes concentrações do OE de Laranja.	39
Gráfico 2: Curva de crescimento da <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935 durante um período de 24 horas de incubação, incluindo o controlo positivo (apenas suspensão bacteriana) e na presença das diferentes concentrações do OE de Laranja.	39
Gráfico 3: Curva de crescimento da <i>Listeria monocytogenes</i> de Suíno durante um período de 24 horas de incubação, incluindo o controlo positivo (apenas suspensão bacteriana) e na presença das diferentes concentrações do OE de Laranja.	40
Gráfico 4: Curva de crescimento da <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> CECT 443 durante um período de 24 horas de incubação, incluindo o controlo positivo (apenas suspensão bacteriana) e na presença das diferentes concentrações do OE de Laranja.	40

Lista de Abreviações

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – *Brain Heart Infusion*

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CFU – Colony Forming Units (Unidades Formadoras de Colônias)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

CFU/mL – Colony Forming Units per Milliliter

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DNase – Desoxirribonuclease

DO – Densidade ótica

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA – Food and Drug Administration

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

ISO – International Organization for Standardization

LM – *Listeria monocytogenes* MIC – Minimum Inhibitory Concentration

MBC – Minimum Bactericidal Concentration

OE – Óleo Essencial

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

RNA – Ácido Ribonucleico

SA – *Staphylococcus aureus*

SE – *Salmonella enterica*

TSA – Tryptic Soy Agar (Ágar de Soja Triptona)

TSB – Tryptic Soy Broth (Caldo de Soja Triptona)

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

ZDI – Zone of Diffusion Inhibition (Zona de Inibição de Difusão)

1. Revisão Bibliográfica

1.1. A Laranja - *Citrus sinensis*

O genero *Citrus* apresenta uma complexidade taxonómica significativa devido à extensa hibridização e cultivo ao longo da história, o que tem dificultado a definição precisa das suas espécies. Avanços recentes em análises genómicas permitiram identificar três espécies ancestrais fundamentais – o Cidra (*Citrus medica*), a Tangerina (*Citrus reticulata*) e o Pomelo (*Citrus maxima*) – como as principais fontes genéticas para a diversidade de variedades cultivadas atualmente. A integração de métodos moleculares com abordagens taxonómicas tradicionais tem sido essencial para o esclarecimento das relações evolutivas no genero, possibilitando uma classificação mais precisa e abrangente. Essa compreensão aprimorada é crucial para programas de melhoramento genético, conservação da diversidade e manejo sustentável dos recursos genéticos de *Citrus* (Ollitrault et al. 2020).

As frutas das espécies pertencentes ao género *Citrus*, incluindo laranjas, toranjas, tangerinas, limas, limões e mandarinas, são abundantes em regiões tropicais, apresentando-se como uma das culturas mais amplamente produzidas em todo o mundo (Sharma et al., 2017).

A laranja (*Citrus sinensis*) é a principal fruta deste grupo, representando aproximadamente 70% da produção e consumo totais de citrinos no mundo (Okwi & Emenike, 2006). Esta fruta pode incluir componentes e moléculas com efeito benéfico para a saúde, incluindo moléculas com ação antioxidante, como os Flavonoides, que ajudam a proteger os organismos vivos contra danos oxidativos e prevenindo assim o desenvolvimento de várias doenças, como neoplasias, doenças cardiovasculares e diabetes. Por isso, há um interesse considerável na pesquisa de antioxidantes naturais e agentes redutores de radicais livres a partir de materiais vegetais (Okwi & Emenike, 2006; Olatunya & Akintayo, 2017).

As frutas cítricas, incluindo a laranja, possuem uma casca composta pela epiderme, flavedo (uma camada subepidérmica que contém vesículas com óleos essenciais), albedo (a camada esponjosa abaixo do flavedo, fonte de flavonoides) e membrana segmentar, que compreende uma rede de fibras finas ao longo dos segmentos (Figura1) (Liu, Heying & Tanumihardio, 2012). Os segmentos internos estão geralmente alinhados ao redor do núcleo central da fruta, preenchidos por pequenas vesículas de sumo e sementes. O sumo natural da laranja é rico em açúcares como a sacarose, glucose e frutose, em ácidos como o ácido cítrico, em vitaminas como o ácido ascórbico, em minerais como o cálcio, potássio e magnésio, e em pectinas e pigmentos como o caroteno (Gao et al., 2018).

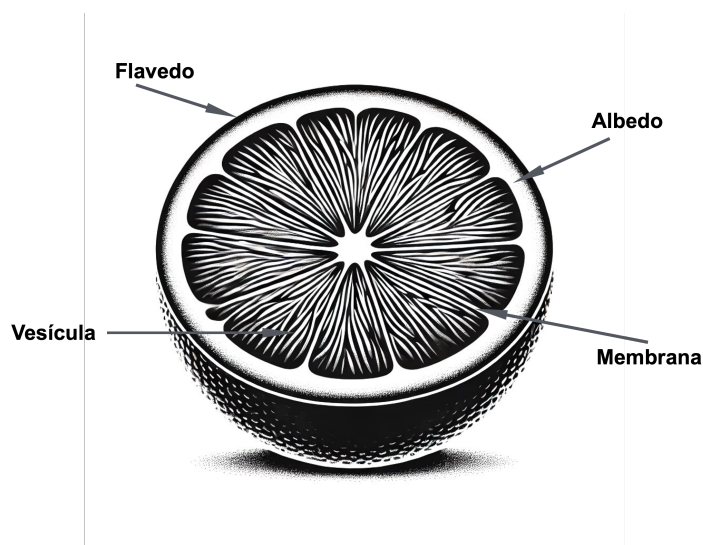


Figura 1: Representação de um corte transversal de uma laranja (Próprio autor)

1.1.1. Produção de Citrinos – a produção de laranja, produtos derivados e resíduos

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, serão produzidas globalmente cerca de 48.8 milhões de toneladas de laranjas em 2023 e 2024 (USDA, 2024). Por outro lado, apesar de os dados oficiais do Instituto Nacional de Estatística (INE) sobre a produção de laranjas em Portugal em 2023 ainda não se encontrarem disponíveis, em 2022 foram produzidas em Portugal cerca de 360 mil toneladas de laranjas, correspondendo a um aumento de cerca de 15% em relação a 2021 (INE, 2024).

Uma grande parte da produção mundial de laranjas, variando entre 60% a 70%, é destinada à produção de sumos. Este setor do mercado é dominado pelo Brasil e pelos Estados Unidos, sendo que o Brasil é responsável por mais de 50% da produção mundial de sumo de laranja (Neves et al., 2010; Wardowski et al., 2013). A fração da produção de laranjas que não é transformada em sumo é vendida como fruta *fresca*, em mercados, supermercados e feiras, sendo geralmente destinada ao consumo direto. Países como Espanha, China, e México são grandes fornecedores de laranjas frescas para o mercado internacional (FAO, 2019; Liu et al., 2014).

A industrialização da produção de citrinos para a produção de sumo gera grandes quantidades de resíduos, correspondendo a 50% do peso da fruta. Esses resíduos incluem cascas, polpas e sementes, e a sua gestão representa um desafio ambiental significativo (Schieber et al., 2001).

De acordo com Rezzadori et al., 2012, alguns estudos têm demonstrado que esses resíduos possuem um elevado potencial de aproveitamento em diversas indústrias, como a

de alimentação animal, produção de compostos bioativos e bioenergia. A valorização dos resíduos de citrinos pode contribuir para mitigar os impactos ambientais, mas também agregar valor económico ao processo de produção de sumos (Mamma & Christakopoulos, 2008). Assim sendo, existe um interesse crescente no uso eficiente dos diversos resíduos resultantes da produção de citrinos.

São várias as utilizações possíveis dos resíduos resultantes da produção e processamento de laranja, incluindo na produção de fertilizantes orgânicos, pectina, óleos essenciais, compostos antioxidantes como o caroteno, utilizado também como corante, e o limoneno (Abecitrus, 2008). Além disso, a ação de microrganismos que utilizam resíduos de laranja como substrato pode originar vários compostos de interesse biotecnológico, como proteínas antimicrobianas, ácidos orgânicos, etanol, e enzimas como a pectinase, (Abecitrus, 2008).

O potencial biotecnológico dos resíduos resultantes da indústria da produção e processamento de laranja tem sido responsável pelo desenvolvimento de novos produtos, resultantes por exemplo do aproveitamento de cascas, sementes e bagaços (Storck et al., 2013), representando um negócio aparentemente rentável a nível global (Murray, et al., 2017). De facto, existem já várias empresas a nível mundial que atualmente aproveitam os resíduos, principalmente resultantes da produção de sumos, para transformação em fertilizantes orgânicos, enzimas, extratos vegetais e óleos essenciais (OE) (Arbos, Stevani & Castanha, 2013). Estes últimos representam compostos rentáveis, sendo que o mercado global de óleos essenciais foi avaliado em 11,41 biliões de dólares em 2023, sendo expectável que este valor aumente para os 12,47 biliões em 2024 e 27,82 biliões até 2032 (Fortunebusinessinsights, 2014). Por fim, subprodutos ricos em monoterpenos com ação antioxidante e antimicrobiana são também relevantes, tendo aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética (Mahato et al., 2018).

No entanto, é importante referir que, apesar do aumento da investigação sobre o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, a indústria ainda explora pouco o aproveitamento dos subprodutos (Aranha et al., 2017), sendo por isso importante desenvolver linhas de investigação neste sentido.

1.1.2. Composição bioquímica de citrinos

A composição química dos frutos cítricos, incluindo a sua quantidade de carboidratos, pectina, vitaminas como a vitamina C, e minerais como cálcio e magnésio, é influenciada pelas condições de crescimento da planta, incluindo as condições ambientais e os tratamentos aplicados, pelo estágio de maturação da mesma e pela própria variedade do fruto (Schieber et al., 2001).

Em relação à composição em carboidratos, os açúcares presentes nestes frutos mais relevantes são a glucose, a frutose e a sacarose, apresentado teores médios totais entre 5% e 10%, variando em função do fruto. A proporção de glucose e frutose nos sumos de citrinos é geralmente de 1:1, sendo a sacarose o único oligossacarídeo presente (Dugo et al., 2002).

A limonina, um dos principais componentes da casca de laranja, responsável pelo sabor amargo do sumo deste fruto, é descrita como sendo um composto benéfico para a saúde humana, atuando na redução do colesterol e no risco de trombose venosa profunda (Cakrawati & Handayan., 2017).

Alguns autores descrevem que alguns dos constituintes bioquímicos dos citrinos podem ser utilizados como “medicamentos naturais”, sendo já amplamente utilizados por grande parte da população mundial de forma empírica (Balick, 1994). Alguns destes compostos apresentam elevado potencial de utilização futura na área da saúde, como por exemplo os monoterpenos, tais como os terpenoides e os isoprenoides, que são metabolitos secundários presentes em plantas e também encontrados em microrganismos (Kohl et al., 2015). Estes compostos são comumente utilizados em diversas áreas, incluindo na agricultura, na indústria de produtos de cosmética e na indústria alimentar, e ainda como antissépticos. Além disso, os monoterpenos podem apresentar variadas propriedades farmacológicas, tais como ação antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anticancerígena, hipotensiva e antiespasmódica (Ravichandran et al., 2018; Suh et al., 2017).

O limoneno é um dos monoterpenos presentes em diversas frutas naturais, como na toranja, tangerina, laranja, mandarina e limão (González-Mas et al., 2019). O D-limoneno (Figura 2), a sua forma ativa principal, é a forma mais comum e abundante em óleos essenciais de cítricos (Anandakumar, Kamaraj & Vanitha, 2021). Adicionalmente, a casca de laranja é uma fonte alimentar rica em limoneno, apresentado na sua constituição cerca de 90% a 95% de limoneno em peso (Aazza et al., 2011). Além das suas potenciais aplicações na área da saúde, o limoneno é frequentemente utilizado como suplemento dietético e como ingrediente de produtos cosméticos. Por ser considerado seguro para ingestão humana, o limoneno é utilizado na indústria alimentar como agente aromatizante (Sun, 2007).

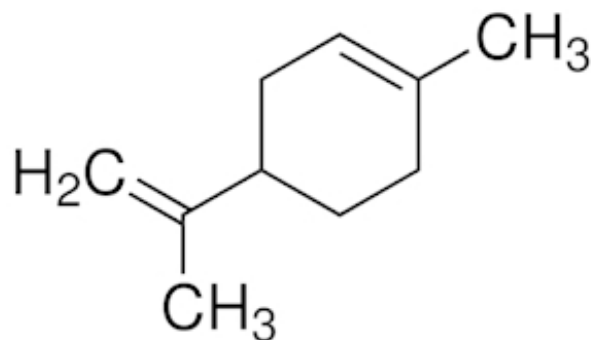


Figura 2: Estrutura molecular do D-limoneno (Fonte: D-Limonene ref. 814546 Sigma-Aldrich)

O D-limoneno apresenta uma lipofilicidade característica, promovendo o aumento da absorção celular, especialmente a nível intestinal, garantindo uma boa biodisponibilidade na circulação sistêmica. Em resumo, por ser lipofílico, o D-limoneno atravessa facilmente as membranas celulares intestinais, o que facilita sua absorção no trato digestivo, o que resulta numa biodisponibilidade elevada, permitindo que uma quantidade significativa do composto entre na circulação sistêmica, seja distribuída pelo organismo e exerça efeito em diferentes localizações do mesmo (Sharifi-Rad et al., 2017).

O D-limoneno apresenta uma baixa toxicidade, o que o torna seguro para uso humano e animal através de várias formas de exposição (ingestão, aplicação tópica, inalação), apresentando poucos efeitos adversos quando consumido / administrado nas doses normalmente encontradas em alimentos, produtos de cuidados pessoais e medicamentos (Sun, 2007). Este composto tem sido utilizado para dissolução de cálculos biliares de colesterol, e no alívio de sintomas associados à azia e refluxo gastroesofágico, graças ao seu efeito neutralizante ácido (Sun, 2007). Além disso, destaca-se o seu potencial preventivo e terapêutico relativamente a diversos tipos de neoplasias, com resultados positivos nos cânceros de mama e colorretal (Sun, 2007). Assim, o D-limoneno pode representar uma valiosa ferramenta tanto no tratamento quanto na prevenção de certas condições médicas, destacando a sua importância contínua na investigação clínica e terapêutica (Sun, 2007).

1.2 Os óleos essenciais

Há séculos que as plantas medicinais são usadas pela humanidade para prevenir, tratar e curar doenças (Veiga Júnior & Pinto, 2005). Essas abordagens desenvolveram-se a partir de observações empíricas sobre os efeitos das plantas, contribuindo para a disseminação do conhecimento sobre as suas possíveis utilizações terapêuticas (Maciel, 2002).

Com o avanço da ciência e da tecnologia, as plantas medicinais têm sido largamente estudadas com vista a identificar a sua composição química e comprovar cientificamente o seu potencial medicinal. Investigadores de diversas áreas têm demonstrado interesse nesta área de investigação, procurando aprofundar o conhecimento sobre os compostos presentes nas plantas medicinais e comprovando a eficácia desses compostos para diversas aplicações (Arnous et al., 2005).

Grande parte das plantas medicinais estudadas até hoje demonstraram um potencial terapêutico significativo, sobretudo devido à presença de óleos essenciais nas suas estruturas vegetativas e reprodutivas. Os óleos essenciais (OE) são compostos extraídos de plantas aromáticas, e incluem compostos voláteis responsáveis pelo aroma das plantas (Geraci et al., 2017). Dependendo da planta, os OE podem ser encontrados em diversas partes da mesma, incluindo nas folhas, frutos, flores, rizomas, raízes, cascas e sementes (Cunha et al., 2010). A extração destes compostos pode ser feita através da técnica de destilação por arraste a vapor, geralmente aplicada a diversas partes da planta, ou através da técnica de extração com prensagem a frio, geralmente utilizada para extração de óleos essenciais a partir da casca de frutos cítricos (Bizzo et al., 2009). Esses óleos são compostos por metabolitos secundários, como fenilpropanóides, e mono e sesquiterpenos (Bakkali et al., 2008).

A composição química e a concentração dos óleos essenciais podem ser influenciadas por diversos fatores ambientais, que causam variações significativas na produção desses metabolitos. Entre os fatores que afetam essa produção estão a temperatura, luminosidade, sazonalidade, horário de recolha da planta e disponibilidade de água (Morais, 2009).

Os OE têm diversas aplicações industriais, sendo utilizados na produção de perfumes, sabonetes, produtos de limpeza, cosméticos e fármacos como agentes bioativos e aromatizantes; e na indústria alimentar, promovendo o alargamento do tempo de prateleira dos produtos através da sua ação antimicrobiana e antioxidante (Cunha *et al.*, 2010). Adicionalmente, são utilizados como alternativa a conservantes sintéticos que apresentem potenciais efeitos secundários para a saúde humana e animal (Teixeira *et al.*, 2013).

Um OE pode apresentar atividades biológicas diversas. Dependendo de cada tipo de óleo, é possível encontrar na sua constituição compostos com ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (Olmedo et al., 2014). Estas características dependem da composição química específica de cada espécie de planta, da sua distribuição geográfica e clima da região respetiva, da época de colheita e da técnica de extração aplicada (Dima & Dima, 2015).

1.2.1 Óleo essencial (OE) de laranja

No que diz respeito à produção de laranja, existe uma ampla variedade de espécies de laranjas, conforme descrito por Galvão et al. (2015). No seu estudo, o autor destaca a

espécie *Citrus sinensis*, comumente conhecida como laranja doce, e que produz um óleo essencial composto por uma combinação de terpenos, incluindo D-limoneno (98%), hidrocarbonetos, aldeídos e compostos oxigenados. Devido à sua natureza insaturada, este óleo é suscetível à oxidação, influenciada pela luz, ar e humidade (Galvão et al, 2015).

Nos últimos anos, o interesse na aplicação de óleos essenciais na indústria alimentar tem vindo a aumentar devido principalmente às diferentes propriedades biológicas que podem apresentar, incluindo as atividades antioxidante, antimicrobiana, anti tumoral, analgésica, inseticida e anti-inflamatória referidas anteriormente. Devido a estas propriedades, a indústria de alimentos tem incorporado alguns tipos de óleos essenciais na formulação de produtos ou em embalagens (Bajpai et al., 2018).

Um óleo essencial ideal para a indústria de alimentos é aquele que está disponível em grandes volumes e tem rentabilidade económica, e que seja reconhecido como seguro para a saúde (Ribeiro et al., 2018; Tomar et al., 2018).

No entanto, a utilização dos óleos essenciais a nível industrial pode apresentar algumas limitações, associadas à grande variabilidade da composição química associada aos diferentes lotes e a cada região de onde o OE é proveniente, a interações com a matriz alimentar, a níveis de toxicidade variados, a propriedades sensoriais que podem alterar o produto, à necessidade de padronização prévia da forma de aplicação no produto, à sua natureza volátil, e à suscetibilidade a oxidação (Stevanović et al., 2018; Ribeiro et al., 2018).

1.2.2 Mecanismo de ação do óleo essencial de laranja

O óleo essencial de laranja, cujo principal componente ativo é o limoneno, age nas bactérias por meio de diversos mecanismos bioquímicos que afetam a integridade e funcionalidade celular dos micro-organismos. O limoneno é um composto lipofílico, o que significa que tem alta afinidade pelas membranas celulares, compostas de lipídios. Ao interagir com a membrana plasmática bacteriana, o limoneno causa alterações na estrutura lipídica, resultando em aumento da permeabilidade da membrana. Isso pode levar à perda de iões, nutrientes e conteúdo celular essencial, como proteínas e ácidos nucleicos, resultando na morte da célula bacteriana. A ação do óleo essencial de laranja sobre a membrana celular também interfere no gradiente eletroquímico e no potencial de membrana bacteriano. A perda desse potencial prejudica processos essenciais, como a síntese de ATP, o transporte ativo de moléculas e a homeostase celular, o que leva à morte celular por incapacidade de realizar funções metabólicas essenciais (Burt 2004).

Embora o limoneno seja conhecido principalmente por suas propriedades antimicrobianas diretas, ele também pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células bacterianas. O aumento dos níveis de ROS pode causar dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídios, resultando em morte celular (Erasto & Viljoen, 2008).

O limoneno e outros componentes do óleo essencial de laranja podem interferir na formação de biofilmes bacterianos, que são estruturas multicelulares protegidas por uma matriz extracelular. O óleo essencial pode prevenir a adesão bacteriana a superfícies e dificultar a formação da matriz extracelular, o que torna as bactérias mais suscetíveis à ação antimicrobiana e à defesa do hospedeiro. (Burt, 2004).

Além da ação antimicrobiana, o óleo essencial de laranja também possui propriedades antioxidantes. Essa atividade pode desempenhar um papel em proteger as células dos tecidos hospedeiros contra o estresse oxidativo induzido pelas bactérias durante uma infecção, o que é um efeito indireto benéfico na luta contra infecções (Burt, 2004).

1.3 Microrganismos e o seu impacto na segurança alimentar

Nos últimos anos, tem havido uma preocupação crescente com as doenças transmitidas por alimentos, impulsionada pela obrigação de garantir a segurança dos produtos consumidos. Globalmente, são constantemente debatidas estratégias para controlar esta problemática e definir planos de controlo específicos para garantir a segurança dos alimentos, inclusive do ponto de vista microbiológico (Vidal et al. 2022).

Cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos são causadas por microrganismos. Esses microrganismos podem estar presentes em diversos géneros alimentícios, sendo que sua transmissão pode ocorrer em diferentes fases da produção do alimento, mas geralmente resulta do uso inadequado de metodologias nas etapas finais da sua preparação ou distribuição. Existem mais de 250 tipos diferentes de bactérias, vírus e parasitas que podem causar doenças de origem alimentar (ASAE, 2024).

Doença transmitida por alimentos é um termo abrangente que se refere a uma síndrome caracterizada geralmente por náuseas, vômitos e diarreia, que pode ou não ser acompanhada de febre, resultante da ingestão de alimentos ou água contaminados. Contudo, os sintomas digestivos não são as únicas manifestações dessas doenças; dependendo do agente envolvido pode ocorrer também doença extraintestinal, afetando diversos sistemas e órgãos, como por exemplo os rins, o fígado, e o sistema nervoso central (Forsythe, 2000).

Ainda segundo Forsythe (2000), as doenças transmitidas por alimentos podem ser causadas por bactérias (incluindo *Salmonella enterica*, *Shigella* spp. e *Escherichia coli*), toxinas bacterianas (produzidas por bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus cereus*, *E. coli*, e *Vibrio* spp.), e também por vírus, parasitas ou outras substâncias tóxicas.

1.3.1 *Salmonella*

De acordo com Willey et al. (2011), as bactérias do género *Salmonella* são bacilos de Gram negativo, não formadores de esporos, com flagelos peritríquios que permitem motilidade. Apresentam aproximadamente entre 0,7 a 1,5 micrômetros de largura e 2 a 5 micrômetros de comprimento (Figura 3). Algumas estirpes podem possuir cápsula, o que lhes confere uma vantagem adicional em termos de resistência e virulência.

É um microrganismo amplamente distribuído na natureza, presente na microbiota de alguns animais, e responsável por toxinfecções de origem alimentar em países desenvolvidos. De facto, em 2020, a *Salmonella* foi responsável por 22,5% de todos os surtos de origem alimentar na União Europeia, resultando em 3.686 doenças, 812 hospitalizações e sete mortes (Shinohara et al. 2008; Biomerieux, 2024). As aves e os bovinos desempenham um papel significativo na disseminação deste microrganismo patogénico (Foley et al., 2013).

A disseminação de *Salmonella* entre os animais, juntamente com a presença de portadores assintomáticos e a sua persistência no ambiente e nos alimentos, justifica a sua importância na saúde pública global. *Salmonella* é um género patogénico que pode causar várias doenças em humanos, como gastroenterite, febre tifoide e febre paratifoide, evidenciando a necessidade do seu controle rigoroso e do estabelecimento de práticas de higiene para prevenir infecções (Hansson & Lindberg, 2010). Como tal, é crucial adotar programas permanentes de controle e erradicação deste microrganismo, conforme observado por Shinohara et al. (2008). Em Portugal existe um Plano Nacional de Controlo de Salmonelas em aves estabelecido pela DGAV (DGAV, 2024).

A sua presença em alimentos representa um problema significativo para a saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, onde os sintomas podem ser diagnosticados tardiamente, aumentando a pressão sobre os sistemas de saúde (Tessari et al., 2008).

É importante destacar que a maioria dos serotipos deste género são patogénicos para os seres humanos, apresentando variações na sintomatologia que causam devido às diferenças no potencial patogénicos dos diferentes serotipos, e à idade e à resposta imunológica do hospedeiro (Maijala et al., 2005).

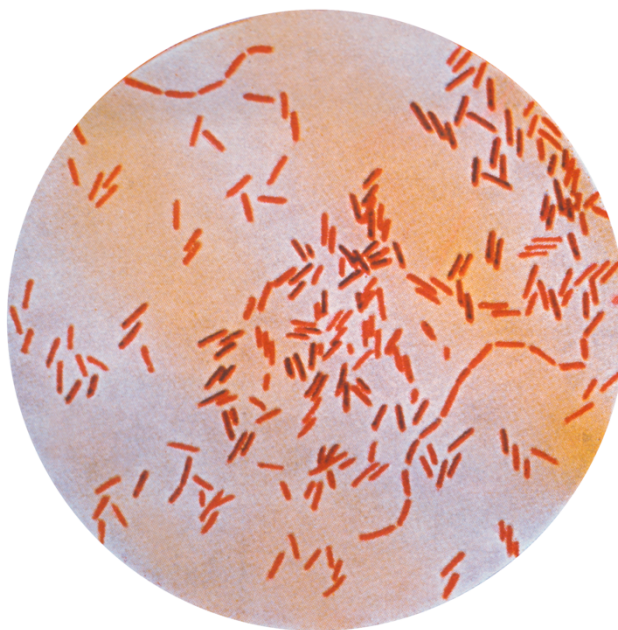


Figura 3: Observação microscópica de *Salmonella* após coloração de Gram (Fonte: Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. 2024. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2114>)

O género *Salmonella* compreende duas espécies, *Salmonella enterica*, com mais de 2.500 serotipos distintos, e *Salmonella bongori* (Teklemariam et al., 2023).

Os serotipos de *Salmonella* são classificados com base nas suas estruturas antigénicas, que incluem antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Esses antígenos permitem a diferenciação entre os diversos serotipos e são essenciais para a identificação epidemiológica das estirpes (CDC, 2023; Teklemariam et al., 2023). Os serotipos mais patogénicos pertencem à espécie *S. enterica*, responsável por diversas doenças em humanos (Cota et al., 2019).

Salmonella Typhimurium é um dos serotipos mais comuns e frequentemente associado a surtos de gastroenterite em humanos. De acordo com o CDC (2023) e Teklemariam et al. (2023), a gastroenterite causada por *S. Typhimurium* pode resultar em sintomas como diarreia, febre, náuseas, vômitos e dores abdominais.

A carne suína é reconhecida como um dos principais veículos de transmissão de *Salmonella* não tifoide por meio de alimentos, sendo o matadouro um ponto crítico para a infecção dos suínos e a consequente contaminação das carcaças.

Salmonella Enteritidis é frequentemente associada a infecções resultantes do consumo de ovos e carne de frango contaminados. Assim como *S. Typhimurium*, este serotipo é uma causa comum de gastroenterite, originando sintomas semelhantes, e é descrito pelo

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), como um dos principais serotipos responsáveis por surtos de salmonelose ligados a alimentos de origem animal (CDC, 2023; Teklemariam et al., 2023).

Salmonella Infantis é um serotipo emergente, frequentemente encontrado em produtos alimentares com carne de frango. As infecções por *S. Infantis* também resultam em gastroenterite, com sintomas típicos de infecções por *Salmonella*. Relatórios do CDC destacam a crescente importância de *S. Infantis* em surtos de salmonelose, particularmente em regiões onde o consumo de carne de frango é elevado (CDC, 2023; Teklemariam et al., 2023).

O serotipo *Salmonella* Typhi é responsável pela febre tifoide, uma doença grave que se caracteriza por febre alta, dores abdominais, e, em alguns casos, complicações severas como perfuração intestinal. A febre tifoide resulta principalmente da ingestão de água ou alimentos contaminados e, segundo o CDC (2023), continua a ser um problema de saúde pública grave em muitas partes do mundo, particularmente em regiões com saneamento básico inadequado.

1.3.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria de Gram negativo, em forma de bastonete móvel, com flagelos que permitem a sua locomoção (Figura 4). Pertencente à família Enterobacteriaceae e à classe Gammaproteobacteria, esta bactéria é capaz de se multiplicar rapidamente, podendo duplicar em número em cerca de 20 minutos sob condições ideais. Devido a essa alta taxa de multiplicação, *E. coli* tornou-se um modelo valioso para estudos de biologia molecular e evolução microbiana (Idalia & Bernardo, 2017).

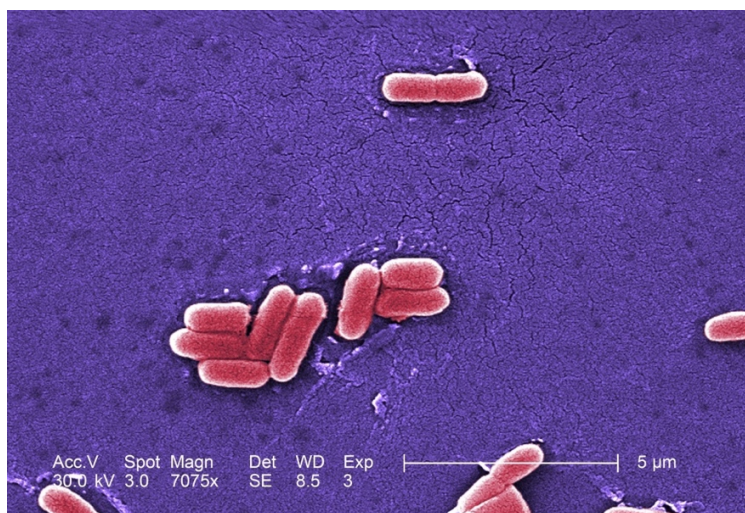


Figura 4: Observação de *Escherichia coli* O157:H7 por microscopia eletrônica de varrimento

(Fonte: Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. 2024. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10066>)

E. coli inclui estirpes comensais, frequentemente associadas ao aparelho gastrointestinal de animais e humanos, mas também estirpes patogênicas que causam várias doenças em Humanos, estando associadas a mais de 2 milhões de mortes por ano (Kaper et al., 2004).

No caso das estirpes patogênicas, estas podem ser classificadas em diferentes patótipos com base nos seus fatores de virulência e no tipo de doença que causam. Os principais patótipos incluem: *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), que causa diarreia do viajante geralmente adquirida através da ingestão de água ou alimentos contaminados; *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), que inclui a *E. coli* O157:H7 (Figura 4), associada a colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urémica, uma condição grave que pode levar a insuficiência renal (CDC, 2018); e *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), que afeta principalmente crianças em países em desenvolvimento, causando diarreia (Nataro & Kaper, 1998). Além desses, também é importante destacar os patótipos *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC). EAEC é conhecida por aderir ao epitélio intestinal em um padrão característico de "empilhamento de tijolos", estando associada a casos de diarreia persistente, especialmente em crianças e viajantes em países em desenvolvimento (Nataro & Kaper, 1998). Já EIEC é semelhante à *Shigella* na sua capacidade de invadir e destruir as células epiteliais do cólon, resultando em uma forma de disenteria, com sintomas como febre, dor abdominal e diarreia com muco e sangue, frequentemente associada à ingestão de alimentos ou água contaminados (CDC, 2018).

As fontes de origem alimentar mais frequentemente associadas a *E. coli* O157, um dos patótipos mais relevantes em termos de doença de origem alimentar, incluem carne bovina mal cozinhada, leite não pasteurizado, vegetais crus e água contaminada, sendo que, para prevenir infecções, é importante realizar boas práticas agrícolas e de produção, incluindo o tratamento térmico adequado dos alimentos e a pasteurização do leite (FDA, 2020).

Medidas de controle na produção de alimentos incluem a implementação de sistemas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que ajudam a identificar e gerenciar riscos de contaminação. Além disso, a vigilância microbiológica regular e a educação sobre higiene alimentar são cruciais para reduzir a incidência de surtos de *E. coli* (WHO, 2020).

É ainda importante referir que algumas estirpes de *E. coli* podem causar doenças fora do aparelho gastrointestinal, sendo categorizadas como *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC), que incluem *coli* uropatogênicas (UPEC), responsáveis por infecções do trato urinário, *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC), e *E. coli* causadora de sépsis (SEPEC), associada a infecções sistêmicas graves (Dale & Woodford, 2015).

1.3.3 *Staphylococcus aureus*

O relato mais antigo de uma intoxicação alimentar por *Staphylococcus* foi feito por Vaughan e Sternberg em 1884. Entretanto, foi Barber, em 1914, quem comprovou de maneira definitiva a ocorrência de intoxicações estafilocócicas por via alimentar, ao associá-las ao consumo de leite cru proveniente de uma vaca com mastite (Barber, 1914).

Staphylococcus aureus é uma bactéria comumente encontrada na pele e na mucosa nasal de aproximadamente 30% das pessoas, geralmente sem causar doença (Figura 5). No entanto, pode causar infecções que variam de leves, como lesões cutâneas, a graves, incluindo bacteremia, pneumonia e endocardite (Rasigade et al., 2014). Adicionalmente, algumas estirpes, como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), apresentam resistência a vários antibióticos, complicando o tratamento de infecções causadas por estes agentes. Fatores que predispõem para o desenvolvimento de infecções graves incluem a presença de uma doença crônica, o uso de dispositivos médicos invasivos e internamentos em unidades de cuidados intensivos, sendo por isso fundamental (CDC, 2024).

Na indústria alimentar a detecção deste agente durante o processamento de alimentos serve como um indicador de higiene inadequada, destacando a importância de práticas sanitárias rigorosas para garantir a segurança dos alimentos (Maestri et al., 2020).

Adicionalmente, algumas estirpes de *Staphylococcus* têm a capacidade de produzir toxinas, entre as quais enterotoxinas que são importantes agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos (Kluytmans 2010). Essas toxinas são proteínas solúveis em água e resistentes ao calor, permanecendo ativas mesmo após processos de pasteurização. A destruição das enterotoxinas só é alcançada após tratamento térmico a 100°C aplicado durante pelo menos 30 minutos (Embrapa, 2024).

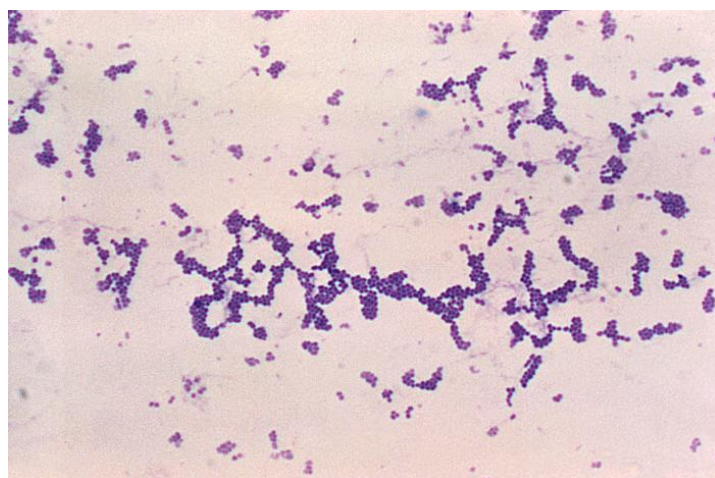


Figura 5: Observação microscópica de *Staphylococcus aureus* após coloração de Gram (Fonte:

Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. 2024. Disponível em:

<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2296>

A mastite é uma das doenças mais significativas e economicamente relevantes na produção leiteira, sendo frequentemente causada por *Staphylococcus aureus*. Essa bactéria é capaz de produzir uma variedade de toxinas e fatores de virulência, incluindo a toxina da síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1), que contribuem para a gravidade da mastite. A presença de altos níveis de células somáticas no leite, um indicador comum de mastite, está correlacionada com a detecção de *S. aureus* produtor de TSST-1, o que evidencia a necessidade da aplicação de práticas rigorosas de segurança dos alimentos para controlar a presença de *S. aureus* no leite, e proteger tanto a saúde animal quanto a segurança dos consumidores (Hayakawa et al., 2000). Além disso, a carne de vaca contaminada com *S. aureus*, por exemplo através de equipamentos utilizados na preparação de alimentos, pode também representar um fator predisponente para transmissão do agente se esta for ingerida mal cozinhada (Hayakawa et al. 2000).

As intoxicações alimentares causadas por esta bactéria estão geralmente associadas a alimentos manipulados após o processamento e armazenados em temperaturas entre 10 e 45°C antes do consumo, que incluem por exemplo produtos alimentares com recheios de carne, saladas preparadas com ovo ou marisco, bolos recheados, fiambre, gelados e queijo (Argudin et al., 2010).

Os sintomas de intoxicação por *S. aureus* aparecem entre 1 e 7 horas após o consumo do alimento contaminado, dependendo da quantidade de toxina ingerida. Para que ocorra doença, a concentração de *S. aureus* deve ser de pelo menos 10^5 - 10^6 UFC por grama de alimento, equivalente a uma quantidade de toxina entre 0,1 e 1 micrograma (Argudín et al., 2010). Os sintomas mais comuns são náuseas e vômitos, por vezes acompanhados por diarreia e dores abdominais. A evolução clínica é geralmente favorável, com os sintomas a desaparecer normalmente em 48 horas (Schechter & Marangoni, 1998).

1.3.4 *Listeria monocytogenes*

A espécie *L. monocytogenes* é constituída por bacilos de Gram positivo anaeróbios facultativos, podendo aparecer isolados ou agrupado em pares (Figura 6). *L. monocytogenes* apresenta capacidade de se multiplicar em temperaturas baixas e ambientes com baixo teor de oxigénio, o que pode ocorrer em produtos alimentares armazenados em atmosferas modificadas, proporcionando condições favoráveis para sua multiplicação no final da vida útil dos produtos (Baka et al., 2015).

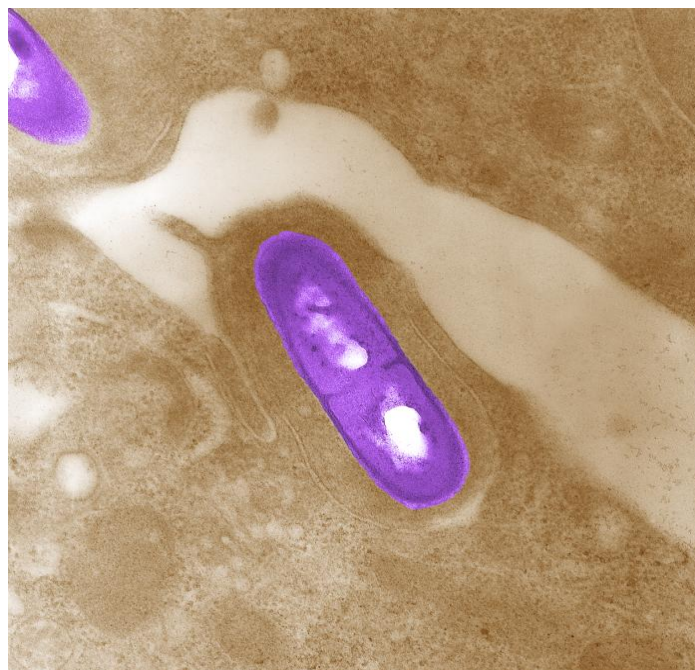


Figura 6: Observação de *Listeria monocytogenes* por microscopia eletrônica de transmissão.

(Fonte: Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. 2024. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10828>)

Este agente causa uma doença denominada listeriose, sendo transmitido por alimentos, principalmente alimentos prontos para consumo contaminados, como salmão fumado e queijos (Lopez-Valladares et al., 2014). As novas gerações de alimentos refrigerados, prontos para consumo, têm suscitado preocupações quanto ao risco de listeriose, especialmente aqueles desprovidos de ácidos orgânicos inibitórios ou com contagens reduzidas de microrganismos concorrentes, e com uma vida útil longa. Esses alimentos são frequentemente consumidos sem tratamento adicional o que aumenta a possibilidade de ingestão desta bactéria (Luber et al., 2011).

Em 2022, a listeriose afetou aproximadamente 2.738 pessoas na União Europeia, resultando em 286 mortes. A mortalidade é mais elevada em populações vulneráveis com condições imunossupressoras subjacentes, como idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos. (EFSA, 2023).

Os sintomas de listeriose podem variar dependendo de características individuais e da região do corpo afetada. Em geral, os sintomas podem ser divididos em duas categorias principais, sendo uma não invasiva como a Gastroenterite, que se manifesta por febre, dores musculares, náuseas e diarreia, sendo mais comum em indivíduos saudáveis e surgindo geralmente algumas horas ou dias após a ingestão de alimentos contaminados; e uma forma invasiva. Neste último caso, ocorre bacteriemia, e a bactéria pode até atingir o sistema nervoso central, resultando em meningite ou encefalite. Os sintomas das infecções invasivas

incluem febre alta, dores de cabeça intensas, rigidez no pescoço, alterações no estado mental, convulsões e perda de equilíbrio, afetando especialmente pessoas com sistema imunológico comprometido, idosos, recém-nascidos e grávidas (Allerberger et al., 2010).

Em mulheres grávidas, a listeriose pode ser particularmente perigosa, pois pode levar a abortos espontâneos, nados-mortos, parto prematuro ou infecção grave no recém-nascido. Os sintomas em grávidas podem ser leves e semelhantes aos da gripe, como febre, fadiga e dores musculares (Schwab & Edelweiss, 2003).

1.4 Conservantes Alimentares e o Uso de Óleos Essenciais na Segurança dos alimentos

A conservação dos alimentos é uma prática essencial na indústria alimentar com vista a garantir a segurança dos consumidores e a extensão da vida útil dos produtos (Burt, 2004). Entre os compostos mais utilizados para esse fim, encontram-se os conservantes químicos tradicionais, como os nitritos, nitratos, sorbatos e benzoatos, que atuam inibindo a multiplicação microbiana e prevenindo a deterioração dos alimentos (Hyltdgaard et al, 2012). No entanto, a crescente preocupação com a saúde pública e o aumento da resistência microbiana têm impulsionado a busca por alternativas naturais que ofereçam eficácia semelhante sem os potenciais riscos de saúde associados a alguns conservantes (Burt, 2004; Hyltdgaard et al., 2012).

Nesse contexto, os óleos essenciais emergem como uma promissora alternativa natural para a conservação de alimentos. Os óleos essenciais são compostos voláteis extraídos de plantas, ricos em substâncias bioativas, como terpenos, aldeídos e fenóis, que possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Devido a essas propriedades, têm sido amplamente estudados e aplicados na preservação de alimentos, não apenas para controlar a multiplicação de microrganismos patogénicos, mas também para melhorar a qualidade sensorial e aumentar a vida útil dos produtos alimentares (Burt, 2004).

Para justificar a aplicação do óleo de laranja, é relevante mencionar a utilização de conservantes tradicionais como a nisina. A nisina é uma bacteriocina amplamente utilizada como conservante em produtos lácteos e cárneos, reconhecida por sua eficácia contra uma variedade de bactérias de Gram positivo (Zendo et al., 2010). Contudo, mesmo sendo uma substância de origem natural, sua aplicação é limitada a determinados tipos de alimentos e pode ser ineficaz contra bactérias de Gram negativo e fungos. Assim, a combinação ou substituição parcial da nisina por óleos essenciais como o óleo de laranja pode potencialmente ampliar o espectro de ação antimicrobiana deste péptido antimicrobiano, além de responder à crescente demanda dos consumidores por produtos mais naturais e saudáveis (Pineda-Lozano et al., 2022).

2. Objetivos do estudo

A produção de produtos derivados dos citrinos a nível industrial acarreta uma produção paralela de grandes quantidades de resíduos, com potencial impacto ambiental. Uma forma de mitigar esses impactos é a utilização dos resíduos dessa produção para outros fins, como é o caso do óleo essencial de laranja. Adicionalmente, este óleo já foi investigado pela comunidade científica relativamente à sua ação antimicrobiana, sendo um subproduto mais económico comparativamente a outros óleos essenciais. A aplicação do óleo de laranja, um derivado da casca da laranja e subproduto da indústria de produção de sumo, para outros fins poderá contribuir para a redução do impacto ambiental destas indústrias.

O objetivo deste estudo foi caracterizar bioquimicamente um OE de laranja e avaliar a sua atividade antimicrobiana numa coleção de bactérias de Gram positivo e Gram negativo associadas a doenças de origem alimentar, de forma a avaliar o seu potencial uso na indústria alimentar, com vista a contribuir para a diminuição do impacto ambiental dos sistemas de produção de laranja e seus derivados.

Os objetivos específicos deste trabalho incluíram:

- 1) Análise do OE de laranja por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, de forma a caracterizar bioquimicamente o produto em análise;
- 2) Caracterização do perfil de virulência de uma coleção de bactérias de origem alimentar (n=8);
- 3) Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do OE de laranja, utilizando uma técnica modificada de difusão em disco, relativamente à coleção bacteriana em estudo;
- 4) Determinação da curva de inibição/multiplicação bacteriana, durante 24h de exposição ao OE de laranja, e determinação da concentração mínima inibitória e bactericida do OE relativamente à coleção bacteriana em estudo.

A nisina foi selecionada como controlo positivo para este estudo, por ser um aditivo alimentar (E234) autorizado em mais de 50 países. Além disso, apresenta um largo espectro de ação sobre bactérias de Gram positivo e tolera bem o calor e ambientes ácidos (Zendo et al., 2010; Dosler & Gerceker, 2013; Shin et al., 2015).

3. Materiais e métodos

O OE de laranja doce *Citrus arantium dulcis* utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pela loja Plena Natura ®, situada na área metropolitana de Lisboa, Portugal, (Anexo 1).

3.1 Cromatografia Gasosa com Espectrometria de massa

A composição do óleo essencial de laranja foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando um serviço externo. O óleo essencial foi diluído em metanol (1:10000) e analisado utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrometro de massa (Shimadzu GC-MS QP2010-plus, Kyoto, Japão). A espectrometria de massa foi realizada no modo TIC (Total Ion Count), com intervalo de 35-550 m/z e ionização por impacto eletrônico a 70 eV. Foi utilizada uma coluna capilar Supelcowax10 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent Technologies Inc.), com programação de temperaturas, e hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min. A análise foi realizada com uma temperatura inicial da câmara de aquecimento de 40°C, mantida por 8 minutos; em seguida, a temperatura foi aumentada em 4°C por minuto até 220°C, sendo mantida nessa temperatura durante 65 minutos. A temperatura do injetor foi de 250°C, enquanto a “ion source” e a interface foram mantidas a 220°C. Os dados foram processados com o software LabSolution GCMS version 4.11 SU2, e os compostos foram identificados utilizando a biblioteca NIST2008.

3.2 Coleção bacteriana

Foram utilizados neste estudo 8 isolados bacterianos, pertencentes a 4 espécies diferentes associadas a doença de origem alimentar (Tabela 1). A maioria dos isolados em estudo foram obtidos de coleções internacionais de culturas de microrganismos, a American Type Culture Collection (ATCC) e a Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), sendo por isso descritos como isolados de referência. (ATCC, 2024; CECT, 2024).

Tabela 1: Lista das bactérias utilizadas neste estudo para avaliação do potencial antimicrobiano do óleo essencial de laranja

Isolados	Origem	Serótipo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Estirpe de referência	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Estirpe de referência	
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935	Estirpe de referência	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Suíno	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 443	Estirpe de referência	Typhimurium
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 722	Estirpe de referência	Typhimurium
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 104*	Suíno	4,5,12:i:-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 7162	Estirpe de referência	4,5,12:i:-

*A estirpe de *Salmonella* 104 de suínos, pertencente ao serotipo 4,5,12:i:-, foi previamente caracterizada num estudo sobre a contaminação de carcaças suínas em matadouros portugueses (Cota et al., 2019) e utilizada no presente trabalho. ATCC - American Type Culture Collection; CECT - Colección Española de Cultivos Tipo.

3.3 Caracterização do perfil de virulência da coleção bacteriana em estudo

Os fatores de virulência são moléculas produzidas por microrganismos potencialmente patogénicos que lhes conferem a capacidade de evadir as defesas do hospedeiro e causar doença. Esses fatores incluem toxinas, enzimas, exopolissacarídeos, bem como estruturas de superfície celular, como cápsula, lipopolissacarídeos e proteínas de adesão (Levison, 2020)

A caracterização do perfil de virulência de cada um dos isolados bacterianos da coleção em estudo foi feita recorrendo a meios de cultura específicos para deteção fenotípica da produção de diversas enzimas bacterianas e de biofilme (Fernandes et al., 2022), de modo a compreender o potencial patogénico das bactérias usadas neste estudo e correlacionar essa informação com os resultados da ação do OE de laranja.

Neste ensaio avaliou-se a produção das enzimas lipase, DNase, protease, lecitinase e gelatinase pelas bactérias em estudo, bem como a capacidade de produção de biofilme, de acordo com os protocolos estabelecidos por outros autores (Fernandes et al., 2022).

A avaliação de cada um dos fatores de virulência, em cada uma das bactérias em estudo, foi realizada em triplicado em dias independentes.

3.3.1. Avaliação da produção de Dnase

As bactérias em estudo foram inoculadas por estria na superfície de uma placa de Petri com DNase Agar (Oxoid™) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, os resultados foram revelados utilizando ácido clorídrico (0.01M), sendo que a

formação de um halo claro em volta da zona de multiplicação bacteriana corresponde a um halo de degradação de DNA, e consequentemente a um resultado positivo.

Neste ensaio foi utilizado como controlo positivo o isolado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e como controlo negativo o isolado *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.3.2. Avaliação da Produção de Protease

As bactérias em estudo foram inoculadas na superfície da placa de *Skim Milk Agar*, composto por leite desnatado em pó (VWR™) e agar bacteriológico (VWR™), e incubadas a 37°C por 72 horas. As placas foram observadas a cada 24 horas, sendo que a deteção de um halo transparente em volta das colónias, resultante da atividade proteolítica associada à produção de proteases bacterianas, foi classificada como um resultado positivo.

Neste ensaio foi utilizado como controlo positivo o isolado *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e como controlo negativo o isolado *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

3.3.3. Avaliação da Produção de Lecitinase

As bactérias em estudo foram inoculadas por estria na superfície de uma placa de *Tryptic Soy Agar* (VWR™) suplementado com 10% de gema de ovo estéril, e incubadas a 37°C por 72 horas. As placas foram observadas a cada 24 horas, sendo que a deteção de um precipitado esbranquiçado em volta das colónias, resultante da atividade lecitinolítica associada à produção de lecitinases bacterianas, foi classificada como um resultado positivo.

Neste ensaio foi utilizado como controlo positivo o isolado *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e como controlo negativo o isolado *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.3.4. Avaliação da produção de Gelatinase

As bactérias em estudo foram inoculadas em profundidade, por picada, em estudo em tubos contendo 8 mL de *Nutrient Gelatin* (Oxoid®), sendo posteriormente incubados a 37°C por 48 horas. Após incubação, os tubos foram colocados a 4°C durante 30 minutos. Após esse período, os tubos foram observados, sendo que a liquefação do meio foi considerada como um resultado positivo, correspondente a atividade gelatinolítica devido à produção de gelatinases bacterianas.

Neste ensaio foi utilizado como controlo positivo o isolado *Pseudomonas aeruginosa* Z25.1, isolado a partir de uma úlcera de Pé Diabético e pertencente a uma coleção do Laboratório de Bacteriologia da FMV-ULisboa (Mendes et al., 2012), e como controlo negativo o isolado *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.3.5. Avaliação da produção de Hemolisinas

As bactérias em estudo foram inoculadas na superfície de uma placa de Agar Columbia com 5% sangue de ovelha (BioMérieux™), e incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as placas foram observadas, e os resultados estabelecidos de acordo com o seguinte:

- Hemólise Alfa (α): Produção de Alfa-hemolisinas com potencial para a destruição parcial dos eritrócitos, resultando em uma zona verde-acinzentada ao redor das colônias;
- Hemólise Beta (β): Produção de Beta-hemolisinas com potencial para a destruição completa dos eritrócitos, resultando em uma zona clara ao redor das colônias;
- Hemólise Gama (γ): Sem capacidade de produção de hemolisinas, não se observando destruição dos eritrócitos, e com ausência de mudança na cor do meio ao redor das colônias.

Neste ensaio foi utilizado como controlo positivo o isolado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e como controlo negativo o isolado *Pseudomonas aeruginosa* Z25.1.

3.3.6. Avaliação da produção de Biofilme

As bactérias em estudo foram inoculadas por estria na superfície de uma placa de agar Vermelho Congo, composto por *Brain Heart Infusion* (VWR™), agar Bacteriológico (VWR™), Vermelho Congo 0,08% (Sigma®) e sacarose 5% (Merck™), e incubadas a 37°C por 72 horas. As placas foram observadas a cada 24 horas, sendo que a deteção de colônias pretas foi considerada um resultado positivo, correspondente a isolados com a capacidade de produção de biofilme.

Neste ensaio foi utilizado como controlo positivo o isolado *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, e como controlo negativo o isolado *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do Óleo Essencial de Laranja

Para avaliar a atividade antimicrobiana do OE de laranja relativamente à coleção bacteriana em estudo, utilizou-se um método de difusão em disco modificado (Bauer et al, 1966). Em primeiro lugar, foi preparada uma suspensão bacteriana em NaCl 0,9% para cada isolado em estudo, com um grau de turvação de 0,5 na escala de McFarland, o que equivale a aproximadamente 1 a 2×10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Em seguida, cada suspensão bacteriana foi inoculada à superfície de uma placa de meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) agar com o auxílio de uma zaragatoa estéril, através da técnica de sementeira em tapete, onde posteriormente, 10 microlitros de óleo essencial de laranja foram pipetados para discos de papel de filtro estéreis, e colocados em seguida na superfície das

placas inoculadas com as diferentes suspensões bacterianas (dois discos de OE por placa). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após incubação, as placas foram observadas de forma a identificar a presença de halos de inibição bacteriana ao redor dos discos de papel de filtro. A presença e o diâmetro dos halos de inibição foram registrados, indicando capacidade do OE de laranja em inibir a multiplicação bacteriana. A ausência de halos foi considerada como um resultado negativo, indicando que o óleo essencial não apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias em estudo.

O ensaio foi realizado três vezes, em dias independentes para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

O método de difusão em disco é amplamente utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de substâncias, oferecendo uma forma simples e eficaz de observar o efeito inibitório de potenciais agentes antimicrobianos, como os óleos essenciais. A padronização do inóculo bacteriano e a repetição do teste em réplicas garantem a precisão e a validade dos resultados obtidos (CLSI, 2020).

Nesta etapa também foi avaliado o potencial inibitório do composto DMSO, Dimetilsulfóxido (Sigma), de forma a avaliar a sua potencial utilização como solvente para o OE nas próximas etapas do trabalho experimental. (Gharsallaoui et al., 2016)

Adicionalmente foi incluído como controlo positivo, o péptido antimicrobiano Nisina (1000µg/mL - 2.5% pureza, 1000 IU/mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), composto este largamente utilizado na indústria alimentar como aditivo alimentar (E234) devido à sua atividade antimicrobiana comprovada contra bactérias Gram positivas patogénicas presentes em diversos alimentos. (Cunha et al., 2020; Wu et al., 2023).

O método de difusão em disco foi selecionado para avaliar a inibição microbiana após a realização de ensaios preliminares, como o método spot on lawn e o método de poços. No ensaio spot on lawn, 10 µL de óleo essencial (OE) de laranja foram aplicados diretamente sobre meio de cultura BHI agar previamente inoculado com a bactéria de interesse. No método de poços, um círculo de aproximadamente 1 cm foi removido do meio de cultura BHI agar contendo a bactéria, e 10 µL de OE de laranja foram depositados no poço. Ambos os métodos foram descartados devido à rápida evaporação do OE e à corrosão do plástico das placas de Petri. Dada a dificuldade em manter o OE em contato com o meio por tempo suficiente para observar sua ação antimicrobiana, o método de difusão em disco foi considerado mais adequado, pois minimiza a evaporação do óleo, permitindo uma exposição prolongada e mais eficaz do composto.

3.5 Determinação da curva de inibição/multiplicação bacteriana e da Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial de laranja relativamente à coleção bacteriana em estudo

Neste ensaio foram utilizadas apenas as bactérias relativamente às quais o OE de laranja apresentou atividade antimicrobiana. Assim, para determinação da curva de inibição/multiplicação bacteriana e da Concentração Mínima Inibitória recorreu-se a um método de microdiluição em placa de 96 poços, com diluições seriadas do OE de laranja e suspensões bacterianas das bactérias em estudo, incubadas durante 24 horas a 37°C, seguindo-se de medições, de hora a hora, da densidade ótica (DO) a 600 nm (Jiang et al., 2011; Lourinho, 2021 & Probst, 2012).

A concentração mínima inibitória (CMI) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de impedir a multiplicação visível de um microrganismo (Wiegand et al, 2008). Contudo, devido à interferência da coloração normal do OE de laranja na avaliação visual da multiplicação bacteriana, foi utilizado um leitor de Densidade ótica (DO) no comprimento de onda de 600 nm para a avaliação da CMI. A CMI foi determinada comparando cada valor de DO (600nm) dos poços teste (contendo suspensão bacteriana e as diferentes concentrações do OE de laranja), com o respetivo controlo positivo (apenas suspensão bacteriana) ao fim de 24 horas de incubação. Os valores de DO dos poços teste foram avaliados após remoção do valor de DO correspondente ao OE de laranja sem a suspensão bacteriana, eliminando assim a interferência da coloração normal do OE de laranja. A CMI foi definida como a concentração de OE de laranja capaz de uma inibição bacteriana superior a 90%, quando comparado com o controlo positivo (só suspensão bacteriana) (Lourinho, 2021 & Probst, 2012).

Para este ensaio as bactérias em estudo foram propagadas em placas de BHI agar durante 24 horas a 37°C. Posteriormente foi realizada uma suspensão bacteriana em solução de NaCl 0,9% estéril, com um grau de turvação de 0,5 na escala de Macfarland (correspondente a 1 a 2×10^8 UFC/mL). De seguida, a suspensão foi diluída de 1:100 em meio de cultura BHI líquido, de forma a obter-se uma suspensão bacteriana com uma concentração de 10^6 UFC/mL, que foi aplicada nas microplacas de 96 poços.

Os poços das microplacas foram inicialmente preenchidos com 50 µL de OE de laranja diluído de forma seriada em DMSO, na proporção de 1:2 – 1:4 – 1:8 – 1:16 – 1:32 – 1:64 – 1:128. Apresentando uma concentração (V/V) de 500 µL/mL (OE inicial), seguindo se as diluições seriadas de 250 µL/mL – 125 µL/mL – 62,5 µL/mL – 31,2 µL/mL – 15,6 µL/mL – 7,8 µL/mL, respectivamente. Em seguida, foram preenchidas com 150 µL da suspensão bacteriana em estudo.

Em cada placa foram incluídos vários controlos, nomeadamente: um controlo positivo, correspondente a um poço contendo apenas a suspensão bacteriana, e servindo de comparação para avaliação da CMI; um controlo negativo, correspondente a um poço contendo apenas o meio de cultura, para avaliar a validade e esterilidade da técnica; um controlo negativo do solvente, correspondente a um poço com DMSO e meio de cultura BHI líquido; e um controlo positivo do solvente, correspondente a um poço contendo DMSO, solução bacteriana e meio BHI líquido.

Adicionalmente, foi incluído um controlo positivo de atividade antimicrobiana correspondente ao péptido antimicrobiano Nisina A (1000 µg/mL), bem como um conjunto de controlos do OE, correspondentes a poços que continham OE nas diversas diluições (com DMSO) e meio de cultura BHI líquido, e que foi utilizado como “branco” na avaliação da CMI.

O ensaio foi realizado em triplicado em dias independentes, cada um dos quais incluindo 3 replicas biológicas por condição testada no ensaio nas proporções vistas na Tabela 2.

Tabela 2: Esquema das diluições e análises realizadas nos ensaios em microplacas de 96 poços.

	C-	C-	Em diluições seriadas	C+	C-	C+
1	200µl BHI	150 µl BHI + 50µl OEL	50µl DMSO + 50µl OEL + 150µl S.B	200µl S.B	50µl DMSO + 150µl BHI	50µl DMSO + 150µl S.B
2	200µl BHI	151 µl BHI + 50µl OEL	50µl DMSO + 50µl OEL + 150µl S.B	200µl S.B	50µl Nisina + 150µl BHI	50µl Nisina + 150µl S.B
3	200µl BHI	152 µl BHI + 50µl OEL	50µl DMSO + 50µl OEL + 150µl S.B	200µl S.B		
			50µl DMSO com OEL + 150µl BHI			

Legenda: +: positivo; -: negativo; BHI: *Brain Heart infusion* líquido; DMSO: dimetilsulfóxido; OEL: óleo essencial de laranja; S.B.: suspensão bacteriana

Na Figura 7, é possível observar o esquema utilizado na microplaca de 96 poços para determinação da CMI. Especificamente: em verde, na coluna 1, o controlo negativo do meio de cultura BHI líquido; em roxo, na coluna 2, o controlo de cor do BHI líquido com o OE de laranja; em amarelo nas colunas de 3 a 9 as diluições seriadas do OE de laranja, na coluna de 3 a 9, em azul na linha D e H, o BHI com DMSO e a respectiva diluição em cada poço sequencial do OE de laranja (usado como branco para determinar a real absorbância das diluições do OE em solução bacteriana); na coluna 10, em rosa, o controlo positivo contendo a solução bacteriana do microrganismo analisado; na coluna 11, em azul, o controlo negativo

do DMSO e Nisina, respectivamente; e na coluna 12, em rosa, o controle positivo para DMSO e Nisina, respectivamente.

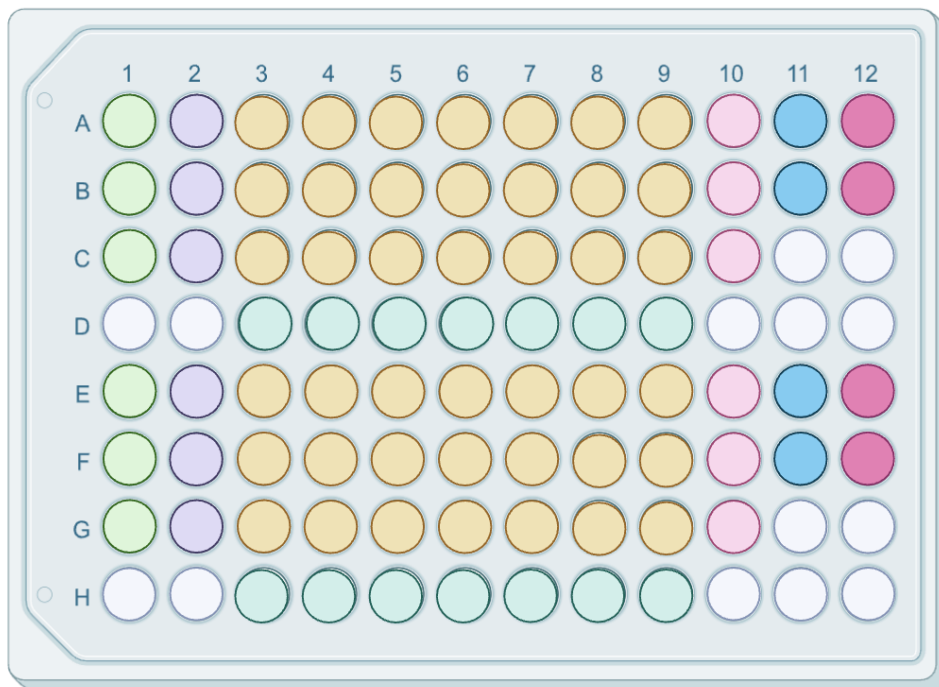


Figura 7: Representação em cores dos poços da microplaca contendo a descrição para a análise. (Original do autor, criado no Biorender – <http://www.biorender.com>)

Cada placa foi incubada durante 24 horas a 37°C recorrendo ao leitor de placas (BMG Labtech, FLUOstar OPTIMA), tendo sido medida a densidade ótica a cada hora, de forma a permitir construir um gráfico de inibição/multiplicação bacteriana e avaliar a CMI ao fim de 24h de incubação.

3.6 Determinação da Concentração Mínima Bactericida do óleo essencial de laranja relativamente à coleção bacteriana em estudo

A Concentração Mínima Bactericida (CMB) do OE de Laranja relativamente à coleção bacteriana em estudo foi determinada após determinação da Concentração Mínima Inibitória (Jiang et al., 2011). Assim no final das 24h de incubação e determinação da CMI, foram recolhidos 5 microlitros de cada poço teste, com as várias diluições do OE de laranja e a suspensão bacteriana, e posteriormente inoculados na superfície de placas de BHI agar. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e após esse período, as placas foram inspecionadas visualmente para avaliar a presença ou ausência de multiplicação bacteriana. A CMB foi considerada como a menor concentração de óleo essencial de laranja que resultou

na ausência total de multiplicação bacteriana nas placas de BHI agar. Todos os testes foram realizados em triplicado para garantir a reprodutibilidade e a precisão dos resultados, em dias independentes e com 3 replicas biológicas por condição testada, seguindo o mesmo princípio referido na determinação da CMI.

4. Resultados e Discussão

Nesta secção, serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos ao longo deste estudo nomeadamente a avaliação da composição do óleo essencial de laranja por cromatografia gasosa e espectrometria de massa; a caracterização do perfil de virulência da coleção bacteriana em estudo; e os resultados da análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial de laranja obtidos a partir dos testes de difusão em disco, da determinação da Concentração Mínima Inibitória e da Concentração Mínima Bactericida. Estes dados serão analisados à luz de estudos anteriores e comparados com a literatura existente. A discussão irá focar-se nas tendências observadas, nas possíveis explicações para as variações nos resultados, e na relevância destes resultados para o campo de estudo destacando a contribuição deste trabalho para investigações futuras de óleos essenciais na Indústria Alimentar.

4.1 Composição do óleo essencial de laranja determinada por Cromatografia Gasosa e espectrometria de massa

A técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) foi utilizada para identificar e quantificar os componentes voláteis presentes no óleo essencial de laranja. A cromatografia gasosa permitiu a separação dos compostos com base nos seus tempos de retenção, enquanto que a espectrometria de massa foi responsável pela identificação dos constituintes separados, através da comparação dos espectros de massa obtidos com bibliotecas de espectros e padrões conhecidos (Adams, 2007). Esse método combinou a alta eficiência de separação da cromatografia gasosa com a precisão da espectrometria de massas, possibilitando a caracterização detalhada dos compostos presentes no óleo essencial. Na Figura 8 é apresentado o cromatograma obtido, onde os picos representam os diferentes compostos voláteis separados ao longo do tempo.

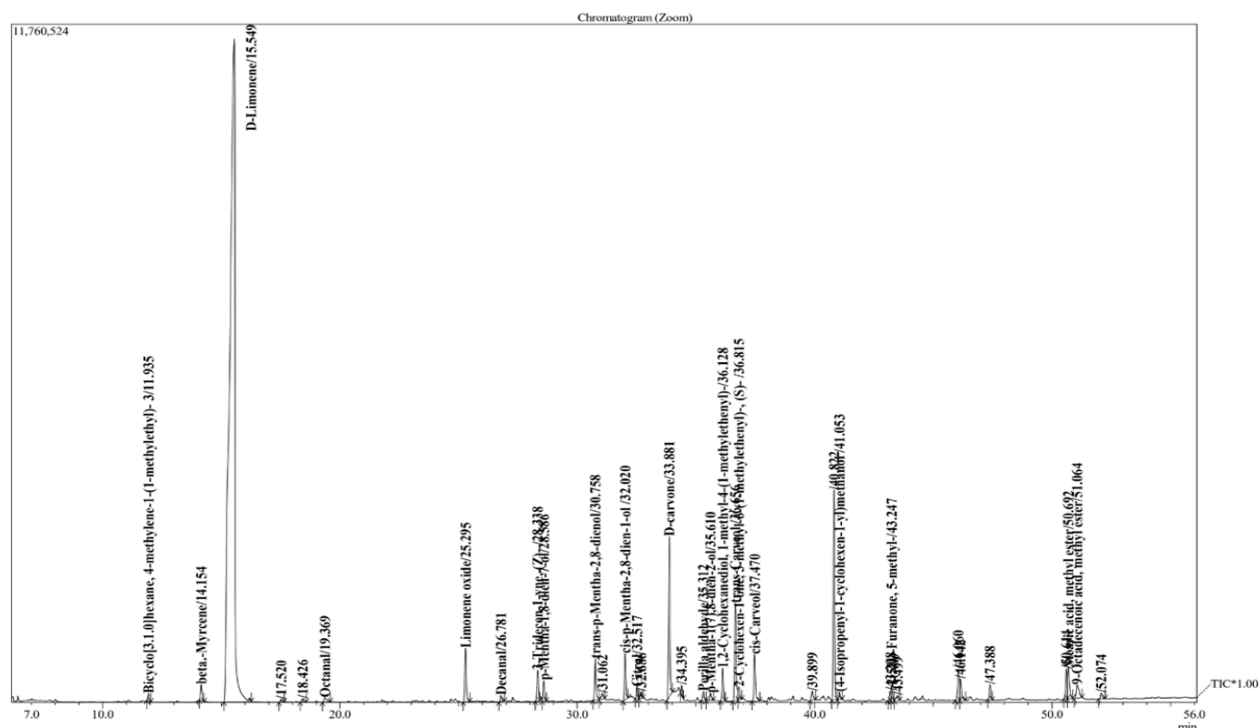


Figura 8: Cromatograma representativo da composição do óleo essencial de laranja determinada por Cromatografia Gasosa.

O interesse em avaliar os constituintes do óleo essencial analisado reside na importância de determinar o seu perfil bioquímico, com ênfase na quantificação do Limoneno, o principal monoterpene com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes, como relatado por Ravichandran et al. (2018) e Suh et al. (2017). Esses estudos destacam o papel do Limoneno como uma componente chave na ação antimicrobiana. De acordo com Aazza et al. (2011), os óleos essenciais de laranja geralmente contêm entre 90% e 95% de Limoneno na sua constituição, contudo Mahato et al. (2019) menciona que os valores podem variar de 32% a 95%.

O óleo essencial estudado apresenta uma concentração de 69% de Limoneno, sendo um percentual dentro dos valores esperáveis segundo Mahato et al. (2019) e os principais componentes identificados no óleo essencial de laranja estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição dos constituintes, em percentagem, identificados no óleo essencial de laranja pelo método de Cromatografia Gasosa

Composto	Percentagem (%)
Biciclo[3.1.0]hexano, 4-metileno-1-(1-metiletil)-3	0,22
3 beta-Mirceno	0,50
D-Limoneno	69,08
Octanal	0,23
Óxido de limoneno	1,53
Decanal	0,19
3-Tridecen-1-ino, (Z)-	1,00
p-Menta-1,8-dien-7-ol	0,58
trans-p-Menta-2,8-dienol	1,20
cis-p-Menta-2,8-dien-1-ol	1,27
Citral	0,30
D-carvona	4,74
Aldeído de perila	0,27
p-Menta-1(7),8-dien-2-ol	0,23
1,2-Ciclohexanodiol, 1-metil-4-(1-metiletenil)	0,84
trans-Carveol	2,88
2-Cicloexen-1-ona, 3-metil-6-(1-metiletenil)-, (S)	0,37
cis-Carveol	1,41
(4-Isopropenil-1-cicloexen-1-il)metanol	0,21
2(5H)-Furanona, 5-metil	0,44

Com base neste resultado, pode-se especular que a sua atividade antimicrobiana poderá ser inferior a óleos com concentrações mais elevadas de Limoneno. Para confirmar essa hipótese, seria necessário realizar um estudo comparativo envolvendo óleos essenciais de laranja da mesma variedade, porém com diferentes percentagens de Limoneno, a fim de avaliar o impacto direto dessa variação na ação antimicrobiana.

Outros dois componentes que aparecem em percentagem relevante para serem abordados e que podem atuar em sinergismo com o Limoneno são O D-carvone e o trans-carveol, que são compostos presentes no óleo essencial de laranja que possuem diversas propriedades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana e aromática. O D-carvone é um monoterpene cetona amplamente encontrado em óleos essenciais de várias plantas, sendo conhecido pelas suas atividades antimicrobiana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória. Estudos demonstram que o D-carvone pode atuar na membrana celular bacteriana, causando alterações estruturais que levam à morte das células. (Bouyahya et al., 2021).

Já o trans-carveol, um álcool monoterpénico, também tem sido associado a propriedades antimicrobianas, especialmente contra bactérias Gram-positivas, apresentando capacidade de danificar a integridade da membrana celular desses microorganismos. Ambos os compostos, D-carvone e trans-carveol, são investigados como potenciais agentes naturais para a conservação de alimentos, sendo também utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos (Berthold-Pluta et al., 2019).

Em comparação com Ambrosio et al. (2021), o valor encontrado nesta qualificação do OE de laranja foi maior do que os valores encontrados no seu trabalho, ambos não chegaram a 1% do valor total dos constituintes encontrados. O que pode indicar uma mais valia no potencial antimicrobiano do OE de laranja em estudo.

4.2 Perfil de virulência das bactérias do estudo

Relativamente à caracterização do perfil de virulência fenotípico da coleção bacteriana em estudo, os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Fatores de virulência produzidos pelas bactérias em estudo, detectados através de métodos fenotípicos

Resultados dos fatores de virulência	
Bactérias	Fatores de virulência detetados
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Alfa hemólise
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Dnase - Gelatinase - Beta hemólise - Biofilme
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935	Gama hemólise
<i>Listeria monocytogenes</i> de Suíno	Dnase - Alfa hemólise
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 443	Alfa hemólise
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 722	Dnase - Alfa hemólise
<i>Salmonella enterica</i> subsp, <i>enterica</i> 104	Alfa hemólise
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 7162	Alfa hemólise

Considerando o descrito por Leitão(2020) a DNase é uma enzima que degrada o DNA extracelular, ajudando as bactérias a escapar das armadilhas extracelulares de

neutrófilos, facilitando a disseminação da infecção; as hemolisinas são toxinas que causam a lise das hemácias permitindo que as bactérias obtenham nutrientes essenciais como o ferro; a protease é uma enzima que degrada proteínas, inativando as defesas do hospedeiro, como anticorpos, e promovendo a invasão tecidual; a lecitinase é capaz de destruir a membrana celular, principalmente ao degradar fosfolípidios, contribuindo para a necrose tecidual; a gelatinase degrada o colágeno, facilitando a invasão tecidual e a colonização; e o biofilme é uma estrutura complexa formada por comunidades bacterianas protegidas por uma matriz extracelular, que conferem uma maior resistência a antibióticos bem como à resposta imune do hospedeiro, além de outras vantagens de sobrevivência aos microrganismos que participam nestas comunidades.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 apresentou múltiplos fatores de virulência, incluindo a capacidade de produzir DNase, gelatinase, beta-hemólise e formação de biofilme.

O serotipo de *Listeria monocytogenes* CECT 935 não apresentou a capacidade de produzir nenhum dos fatores de virulência pesquisados. Na pesquisa de hemolisinas ele foi caracterizado como gama-hemólise por não ser capaz de lisar as hemácias do meio de cultura.

O serotipo de *Listeria monocytogenes* de suíno e o serotipo da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 722 possuem dois fatores de virulência, Dnase e Alfa-hemólise.

No caso da *Salmonella enterica* CECT 443, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 104, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 7162 e *Escherichia coli* ATCC 25922, foi possível observar apenas alfa-hemólise como fator de virulência.

No estudo de Vázquez-Boland et al. (2001) é apontado que a alfa-hemólise é um fator importante de virulência, pois a lise parcial das hemácias permite que a bactéria aceda a nutrientes essenciais, como o ferro, auxiliando na sobrevivência e disseminação no hospedeiro. No entanto, em um estudo de Zhu et al. (2005), foi relatado que certas estirpes de *Listeria* podem apresentar variação na expressão de fatores de virulência, sendo que algumas não exibem hemolisinas ativas, o que coincide com os resultados obtidos na estirpe CECT 935, que foi caracterizada como gama-hemólise.

Em relação à *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 722, é importante destacar que a presença de DNase e alfa-hemólise, identificado neste estudo, sugere uma capacidade elevada de invasão tecidual e evasão do sistema imune segundo o estudo de Leitão (2020), pois o mesmo menciona que a DNase desempenha um papel crucial na fuga das armadilhas extracelulares dos neutrófilos, enquanto que as hemolisinas facilitam o acesso a nutrientes essenciais. Já o estudo de O’Gara (2007), destacou que a capacidade de produzir alfa-hemolisinas é comum em diferentes serotipos de *Salmonella* e está frequentemente associada a infecções mais invasivas.

A ausência de outros fatores de virulência, como proteases ou formação de biofilme, em serotipos de *Listeria* e *Salmonella* pode ser explicada pela diversidade genética dessas bactérias, como apontado em estudos de Rocourt et al. (2003). Em contrapartida, a alta capacidade de virulência observada em *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 — pela presença de DNase, gelatinase, beta-hemólise e biofilme — reforça a variabilidade de mecanismos utilizados por diferentes microorganismos patogênicos para sobreviverem em ambientes adversos e resistirem aos tratamentos antimicrobianos.

Os resultados que indicam a presença de fatores de virulência em microrganismos isolados de alimentos reforçam a importância de medidas rigorosas de controle sanitário em toda a cadeia de produção. Estudos mostram que regulamentações como o HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) são fundamentais para minimizar a contaminação por microorganismos patogênicos com potencial virulento. A detecção de serotipos patogênicos com fatores de virulência, justifica a implementação de protocolos mais rigorosos de higienização e monitoramento de alimentos, especialmente em ambientes de alto risco, como carnes cruas e outros produtos de origem animal. Essas medidas são essenciais para evitar surtos de doenças transmitidas por alimentos e garantir a segurança do consumidor (Awuchi, 2023).

Na Figura 9, é possível observar controle negativo para gelatinase (A), gelatinase positiva para *S. aureus* ATCC 25923 (B) e controle positivo (C). Os demais tubos da figura mostram que todas as outras bactérias deste estudo não foram capazes de degradar a gelatina, não possuindo gelatinase.

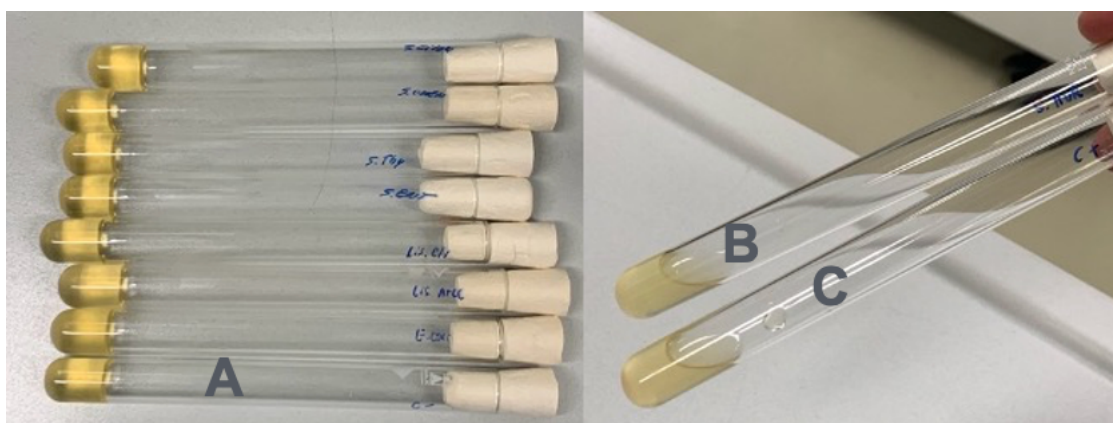


Figura 9: Análise para detecção da capacidade de produção de gelatinase em tubo. A – Controle negativo; B – Resultado Positivo por *S. aureus* ATCC 25923; C – controle positivo.

Na Figura 10 são apresentados os resultados obtidos no teste de avaliação de produção de Dnase, sendo que as bactérias com capacidade de produzir Dnase apresentam

um halo transparente à sua volta como mostra o controlo positivo (A) e bactérias que não possuem este fator de virulência não apresentam halo, como mostra o controlo negativo (B). O *S. aureus* (C) apresenta capacidade de produzir Dnase, assim como a *Salmonella enterica subsp. enterica* CECT 722 (D).

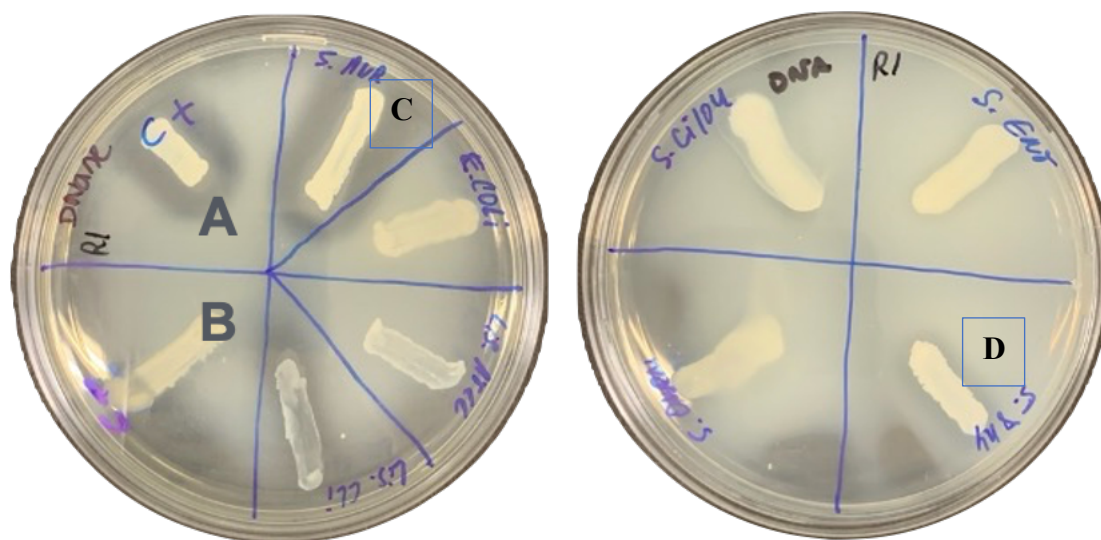


Figura 10: Ensaio para determinar a capacidade de produzir Dnase pelas bactérias em estudo. A – controlo positivo; B – controlo negativo; C – Resultado positivo de *S. aureus* ATCC 25922; D – Resultado positivo de *S. enterica subsp. enterica* CECT 722 .

Na Figura 11, pode-se observar-se os tipos de hemólise que foram detetados neste estudo em relação às bactérias em estudo. Foi verificada uma ausência de hemólise no controlo negativo (A) e na *Listeria monocytogenes* CECT 935 (E). Alfa-hemólise em todos os serotipos de *Salmonella* analisadas (G), *Escherichia coli* ATCC 25922 (D) e *Listeria monocytogenes* de Suíno (F). Por outro lado foi detetada beta hemólise no controlo positivo (B) e em *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (C).



Figura 11: Representação dos tipos de hemólise observadas neste estudo pela colecção bacteriana em estudo. A – controlo negativo; B – controlo positivo; C – *S. aureus* ATCC 25923; D – *E. coli* ATCC 25922; E – *L. monocytogenes* CECT 935 ;F- *L. monocytogenes* de Suíno

Na Figura 12 é possível observar colónias pretas representando bactérias formadoras de Biofilmes no *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A) e no controlo positivo (B). O controlo negativo (C) e as restantes bactérias de estudo (D) foram negativas para a produção de biofilme.

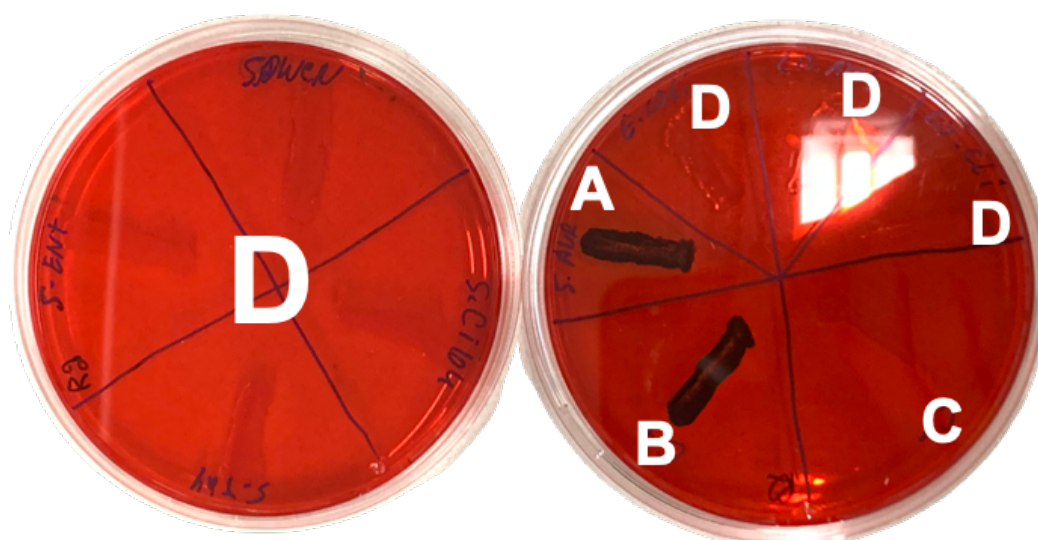


Figura 12: Resultados da deteção de produção de biofilme pela colecção bacteriana em estudo. A – *S. aureus* ATCC 25923; B- controlo positivo; C – controlo negativo; D – restantes isolados em estudo.

Na Figura 13, é possível observar a capacidade de produção de protease pelo controlo positivo, verificando-se um halo transparente em redor da bactéria (A), as restantes bacterias não foram capazes de produzir protease, apresentando ausência de halo tal como verificado no controlo negativo (B).

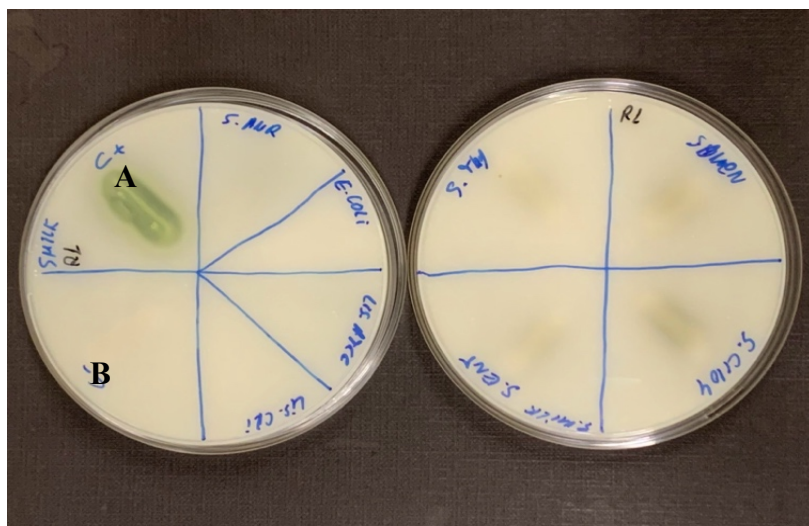


Figura 13: Resultados da deteção de produção de Protease pela colecção bacteriana em estudo. A – controlo positivo; B – controlo negativo.

Adicionalmente, pode-se observar na Figura 14 o resultado da avaliação da capacidade de produção de lecitinase pela colecção bacteriana em estudo, verificando-se que nenhuma bactéria foi capaz de produzir esta enzima.

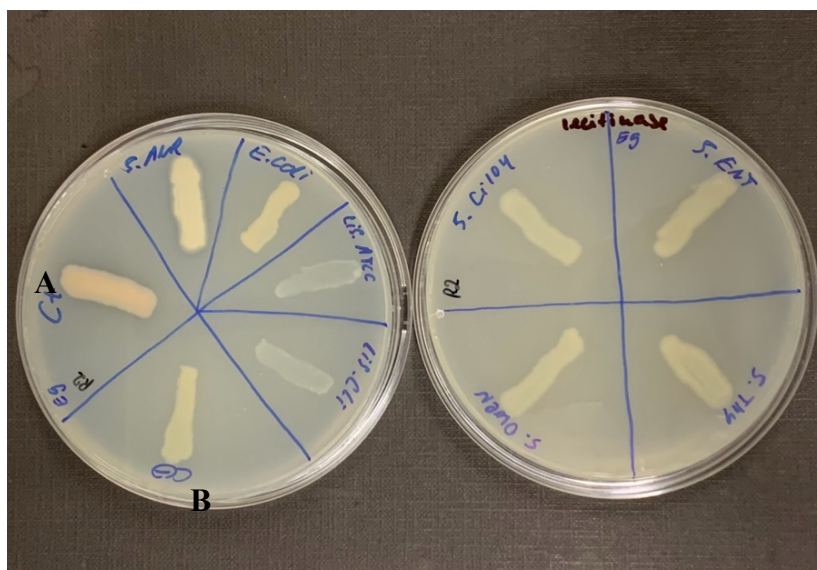


Figura 14: Resultados da deteção de produção de Lecitinase pela colecção bacteriana em estudo. A – controlo positivo; B – controlo negativo.

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do Óleo Essencial de Laranja: Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de laranja relativamente à coleção bacteriana em estudo foi avaliada através da detecção de formação de halos de inibição ao redor de discos impregnados com o óleo essencial de laranja, após incubação a 37°C durante 24 horas.

Os halos de inibição foram medidos em milímetros (mm) e representam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de laranja contra as bactérias estudadas. Os resultados estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5: Diâmetro dos halos de inibição (mm) promovidos pelo óleo essencial de laranja relativamente à coleção bacteriana em estudo.

Resultados da inibição da multiplicação bacteriana	
Bactérias	Diâmetro do halo de inibição (mm) $\pm$ DP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	06mm $\pm$ 0,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12mm $\pm$ 5,13
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935	10mm $\pm$ 0,0
<i>Listeria monocytogenes</i> de Suíno	10mm $\pm$ 0,0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 443	11mm $\pm$ 2,52
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 722	06mm $\pm$ 0,0
<i>Salmonella enterica</i> subtp. <i>enterica</i> 104	06mm $\pm$ 0,0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 7162	06mm $\pm$ 0,0

Legenda: DP= Desvio padrão

Conforme observado, o óleo essencial de laranja apresentou atividade antibacteriana contra as diferentes estirpes testadas. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi a bactéria mais susceptível ao óleo essencial, apresentando um halo de inibição de 12.0 $\pm$ 5,1mm, seguido por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 443, com um halo de inibição de 11.0 $\pm$ 2,6mm, e *Listeria monocytogenes* CECT 935 e *Listeria monocytogenes* de Suíno com halos de inibição de 10.0 $\pm$ 0,0mm, respectivamente.

Os isolados *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 722, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 104 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 7162 não exibiram halos de inibição, indicando que o OE de laranja não apresenta atividade antimicrobiana contra estas estirpes.

Com estes resultados é possível verificar que a ação do OE de laranja é mais eficaz relativamente ao grupo de bactérias Gram-positivas analisado, assim como já reportado por

Calo (2015), onde mencionou que os óleos essenciais tem demonstrado mais atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas tais como: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*. Esta atividade parece estar relacionada com a interação direta entre as membranas das células bacterianas e os componentes hidrofóbicos dos óleos, incluindo os terpenos e monoterpenos por exemplo, encontrados em grande concentração em óleos cítricos. Esta interação seria responsável por danos na membrana celular, resultando em morte celular do microorganismo.

A metodologia realizada para a avaliação preliminar da actividade antimicrobiana do OE de laranja foi seleccionada após testagem de vários métodos, como apresentado na figura 15, tendo-se verificado que o teste de difusão em disco seria o teste mais eficaz nesta avaliação preliminar. A figura 15, abaixo, tem como objetivo ilustrar como foram realizados os testes preliminares e a presença de inibição da multiplicação bacteriana. Os círculos pretos demonstram o diâmetro dos halos de inibição pelo método de disco em difusão impregnado com o OE de laranja (A). O halo marcado como B mostra a técnica de difusão a partir de um poço, onde se retira menos de 1 cm do agar e se aplica o OE de laranja, contudo verificou-se que o OE de laranja degradava parcialmente o plástico da placa. Por outro lado, a zona identificada com C, apresenta a técnica de *spot on lawn*, onde o OE de laranja volatiliza rapidamente após a colocação na superfície do agar, não sendo possível avaliar a sua actividade antimicrobiana.

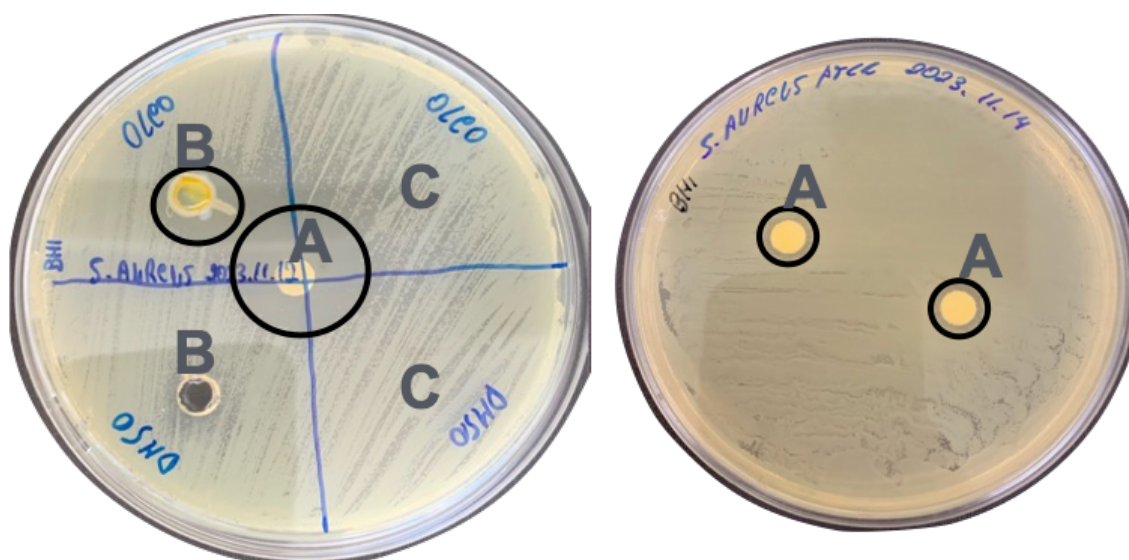


Figura 15: Testes preliminares de inibição bacteriana pelo OE de laranja.

4.4 Concentrações Mínimas Inibitórias do óleo essencial de laranja relativamente às bactérias em estudo

Para a determinação da CMI, as placas de 96 poços foram incubadas por um período de 24 horas, a 37°C, até a sua leitura final de absorbância, sobre a qual foi calculado se houve multiplicação bacteriana ou inibição nos diferentes poços testes, que continham a suspensão bacteriana e a concentração de OE de laranja. Assim os resultados de CMI determinados correspondem à concentração mais baixa de OE de laranja que foi capaz de inibir em mais de 90% a multiplicação bacteriana, quando comparado com o respectivo controlo positivo (apenas suspensão bacteriana). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados da Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial de laranja relativamente às bactérias de estudo.

Bactérias	Concentração Mínima Inibitória	Diluição
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8 µL/mL	1:128
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935	125 µL/mL	1:8
<i>Listeria monocytogenes</i> de Suíno	125 µL/mL	1:8
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 443	63 µL/mL	1:16

Além do OE de laranja, foi também incluído como controlo neste ensaio o péptido antimicrobiano Nisina, verificando-se que este péptido não conseguiu inibir a multiplicação bacteriana da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 443, mas conseguiu inibir a multiplicação bacteriana do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, da *Listeria monocytogenes* CECT 935 e da *Listeria monocytogenes* de Suíno. Este resultado era esperado, visto que é descrito por vários autores que a Nisina apresenta atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas, incluindo microorganismos patogénicos de origem alimentar e bactérias associadas a deterioração de alimentos (Field et al., 2023 & Gharsallaoui et al., 2016). A ação antimicrobiana da nisina ocorre principalmente por meio da formação de poros na membrana citoplasmática das células bacterianas e pela inibição da síntese de peptidoglicano, componente essencial da parede celular bacteriana. Além disso, a nisina também inibe a formação de esporos bacterianos, contribuindo para a sua ampla eficácia contra diversas espécies bacterianas (Montville et al., 2006). Contudo, deve-se realçar que a nisina não é uma escolha viável contra bactérias Gram-negativas, pois estas apresentam uma

membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS) que impede a penetração da nisina na célula bacteriana, impedindo a sua acção antimicrobiana (Breukink et al., 1999; Montville et al., 2006).

Nos poços correspondentes aos controlos positivos de DMSO não se observou inibição da multiplicação bacteriana. Este controlo, foi aplicado de forma a verificar se o DMSO poderia promover a inibição da multiplicação bacteriana mascarando o real efeito do OE de laranja. Este resultado está em concordância com os trabalhos realizados por Lourinho (2021), que também utilizou o DMSO na avaliação da actividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (Lourinho, 2021).

É possível concluir que neste estudo, o OE de laranja na menor concentração estudada, 8 µL/mL, foi capaz de inibir a multiplicação do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, demonstrando assim um resultado muito promissor na inibição desta espécie bacteriana importante na Indústria Alimentar e também na saúde humana e animal.. De facto *Staphylococcus aureus* está amplamente relacionado com contaminação alimentar muitas vezes relacionado com falta de higiene durante o processamento de alimentos. Este agente patogénico é frequentemente encontrado na pele, nariz e garganta de seres humanos, sendo um microrganismo comensal. Assim, este agente pode ser transferido para os alimentos através de práticas inadequadas de higiene, como uma ineficiente lavagem das mãos ou manipulação de alimentos sem os devidos cuidados, pelos operadores da indústria alimentar. A contaminação pode ocorrer através de tosse, espirros, cortes infectados ou toque em superfícies contaminadas (Alves et al. 2021).

Em ambas as estirpes de *Listeria* (*Listeria monocytogenes* CECT 935 e *Listeria monocytogenes* de Suíno) foi possível observar que o OE de laranja apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 125 µL/mL e a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 443, inibição na concentração de 63 µL/mL.

Nos gráficos 1, 2, 3 e 4 apresentados abaixo é possível observar a dinâmica da multiplicação bacteriana, ao longo das 24h de incubação, dos isolados em estudo no valor de densidade ótica (OD) medida a 600nm (OD600).

Gráfico 1: Curva de crescimento do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 durante um período de 24 horas de incubação, incluindo o controlo positivo (apenas suspensão bacteriana) e na presença das diferentes concentrações do OE de Laranja.

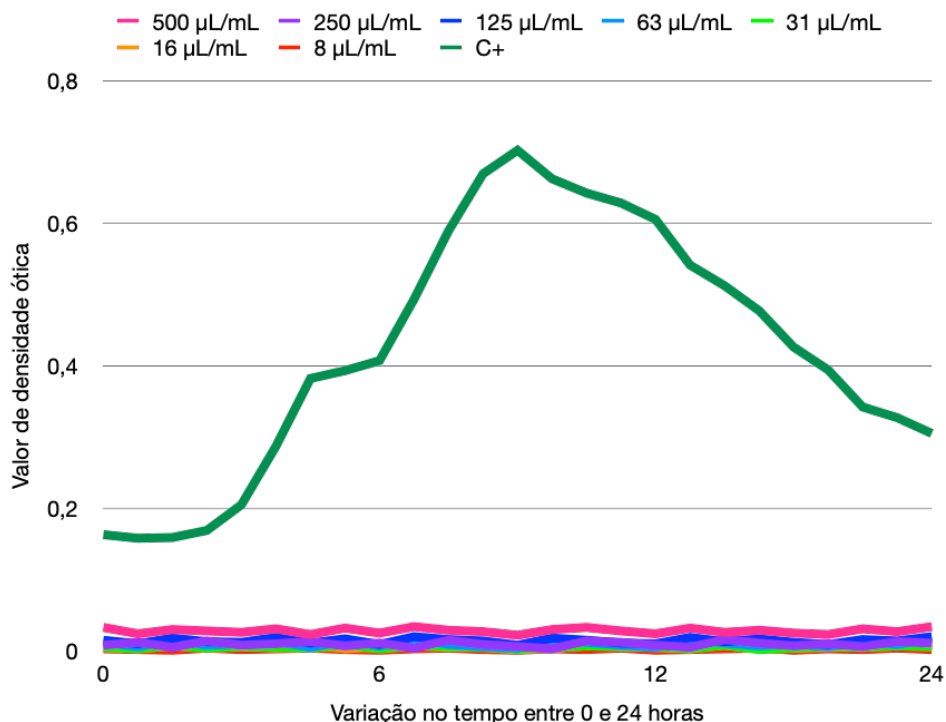


Gráfico 2: Curva de crescimento da *Listeria monocytogenes* CECT 935 durante um período de 24 horas de incubação, incluindo o controlo positivo (apenas suspensão bacteriana) e na presença das diferentes concentrações do OE de Laranja.

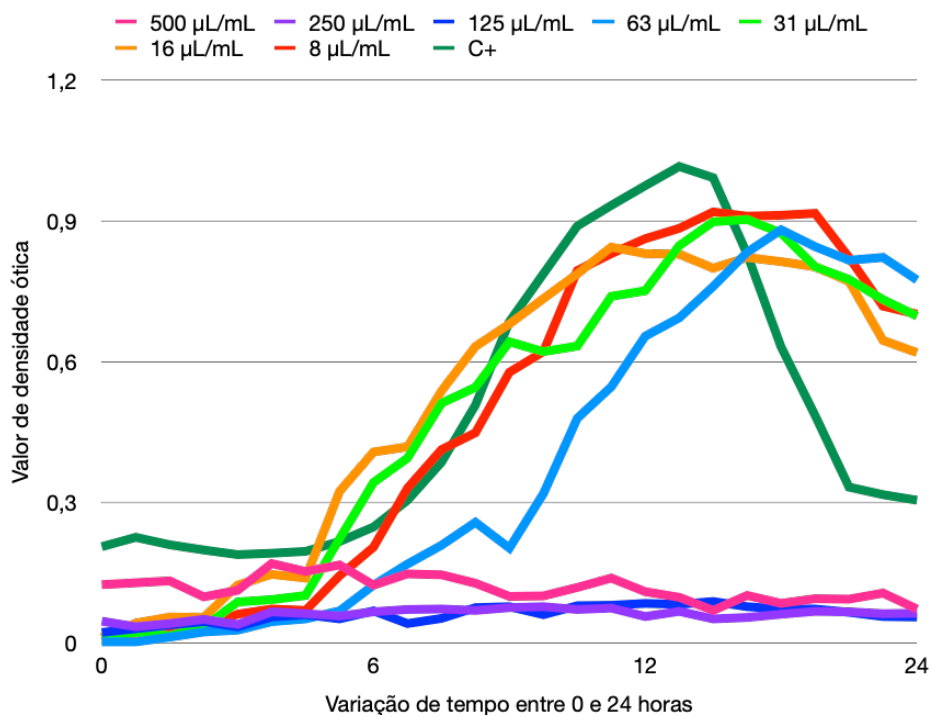


Gráfico 3: Curva de crescimento da *Listeria monocytogenes* de Suíno durante um período de 24 horas de incubação, incluindo o controlo positivo (apenas suspensão bacteriana) e na presença das diferentes concentrações do OE de Laranja.

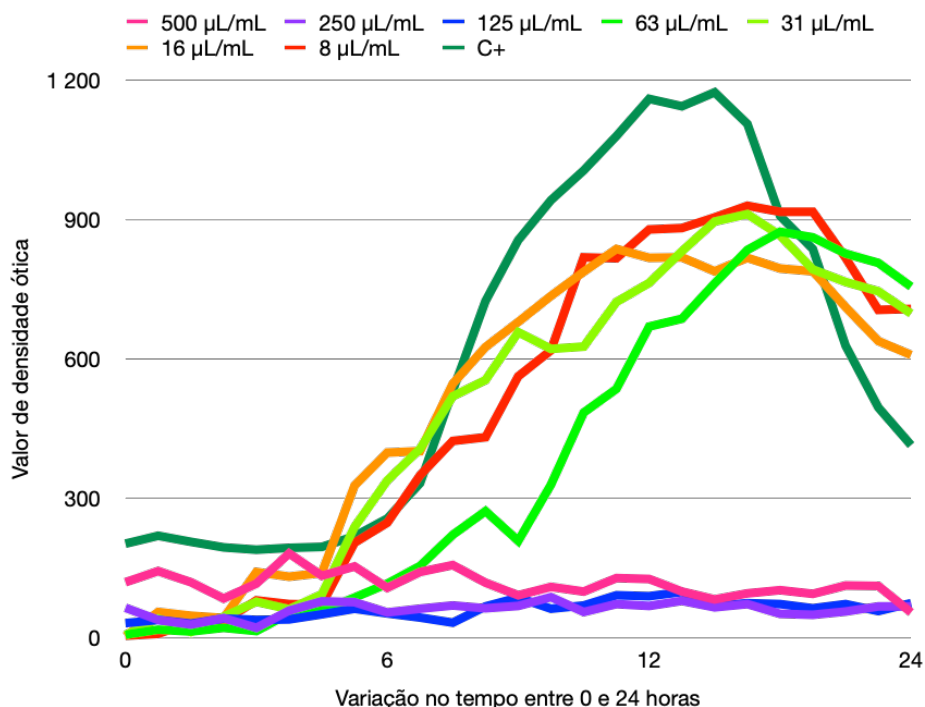
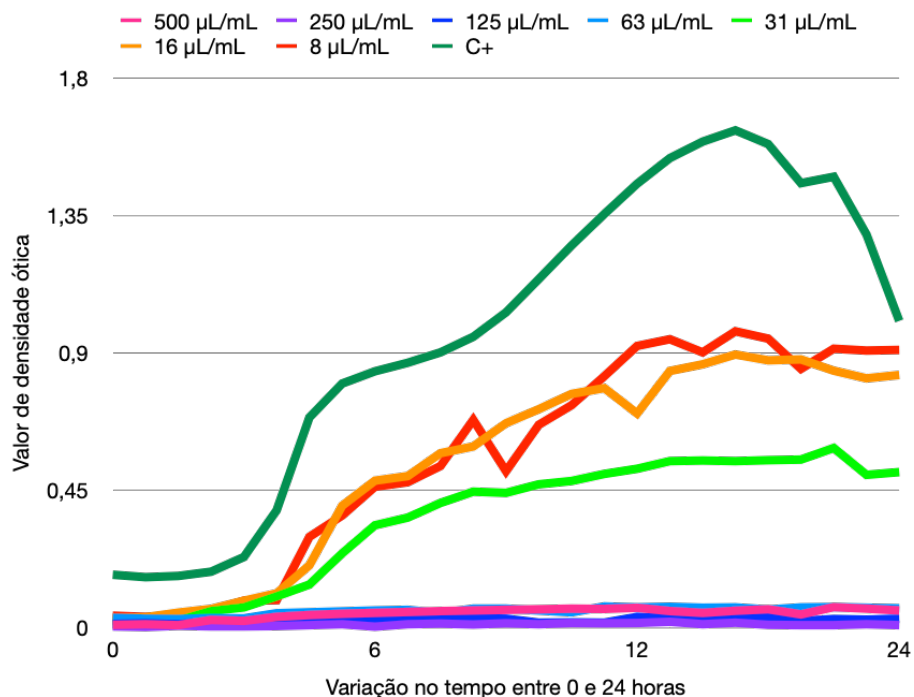


Gráfico 4: Curva de crescimento da *Salmonella enterica subsp. enterica* CECT 443 durante um período de 24 horas de incubação, incluindo o controlo positivo (apenas suspensão bacteriana) e na presença das diferentes concentrações do OE de Laranja.



4.5 Concentrações Mínimas Bactericidas do óleo essencial de laranja relativamente às bactérias de estudo

Após a determinação da CMI, as microplacas de 96 poços, que continham nos poços teste as suspensões bacterianas das bactérias em estudo com as várias concentrações de OE de laranja, foram submetidos a avaliação para determinação da concentração mínima bactericida (CMB). Assim foram obtidos os resultados apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Resultados das Concentrações Mínimas Bactericidas do óleo essencial de laranja relativamente às bactérias de estudo.

Bactérias	Diluição 1:2	Diluição 1:4	Diluição 1:8	Diluição 1:16	Diluição 1:32	Diluição 1:64	Diluição 1:128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		X					
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935		X					
<i>Listeria monocytogenes</i> de Suíno		X					
<i>Salmonella enterica</i> subsp. Enterica CECT 443		X					

Legenda: O X na tabela representa a concentração mínima bactericida obtida para cada bactéria em estudo. As zonas em branco representam as diluições onde não se observou multiplicação bacteriana e as zonas em cinzento representam as concentrações em que o OE de laranja não teve efeito bactericida, e observou-se multiplicação bacteriana

Com base nos resultados das CMBs é possível concluir que a atividade bactericida do OE de laranja foi detetado na diluição de 1:4, ou seja, 250 µL/mL, para o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* CECT 935, *Listeria monocytogenes* de Suíno e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 443.

A análise para determinar a CMB foi feita dividindo a placa por concentrações do OE de laranja dos poços respectivos da microplaca após incubação de 24 horas, como mostra a Figura 16. Nota-se na figura o exemplo do procedimento, onde o número zero (0) na placa representa o controlo negativo, os números de 1 a 7 representam as diluições do OE de laranja nas soluções bacterianas: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:132, respectivamente.

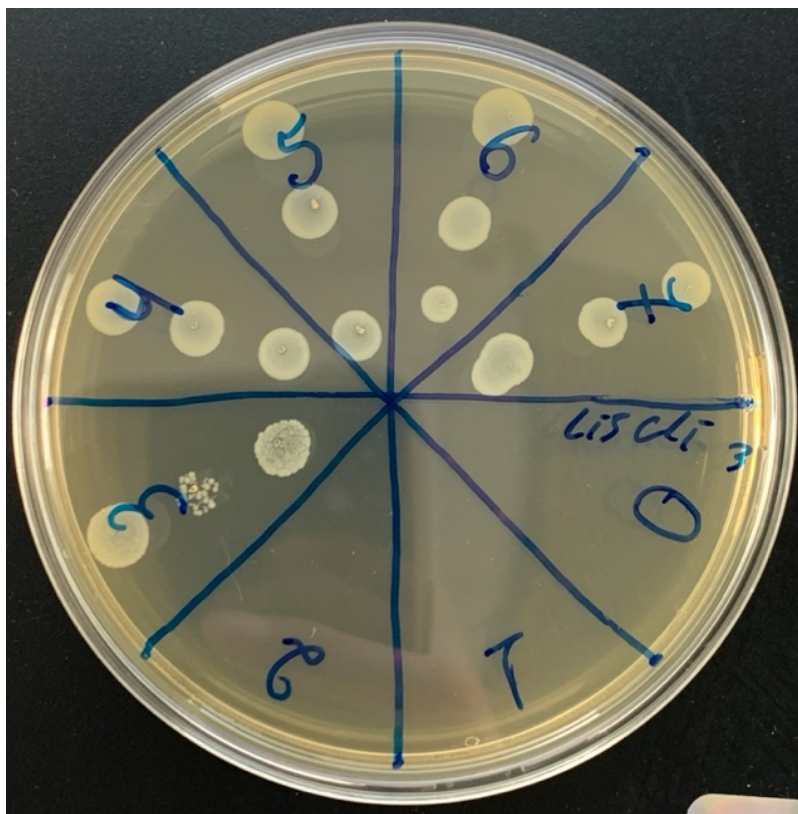


Figura 16: Teste para determinação da concentração Mínima Bactericida (CMB).

Os resultados obtidos revelaram que todas as bactérias avaliadas demonstraram ser susceptíveis à actividade antimicrobiana do OE de laranja, tendo sido atingida não só a inibição da sua multiplicação mas também a morte celular, não existindo capacidade de multiplicação da bactéria em placa de agar na concentração de 1:4 (250 $\mu\text{L/mL}$).

Estudos prévios com outros óleos essenciais também demonstraram seu potencial antimicrobiano. Por exemplo, Bomfim (2023) mostrou que os óleos essenciais de limão (*Citrus limon*) e hortelã (*Mentha piperita*) exibiram efeitos inibitórios sobre a multiplicação de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. De forma similar, Araújo e Longo (2016) evidenciaram que o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) apresentou ação bacteriostática e bactericida contra os mesmos patógenos. Esses resultados sugerem a possibilidade de explorar novos tipos de óleos essenciais, utilizando diferentes técnicas e concentrações para avaliar sua eficácia antimicrobiana frente a diversas bactérias e fungos.

No entanto, a pesquisa com óleos essenciais enfrenta diversas limitações, principalmente relacionadas com a sua manipulação e volatilidade. A rápida volatilização dos compostos, mesmo em ambientes controlados, representa um desafio significativo durante os ensaios experimentais. Além disso, alguns óleos, como o óleo essencial de laranja, apresentam características corrosivas, especialmente em contato com materiais plásticos, o que foi observado durante as fases preliminares deste estudo. Essas limitações levaram a

ajustes experimentais, como a seleção cuidadosa de materiais e técnicas adequadas para garantir uma maior precisão e reprodutibilidade dos resultados. Portanto, é fundamental o desenvolvimento de metodologias mais robustas que minimizem essas dificuldades e melhorem a precisão das experiências que envolvem a utilização de óleos essenciais.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Este estudo abordou a potencial aplicação do óleo essencial (OE) de laranja, um subproduto da indústria de produção de sumo de laranja, como agente antimicrobiano sustentável. A investigação visou explorar as propriedades antimicrobianas deste OE contra bactérias de relevância para a segurança alimentar, bem como contribuir para a redução do impacto ambiental associado aos resíduos industriais.

A análise bioquímica realizada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa permitiu caracterizar os principais compostos presentes no OE de laranja, revelando uma composição rica em monoterpenos, conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas com ênfase no D-Limoneno. Além disso, o estudo do perfil de virulência da coleção bacteriana testada, que incluiu bactérias Gram-positivas e Gram-negativas associadas a doenças de origem alimentar, reforçou a relevância do estudo destas espécies bacterianas no âmbito da segurança dos alimentos.

Os ensaios de atividade antimicrobiana confirmaram o potencial do OE de laranja como um agente inibidor da multiplicação bacteriana. A técnica de difusão em disco demonstrou resultados promissores com a identificação de 4 isolados susceptíveis à ação do OE. O mesmo foi observado com as determinações de concentração mínima inibitória (MIC) e bactericida (MBC), que evidenciaram a eficácia do óleo em concentrações relativamente baixas. Estes resultados sugerem que o OE de laranja pode ser uma alternativa viável a conservantes químicos tradicionais, especialmente em aplicações na indústria alimentar.

Apesar das limitações associadas ao uso do OE, como a possível transferência de sabor e odor para os alimentos como menciona Simona et al. (2021), este estudo reforça a importância de explorar subprodutos industriais com valor agregado. Nesse contexto, a biotecnologia surge como uma estratégia promissora para superar essas limitações. Algumas técnicas biotecnológicas podem ser utilizadas para selecionar e concentrar os compostos bioativos de interesse do OE de laranja, ao mesmo tempo em que eliminam parcial ou completamente os componentes responsáveis pelo odor indesejado. Essas abordagens podem não apenas ampliar a aplicabilidade deste OE na indústria alimentar, mas também garantir uma maior aceitação por parte dos consumidores.

A utilização do OE de laranja pode reduzir o impacto ambiental da indústria citrícola, ao mesmo tempo que oferece uma solução natural para desafios de conservação e segurança alimentar.

Conclui-se, portanto, que o OE de laranja apresenta um potencial promissor para uso na indústria alimentar, contribuindo para a sustentabilidade dos processos produtivos e na possível redução da utilização de conservantes artificiais. Além das aplicações na conservação de alimentos, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o OE de laranja também possui potencial para ser utilizado como alternativa a alguns sanitizantes químicos. A sua atividade antimicrobiana eficaz contra bactérias relevantes para a segurança alimentar indica que o óleo poderia ser explorado em aplicações como higienização de superfícies de contacto ou em processos de desinfecção na indústria. No entanto, para comprovar esta hipótese, seria necessário desenvolver novos estudos que investiguem a eficácia do óleo essencial de laranja em condições reais de aplicação, avaliando fatores como concentração ideal, tempo de ação e possíveis impactos nos materiais tratados. Estas investigações poderiam expandir significativamente as possibilidades de aplicação do OE de laranja, reforçando sua viabilidade como uma solução sustentável e natural.

Para futuros estudos seria importante avaliar a aplicação do OE em matrizes alimentares específicas otimizar a sua eficácia e aceitação no mercado, e desenvolver uma avaliação sobre viabilidade económica para aplicação na indústria.

6. Referências Bibliográficas

Abecitrus. 2024. História da laranja e subprodutos da laranja [Internet]. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/>

Adams RP. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream (IL): Allured Publishing Corporation.

Ahmad-Mansour N, et al. 2021. *Staphylococcus aureus* toxins: an update on their pathogenic properties and potential treatments. Toxins. 13(10):677.

Allerberger F, Wagner M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clin Microbiol Infect. 16(1):16–23.

Alves A, Viveiros C, Lopes J, Nogueira A, Pires B, Afonso AF, Teixeira C. 2021. Microbiological contamination in different food service units associated with food handling. Appl Sci. 11(16):7241.

American Type Culture Collection (ATCC). 2024. Página inicial da ATCC [Internet]. Manassas (VA): ATCC. Disponível em: <https://www.atcc.org>

Araújo MM, Longo PL. 2016. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Arq Inst Biol. 83(0).

Arbos KA, Stevani PC, Castanha RF. 2013. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. Rev Ceres. 60(2):161–165.

Arnoux AH, Santos AS, Beininger RPC. 2005. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. Rev Espaço para Saúde. 6(2):1–6.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 45(4):493–496.

Balick MJ. 2007. Ethnobotany, drug development and biodiversity conservation—exploring the linkages. Novartis Found Symp.:4–24.

Bajpai VK, et al. 2018. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *J Food Drug Anal.* 26(4):1201–1214.

Berthold-Pluta A, Stasiak-Róžańska L, Pluta A, Garbowska M. 2019. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against *Cronobacter* strains. *Eur Food Res Technol.* 245(5):1137–1147.

Bizzo HR, Hovell AMC, Rezende CM. 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quim Nova.* 32(3)

Bomfim YG, Queiroz BS, Santos MS. 2023; Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Citrus limon* contra cepas patogênicas. *Res Soc Dev.* 12(10):e81121043430.

Bouyahya A, Mechchate H, Benali T, Ghchime R, Charfi S, Balahbib A, Burkov P, Shariati MA, Lorenzo JM, Omari NE. 2021; Health benefits and pharmacological properties of carvone. *Biomolecules.* 11(12):1803.

Burt S. 2004; Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* 94(3):223–253.

Carpena M, Nuñez-Estevez B, Soria-Lopez A, Garcia-Oliveira P, Prieto MA. 2021; Essential oils and their application on active packaging systems: a review. *Resources.* 10(1):7.

CDC. 2024 abr 15; *Staphylococcus aureus* basics. *Staphylococcus aureus* [Internet]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/staphylococcus-aureus/about/> [citado em 16 dez 2024].

Chaiwarit T, Ruksiriwanich W, Jantanasakulwong K, Jantrawut P. 2018; Use of orange oil loaded pectin films as antibacterial material for food packaging. *Polymers.* 10(10):1144.

Cakrawati D, Handayani MN. 2017; Microencapsulation of limonin from orange juice waste using maltodextrin. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 180:012096.

Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. 2015; Essential oils as antimicrobials in food systems: a review. *Food Control.* 54:111–119.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2023; Serotypes and the importance of serotyping *Salmonella*. [Internet]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotypes.html>.

Centers for Disease Control and Prevention. 2024; Public Health Image Library [Internet]. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2114>.

Centers for Disease Control and Prevention. 2024; Public Health Image Library [Internet]. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10066>.

Centers for Disease Control and Prevention. 2024; Public Health Image Library [Internet]. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2296>.

Centers for Disease Control and Prevention. 2024; Public Health Image Library [Internet]. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10828>.

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). 2024; Página inicial da CECT [Internet]. Valência (Espanha): CECT. Disponível em: <https://www.cect.org> [citado em 16 dez 2024].

Cota JB, Silva VF, Chambel L, Veloso MG, Vieira-Pinto M, Oliveira M. 2019; Pheno and genotyping of *Salmonella* from slaughtered pigs in a Portuguese abattoir reveal differential persistence ability. *Vet Microbiol*. 239(108457):108457.

Cunha AP, Cavaleiro P, Salgueiro L. 2010; Capítulo 16 Fármacos aromáticos plantas aromáticas e óleos essenciais. Em: Cunha AP, editor. *Farmacognosia e fotoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. p. 339–482.

Dima C, Dima S. 2015; Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Curr Opin Food Sci*. 5:29–35.

Dugo G, Di Giacomo A. 2002; *Citrus*: the genus citrus. Medicinal and aromatic plants industrial profiles v. 26. London: Taylor & Francis. xiv, 642 p.

Erasto P, Viljoen AM. 2008; Limonene: a review—biosynthetic, ecological, and pharmacological relevance. *Nat Prod Commun*. 3(7):1934578X0800300.

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2023; The European Union one health 2022 zoonoses report. EFSA J. 21(12).

Field D, Fernandez de Ullivarri M, Ross RP, Hill C. 2023; After a century of nisin research—where are we now? FEMS Microbiol Rev. 47(3).

Foley SL, et al. 2013; *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. Microbiol Mol Biol Rev. 77(4):582–607.

Forsythe SJ. 2000; Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed. 424 p.

Galvão JG, Silva VF, Ferreira SG, França FRM, Santos DA, Freitas LS, Alves PB, Araújo AAS, Cavalcanti SCH, Nunes RS. 2015; β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: an alternative to control *Aedes aegypti* larvae. Thermochim Acta. 608:14–19.

Gao Z, Gao W, Zeng S, Li L, Liu E. 2018; Chemical structures, bioactivities and molecular mechanisms of citrus polymethoxyflavones. J Funct Foods. 40:498–509.

Geraci A, et al. 2017; Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. Nat Prod Res. 31(6):653–659.

Hayakawa Y, Akagi M, Hayashi M, Shimano T, Komae H, Funaki O, Kaidoh T, Takeuchi S. 2000; Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of *Staphylococcus aureus* in dairy cows. Vet Microbiol. 72(3–4):321–327.

Hobbs BC, Roberts D. 1999; Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos. São Paulo: Varela. 376 p.

Idalia V-MN, Bernardo F. 2017; *Escherichia coli* as a model organism and its application in biotechnology. Em: *Escherichia coli*—recent advances on physiology, pathogenesis and biotechnological applications. InTech.

INE. 2022; Estatísticas agrícolas 2022 [Internet]. Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_pesquisa&frm_accao [acesso em 26 de fevereiro de 2024].

Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. 2017; Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. J Appl Microbiol. 123(3):570–581.

Kluytmans JAJW. 2010; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? Clin Microbiol Infect. 16(1):11–15.

Kong C, Neoh HM, Nathan S. 2016; Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. Toxins. 8(3):72. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins8030072>.

Leitão JH. 2020; Microbial virulence factors. Int J Mol Sci. 21(15):5320.

Levinson W. 2020; Review of medical microbiology and immunology. New York (NY): McGraw-Hill Education.

Liu Y, Heying E, Tanumihardjo SA. 2012; History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. Compr Rev Food Sci Food Saf. 11(6):530–545.

Lopez-Valladares G, Tham W, Parihar VS, Helmersson S, Andersson B, Ivarsson S, Johansson C, Ringberg H, Tjernberg I, Henriques-Normark B, et al. 2014; Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958–2010). Epidemiol Infect. 142(11):2251–2260.

Lourinho LRM. 2021; Caracterização in vitro da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* [dissertação de mestrado]. Covilhã (Portugal): Universidade da Beira Interior.

Luber P, Crerar S, Dufour C, Farber J, Datta A, Todd ECD. 2011; Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: working towards global scientific consensus and harmonization—recommendations for improved prevention and control. Food Control. 22(9):1535–1549.

Maciel I, et al. 2002; Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Rev Quim Nova. 25(3):429–438.

Maestri G, et al. 2020; Quantificação de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e mecanismos de resistência nas mãos de manipuladores de alimentos em UANS hospitalares em SC. Disciplinarum Scientia - Ciências da Saúde. 21(1):91–105.

Maijala R, Ranta J, Seuna E, Peltola J. 2005; The efficiency of the Finnish *Salmonella* control programme. Food Control. 16(8):669–675.

Mahato N, Sharma K, Koteswararao R, Sinha M, Baral E, Cho MH. 2019; Citrus essential oils: extraction, authentication and application in food preservation. Crit Rev Food Sci Nutr. 59(4):611–625.

Maldonado AG. 2008; Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidos em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo. 75 p.

Mendes JJ, Marques-Costa A, Vilela C, Neves J, Candeias N, Cavaco-Silva P, Melo-Cristino J. 2012; Clinical and bacteriological survey of diabetic foot infections in Lisbon. Diabetes Res Clin Pract. 95(1):153–161.

Montville TJ, De Siano T, Nock A, Padhi S, Wade D. 2006; Inhibition of *Bacillus anthracis* and potential surrogate bacilli growth from spore inocula by nisin and other antimicrobial peptides. J Food Prot. 69(10):2529–2533.

Murray A, Skene K, Haynes K. 2017; The circular economy: an interdisciplinary exploration of the concept and application in a global context. J Bus Ethics. 140(3):369–380.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). 1998; Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines. J Food Prot. 61(9):1246–1259.

Neves MF, Trombin VG, Milan P. 2010; The orange juice business: a Brazilian perspective. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

O’Gara JP. 2007; *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 270(2):179–188.

Olatunya AM, Akintayo ET. 2017; Evaluation of the effect of drying on the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of peels from three species of citrus group. Int Food Res J. 24:1991–1997.

Okwi DE, Emenike IN. 2006; Evaluation of the phytonutrients and vitamins contents of citrus fruits. Int J Mol Med Adv Sci. 2(1):1–6.

Ollitrault P, Curk F, Krueger R. 2020; Citrus taxonomy. Em: *The Genus Citrus*. Amsterdam: Elsevier. p. 57–81.

Olmedo R, Nepote V, Grosso NR. 2014; Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. Food Chem. 156:212–219.

Perigos de origem alimentar. 2024 jun 23; Gov.pt [Internet]. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>.

Probst IS. 2012; Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico [dissertação de mestrado]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Programas Nacionais de Controlo das Salmonelas (PNCS) – DGAV. 2024; disponível em: <https://www.dgav.pt/animais/conteudo/animais-de-producao/aves-de-capoeira/saude-animal/doencas-das-aves/salmonelose-2/programas-nacionais-de-controlo-das-salmonelas-pncls/> [acesso em 26 de fevereiro de 2024].

Rasigade JP, Dumitrescu O, Lina G. 2014; New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections. Clin Microbiol Infect. 20(7):587–588.

Reagan DR, Doebbeling BN, Pfaller MA, et al. 1991; Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. Ann Intern Med. 114:101–106.

Rezzadori K, Benedetti S, Amante ER. 2012; Proposals for the residue's recovery: orange waste as raw material for new products. Food Bioprod Process. 90(4):606–614.

Ribeiro-Santos R, Andrade M, Sanches-Silva A, de Melo NR. 2018; Essential oils for food application: natural substances with established biological activities. Food Bioproc Tech. 11(1):43–71.

Rocourt J, Buchrieser C. 2003; The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. Diagn Microbiol Infect Dis. 45(3):159–166.

Salmonella: um contaminante comum da cadeia de alimentos frequentemente isolado das infecções de origem alimentar. 2024; bioMérieux industrial microbiology [Internet]. Disponível em: <https://www.biomerieux-industry.com/pt/food-safety-quality/resources/scientific-library/salmonella-common-foodchain-contaminant> [acessado em 16 dez 2024].

Schieber A, Stintzing FC, Carle R. 2001; By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. Trends Food Sci Technol. 12(11):401–413.

Schechter M, Marangoni DV. 1998; Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Schwab JP, Edelweiss MIA. 2003; Identificação imunohistoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. Rev Bras Ginecol Obstet. 25(7):501–505.

Sharma K, Mahato N, Cho MH, Lee YR. 2017; Converting citrus wastes into value-added products: economic and environmentally friendly approaches. Nutrition. 34:29–46.

Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Lima Filho JL. 2008; *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. Cien Saude Colet. 13(5):1675–1683.

Simona J, Dani D, Petr S, Marcela N, Jakub T, Bohuslava T. 2021; Edible films from carrageenan/orange essential oil/trehalose—structure, optical properties, and antimicrobial activity. *Polymers*. 13(3):332.

Stevanović Z, Bošnjak-Neumüller J, Pajić-Lijaković I, Raj J, Vasiljević M. 2018; Essential oils as feed additives—future perspectives. *Molecules*. 23(7):1717.

Storck CR, Nunes GL, Oliveira BB, Basso C. 2013; Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. *Cienc Rural*. 43(3):537–543.

Sun Y, Kang H, Han S, Park Y, Hong S. 2015; Taxonomy and phylogeny of the genus *Citrus* based on the nuclear ribosomal DNA ITS region sequence. *Pakistan J Bot*. 47(1):95–101.

Tan XC, Chua KH, Ravishankar Ram M, Kuppusamy UR. 2016; Monoterpenes: novel insights into their biological effects and roles on glucose uptake and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Food Chem*. 196:242–250.

Teklemariam AD, et al. 2023; Human salmonellosis: a continuous global threat in the farm-to-fork food safety continuum. *Foods*. 12(9):1756.

Teixeira B, et al. 2013; Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind Crops Prod*. 43:587–595.

Tratamento térmico - Portal Embrapa. 2024 jul 1; Embrapa.br [Internet]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/tipos-de-processos/tratamento-termico>.

Usda.gov. 2024 fev 21; disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>.

Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001; *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*. 14(3):584–640.

Veiga Junior VF, Pinto AC. 2005; Plantas medicinais: cura segura? Rev Quim Nova. 28(3):519–528.

Vidal BT, Souza DN, Souza MR, Freitas FMN, Ferreira JC. 2022; The importance of good practices in the prevention of foodborne diseases (FTS) in food and nutrition units (HUS). Braz J Dev. 8(5):39320–39333.

Wardowski WF, Miller WM, Hall DJ, Grierson W. 2013; Fresh citrus fruits. London: Springer Science & Business Media.

Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. 2011; Prescott, Harley, and Klein's microbiology. 8th ed. New York (NY): McGraw-Hill. p. 1088.

Anexos

Anexo 1: Tabela de especificações do OE de laranja fornecido pela Plena Natura, classificação e rotulagem da Ficha de dados de segurança.

ESPECIFICAÇÕES DE PRODUTO

(conforme original do n/fornecedor)

NOME DO PRODUTO: ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE
INCI: CITRUS AURANTIUM DULCIS
CÓDIGO DO PRODUTO: PN01025
CAS #: 8028-48-6
EINECS #: 232-433-8
PROCESSO DE FABRICO: PRENSAGEM
VALIDADE / USAR DE PREFERÊNCIA ANTES DE: 24 MESES DA DATA DE PRODUÇÃO

DETALHES ANALÍTICOS	PARÂMETROS
APARÊNCIA	LÍQUIDO
COR	COR DE LARANJA - VERMELHO
ODOR	CARACTERÍSTICO, LARANJA
GRAVIDADE ESPECÍFICA (@ 20°C)	0.830 – 0.850
ÍNDICE DE REFRAATIVIDADE (@ 20°C)	1.468 – 1.490
ROTAÇÃO ÓPTICA (°C)	+93.0 A +100.0
VALOR DE PERÓXIDO (MMOL/L)	<20.0

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO
Armazenar em local fresco e seco, afastado do calor e luz solar

SECÇÃO 1 – IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DO FORNECEDOR

1.1. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO

NOME DO PRODUTO	ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE				
DEFINIÇÃO BIOLÓGICA	O ÓLEO OBTIDO POR EXPRESSÃO MECÂNICA DOS EPICARPOS FRESCOS DA LARANJA DOCE, CITRUS AURANTIUM L. VAR. DULCIS L. (SYN: CITRUS SINENSIS).				
NOME INCI	CITRUS AURANTIUM DULCIS				
SINÓNIMOS & NOMES COMERCIAIS	----				
CÓDIGO INTERNO	PN01025	Nº FDA	N/D	CoE No.	N/D
Nº CAS	8028-48-6	EC No.	232-433-8	Nº EINECS	232-433-8

1.2. UTILIZAÇÕES IDENTIFICADAS RELEVANTES DA SUBSTÂNCIA OU MISTURA E UTILIZAÇÕES DESACONSELHADAS

1.3. IDENTIFICAÇÃO DO FORNECEDOR DA FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

FORNECEDOR:	PLENA NATURA – PRODUTOS NATURAIS, UNIP., LDA.
MORADA:	AVENIDA DOS MOINHOS, 3A – ALFRAGIDE, 2610-118 AMADORA - PORTUGAL
TELEFONE:	(+351) 215 982 195
EMAIL:	GERAL@PLENA-NATURA.PT

1.4. NÚMERO DE TELEFONE DE EMERGÊNCIA

TELEFONES:	CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTI-VENENOS - TEL: 808 250 143
	INEM: 112

2.1. CLASSIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA OU MISTURA

CLASSIFICAÇÃO (67/548/EEC)	N/D
CLASSIFICAÇÃO (EU 1272/2008)	AS FRASES H E P ESTÃO LISTADAS NA ÍNTEGRA NA SECÇÃO 16. PERIGOS QUÍMICOS E FÍSICOS: O PRODUTO É INFLAMÁVEL SAÚDE HUMANA: PERIGO DE ASPIRAÇÃO, CORROSÃO/IRRITAÇÃO DA PELE E SENSIBILIZAÇÃO DA PELE AMBIENTE: O PRODUTO CONTÉM SUBSTÂNCIAS CONSIDERADAS PERIGOSAS PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS E QUE PODEM CAUSAR EFEITOS ADVERSOS DURADOUROS PARA O AMBIENTE AQUÁTICO. PERIGOS QUÍMICOS E FÍSICOS: LIQ. INFLAM. - H226 SAÚDE HUMANA: IRRIT. PELE 2 - H315. SENS. PELE 1 - H317. TOX. RESP. 1 - H304. AMBIENTE: AQUÁTICA CRÓNICA 2 - H411.* *CONSULTAR SECÇÃO 16 – OUTRAS INFORMAÇÕES

2.2. ELEMENTOS DO RÓTULO

RÓTULO DE ACORDO COM O REGULAMENTO (CE) Nº 1272/2008	
SÍMBOLOS DE PERIGO:	   
PALAVRA SINAL:	PERIGO
CONTÉM:	D-LIMONENE, ALPHA-PINENE
FRASES DE RISCO:	H226 LÍQUIDO E VAPOR INFLAMÁVEIS H304 PODE SER MORTAL POR INGESTÃO E PENETRAÇÃO NAS VIAS RESPIRATÓRIAS H315 PROVOCA IRRITAÇÃO CUTÂNEA H317 PODE PROVOCAR UMA REACÇÃO ALÉRGICA CUTÂNEA H411 TÓXICO PARA OS ORGANISMOS AQUÁTICOS COM EFEITOS DURADOUROS.
RECOMENDAÇÕES DE PRUDÊNCIA:	P210 MANTER AFASTADO DO CALOR, SUPERFÍCIES QUENTES, FAÍSCA, CHAMA ABERTA E OUTRAS FONTES DE IGNIÇÃO. NÃO FUMAR. P241 UTILIZAR EQUIPAMENTO [ELÉTRICO/DE VENTILAÇÃO/DE ILUMINAÇÃO/...] À PROVA DE EXPLOÇÃO. P261 EVITAR RESPIRAR AS POEIRAS/FUMOS/GASES/NÉVOAS/VAPORES/AEROSSÓIS. P273 EVITAR A LIBERTAÇÃO PARA O AMBIENTE P280 USAR LUVAS DE PROTECÇÃO / VESTUÁRIO DE PROTECÇÃO / PROTECÇÃO OCULAR / PROTECÇÃO FACIAL P301 + 310 EM CASO DE INGESTÃO: CONTACTE IMEDIATAMENTE UM CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS OU UM MÉDICO. P303+361+353 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (OU O CABELO): RETIRAR IMEDIATAMENTE TODA A ROUPA CONTAMINADA. ENXAGUAR A PELE COM ÁGUA [OU TOMAR UM DUCHE]. P331 NÃO PROVOCAR O VÔMITO P405 ARMAZENAR EM LOCAL FECHADO À CHAVE. P501 ELIMINAR O CONTEÚDO/RECIPIENTE DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO LOCAL EM VIGOR

	P264 LAVAR ... CUIDADOSAMENTE APÓS MANUSEAMENTO. P272 A ROUPA DE TRABALHO CONTAMINADA NÃO PODE SAIR DO LOCAL DE TRABALHO. P302+352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: LAVAR ABUNDANTEMENTE COM ÁGUA P321 TRATAMENTO ESPECÍFICO (VER ... NO PRESENTE RÓTULO). P332+313 EM CASO DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA: CONSULTE UM MÉDICO. P333+313 EM CASO DE IRRITAÇÃO OU ERUPÇÃO CUTÂNEA: CONSULTE UM MÉDICO. P362+364 RETIRAR A ROUPA CONTAMINADA. LAVAR A ROUPA CONTAMINADA ANTES DE A VOLTAR A USAR. P370+378 EM CASO DE INCÊNDIO: PARA EXTINGUIR UTILIZAR...{VER CAPÍTULO 5} P391 RECOLHER O PRODUTO DERRAMADO P403+235 ARMAZENAR EM LOCAL BEM VENTILADO. CONSERVAR EM AMBIENTE FRESCO.
--	--